



HAL
open science

Spectroscopie de fluorescence dynamique confocale : réalisation du dispositif optique et application à l'étude de l'adsorption de protéines aux interfaces solide/liquide.

Sébastien Balme

► To cite this version:

Sébastien Balme. Spectroscopie de fluorescence dynamique confocale: réalisation du dispositif optique et application à l'étude de l'adsorption de protéines aux interfaces solide/liquide.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2005. Français. NNT: . tel-00011288

HAL Id: tel-00011288

<https://theses.hal.science/tel-00011288>

Submitted on 3 Jan 2006

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

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



**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

***Discipline : Chimie Physique
Formation Doctorale : Chimie moléculaire et élaboration du solide
Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Physiques***

présentée et soutenue publiquement

par

Sébastien Balme

Le 4 novembre 2005

Titre :

***Spectroscopie de fluorescence dynamique confocale : réalisation
du dispositif optique et application à l'étude de l'adsorption de
protéines aux interfaces solide/liquide.***

JURY

M.	Gérald POURCELLY	Professeur UMII	, Président du jury
Mme	Marie-Pierre FONTAINE-AUPART	Directeur de recherche CNRS	, Rapporteur
M.	Bernard TINLAND	Directeur de recherche CNRS	, Rapporteur
Mme.	Catherine PICART	Professeur UMII	, Examineur
M.	Christian GUERIN	Professeur UMII	, Examineur
M.	Philippe DEJARDIN	Directeur de recherche CNRS	, Directeur de Thèse
M.	Jean-Marc JANOT	Chargé de recherche CNRS	, Invité

Travail réalisé à l'Institut Européen des Membranes (UMR 5635, CNRS, ENSCM, UMII), Montpellier

Remerciements

Cette thèse marque l'achèvement de trois années de travail à l'IEM. En premier lieu, je tenais à remercier ceux sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Ainsi, je remercie Jean-Marc «Mc-Guyver» Janot qui m'a encadré, Philippe Déjardin mon directeur de thèse et Patrick Séta l'animateur du groupe MIB pour ses discussions et pour avoir toujours répondu présent aux sollicitations des thésards du groupe.

Je remercie aussi Gérard Pourcelly, directeur de l'IEM, de m'avoir accueilli dans le laboratoire et d'avoir accepté de prendre la présidence de mon jury de thèse. Je tiens également à exprimer ma gratitude envers Marie-Pierre Fontaine-Auppart et Bernard Tinland, les rapporteurs de ce travail, ainsi que Catherine Picard et Christian Guérin, les examinateurs, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour l'intérêt qu'ils y ont porté.

Merci aussi à ceux qui ont apporté leur contribution à ce travail, Elena Vassina avec qui j'ai réalisé les mesures d'adsorbance en radio-détection, Patrice Monteil de l'atelier de mécanique pour avoir usiné, parfois dans l'urgence, des pièces et Emmanuel Tronel-Peyroz pour ses conseils lors de l'élaboration des protocoles de traitement des lamelles. Je n'oublie pas d'associer aussi Catherine et Laurie qui ont lu et relu ce manuscrit pour y corriger les fautes d'orthographe.

Je tiens aussi à remercier Monique Smaïhi qui m'a permis de collaborer avec elle dans le cadre de son activité de recherche.

Une pensée aussi pour toutes les personnes du site IEM-CNRS, pour l'ambiance qu'ils ont mis au labo. Merci aussi à la Dream-Team Jean-Mi, Tristan et Rafik qui ont toujours été présents à mes côtés.

Je remercie mes amis et tout particulièrement Perrine pour avoir trouvé un avion par hasard, Yoyo pour les 4 jours en Drôme Provençale en pleine rédaction, Rénald qui pense que les thésards sont toujours en vacances... Maintenant que c'est ton tour, bon courage ! Pacs, Lolo et Malik pour m'avoir supporté depuis si longtemps. Une pensée aussi pour toutes les personnes que j'ai croisées dans les associations étudiantes durant ces années passées à la fac.

Je tiens à adresser tout particulièrement un petit mot aux membres qui composent l'équipe de direction de l'UM2. « Merci de m'avoir permis de travailler parmi vous et de m'avoir fait confiance, cela a été une source de motivation supplémentaire ».

Pour finir je remercie mes parents, ma sœur et Laurie pour leur soutien et leur aide.

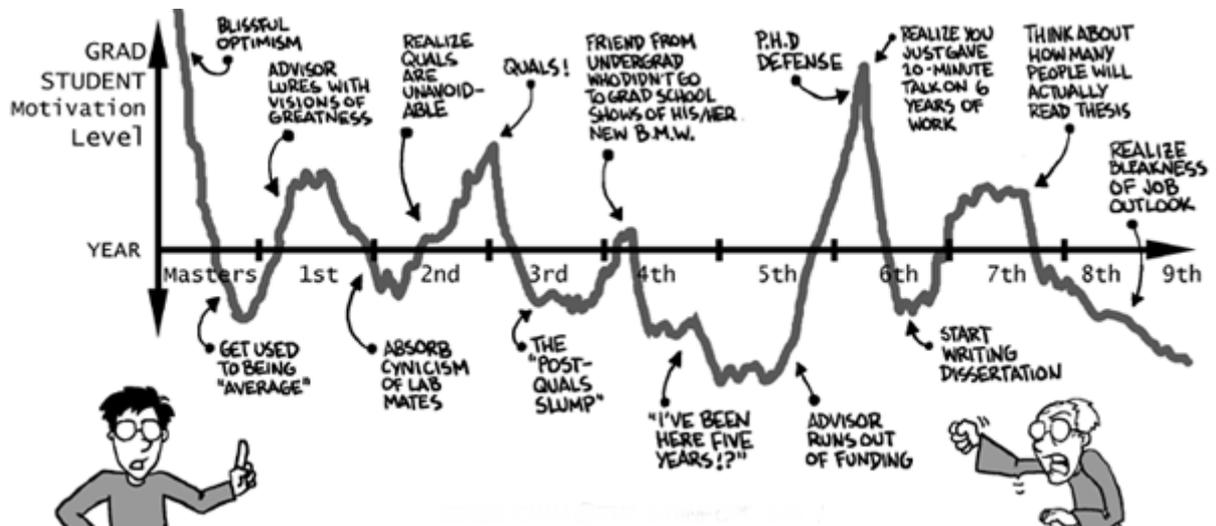


Table des matières

Table des matières	1
Introduction Générale.....	5
Liste des abréviations.....	10
Chapitre I. Partie théorique	11
1. La Fluorescence.....	12
1.1. Spectres d'absorbance, d'excitation et d'émission de fluorescence.....	13
1.2. Rendement quantique et durée de vie de fluorescence.....	15
1.3. Polarisation de fluorescence.....	17
1.4. Effet de l'environnement local sur la fluorescence.....	22
1.5. Extinction de fluorescence.....	22
1.6. Conclusion.....	23
2. Optique gaussienne	23
3. La microscopie confocale.....	31
3.1. Principe du microscope confocal.....	31
3.2. Résolution spatiale du microscope confocal.....	34
3.3. Photoblanchiment, Photodégradation, Saturation et effet thermiques.....	36
3.4. Domaines d'application.....	37
4. Les protéines.....	37
4.1. Structure des protéines.....	38
4.2. Propriétés des protéines.....	42
4.2.1. Les sites actifs et enzymatiques.....	42
4.2.2. Protéines : molécules polyélectrolytes.....	42
4.2.3. Stabilité et dénaturation des protéines.....	44
4.3. Etude des protéines par fluorescence.....	45
4.3.1. Fluorescence intrinsèque des protéines.....	45
4.3.2. Les marqueurs fluorescents.....	47
4.3.3. Limites de l'étude de l'anisotropie de fluorescence des protéines.....	49
5. Phénomène d'adsorption des protéines sur des surfaces.....	50
5.1. Aspect thermodynamique.....	51
5.2. Aspect cinétique.....	52
5.2.1. Cinétique initiale contrôlée par le transport.....	53
5.2.2. Cinétique initiale contrôlée par la réaction interfaciale.....	56
5.2.3. Cinétique initiale : Passage du contrôle par le transport (diffusion et/ou convection) au contrôle par la réaction interfaciale.....	56
5.2.4. Effet de surface exclue.....	57
5.2.5. Evènements après l'adsorption.....	61
5.3. Méthodes d'analyses.....	62
Chapitre II. Matériel et méthodes.....	64
1. La spectroscopie de fluorescence résolue en temps.....	65
1.1. Principe de la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps.....	66
1.2. Dispositif expérimental.....	67
1.2.1. Dispositif optique.....	67
1.2.2. Acquisition des données.....	71
1.3. Mesure des durées de vie et des temps de corrélation.....	72
1.4. Analyse des déclinés de fluorescence.....	74
2. Mesure des concentrations de surface.....	77
2.1. Marquage des protéines par ^{125}I	77
2.2. Dispositif instrumental.....	78
2.3. Détermination de la concentration interfaciale et des cinétiques apparentes d'adsorption et désorption.....	79
3. Conclusion	81
Chapitre III. Modèle protéique d'étude : marquage de l'avidine par l'alexa fluor 594	83

1. Contraintes et objectifs du modèle protéique	84
2. L'avidine	84
2.1. Interaction avidine-biotine.....	86
2.2. Les différents marquages possibles ; le choix du marqueur.....	89
2.2.1. Extinction de fluorescence par l'avidine.....	89
2.2.2. Choix du marqueur et distance.....	90
3. Marquage de l'avidine	93
3.1. Marquage direct (A-al).....	95
3.2. Marquage via la biotine éthylènediamine (A-B4al).....	95
3.2.1. Synthèse de la sonde fluorescente.....	95
3.2.2. Couplage entre l'avidine et B4al.....	97
3.3. Marquage via la biocytine (A-B7al).....	98
4. Analyse des marquages	99
4.1. Analyse de la fluorescence.....	99
4.2. Validation du modèle.....	103
4.2.1. Influence de la viscosité.....	103
4.2.2. Influence des agents dénaturants.....	107
5. Conclusions	111
<i>Chapitre IV. Conception et réalisation d'un dispositif confocal de spectroscopie de fluorescence résolue en temps.</i>	112
1. Récapitulation des contraintes expérimentales	113
2. Optimisation du dispositif optique	115
2.1. L'élément clé du dispositif : l'objectif de microscope.....	115
2.2. L'excitation.....	121
2.2.1. Les sources lumineuses.....	121
2.2.2. Filtre spatial d'excitation.....	122
2.2.3. Polarisation du faisceau d'excitation.....	123
2.2.4. Atténuation du faisceau d'excitation.....	123
2.3. Séparation des faisceaux d'excitation et de fluorescence.....	123
2.4. Optimisation de la détection.....	125
2.5. Cuve d'écoulement et déplacement de l'échantillon.....	126
3. Acquisition des données	129
4. Caractéristiques du dispositif	129
5. Protocole expérimental pour l'étude de la cinétique d'adsorption	131
5.1. Contraintes expérimentales.....	131
5.2. Mise au point de la séquence d'acquisition.....	132
6. Analyse des données	135
<i>Chapitre V. Adsorption de l'avidine sur le mica et la membrane polymère AN-69</i>	139
1. Conditions expérimentales	140
2. Etudes préliminaires	140
2.1. Adsorption de ¹²⁵ I-avidine sur le MICA.....	140
2.2. Mesures en mode confocal de la durée de vie et du temps de corrélation.....	142
3. Adsorption de l'avidine sur le mica	145
3.1. Evolution de la fluorescence de surface en fonction du temps.....	146
3.2. Profil de concentration en solution en fonction du temps lors du processus d'adsorption.....	150
3.3. Fluorescence dynamique.....	155
4. Adsorption du complexe A-B4al sur une membrane polymère	155
5. Conclusion	159
<i>Conclusion Générale</i>	161

<i>Annexes</i>	164
Annexe 1 : Modèle d'écoulement d'un fluide dans une fente	165
Annexe 2 : Mode opératoire des marquages	167
Annexe 3 : Descriptif des appareillages commerciaux utilisés	169
Annexe 4 : Protocole de préparation des cellules d'écoulement utilisée en mode confocal	170
Annexe 5 : Détermination des caractéristiques des lasers utilisés	171
Annexe 6 : Mesure de la résolution spatiale du dispositif optique confocal	173
Annexe 7 : Fonction instrumentale des déclins de fluorescence	174
<i>Index et références</i>	176
Index des figures	177
Index des tableaux	182
Références bibliographiques (par numéros)	184
Références bibliographiques (par auteurs)	197

Introduction Générale

La compréhension des phénomènes d'adsorption de protéines aux interfaces solide/liquide présente un intérêt dans de nombreux domaines. Le phénomène de colmatage observé, notamment en filtration de solutions biologiques, est intimement lié aux interactions entre les biomolécules et les surfaces de matériaux, qu'ils soient polymères ou minéraux.

Devant la complexité des phénomènes mis en jeu, les études fondamentales et leurs modélisations revêtent une importance stratégique. Un grand nombre de techniques sont actuellement utilisées afin d'étudier ces phénomènes. Parmi elles, certaines vont permettre d'étudier la cinétique d'adsorption, la concentration interfaciale en fonction du temps, d'autres encore, d'examiner l'orientation et/ou la conformation des protéines sur la surface. Les toutes premières études consistaient à mesurer la déplétion du surnageant en présence de solides de grande aire spécifique. Avec l'évolution de l'instrumentation, la conformation des protéines aux interfaces a pu être étudiée. Les techniques de fluorescence ont également été utilisées pour aborder ces questions ; citons, par exemple, la technique de fluorescence basée sur l'excitation par onde évanescente qui permet d'obtenir la concentration sur une surface plane.

L'étude du transport des protéines en solution vers l'interface est effectuée indirectement par l'utilisation de modèles théoriques. Son observation directe s'avère extrêmement compliquée dans la mesure où elle dépend d'un certain nombre de contraintes. Ces dernières sont d'une part liées au peu de molécules existantes dans la solution, et d'autre part à la rapidité des phénomènes, ce qui exclut de fait toutes les techniques faisant appel à des temps d'accumulation trop longs. L'observation des phénomènes cinétiques dans la solution reste un enjeu essentiel pour la compréhension des mécanismes d'adsorption.

Un autre aspect de l'adsorption qui a peu été étudié est la dynamique moléculaire des protéines lors des étapes de l'adsorption. Si certaines techniques ont permis de mettre en évidence les phénomènes de dénaturation et d'échange des protéines adsorbées, aucune n'a été capable de mesurer avec précision la dynamique des protéines dans la solution ainsi qu'au voisinage de la surface. Dans la mesure où les protéines sont capables de changer de conformation selon la nature de leur environnement et des interactions qu'elles développent avec celui-ci, il semble essentiel de disposer de moyens pour étudier ces mécanismes au voisinage de la surface.

Pour accéder à ces mesures, la technique à utiliser doit être capable de répondre aux exigences suivantes :

- elle doit permettre de détecter une concentration extrêmement faible de molécules (de l'ordre du nanomolaire)
- elle doit permettre d'effectuer des mesures parfaitement localisées dans l'espace (micromètre),
- elle doit être suffisamment rapide pour permettre des mesures au cours de cinétiques d'adsorption (inférieure à la minute),
- enfin, elle doit pouvoir rendre compte aussi bien de la modification de l'environnement des molécules observées que de leur mouvement.

Les techniques de fluorescence répondent à la plupart de ces exigences. En effet, ce sont des techniques extrêmement sensibles avec lesquelles il est aujourd'hui possible de détecter de très faibles concentrations de molécules. De plus, elles permettent d'étudier, par des mesures dynamiques, aussi bien des modifications de structure que d'environnement ou de mouvement. Les développements récents de la microscopie en mode confocal ont ouvert la voie pour ces techniques vers une résolution spatiale de l'ordre du micromètre.

Ce travail fait appel à différentes compétences ; dans le schéma de la Figure 1, nous avons représenté la démarche selon laquelle nous l'avons abordé et comment nous avons articulé ces différents domaines les uns par rapport aux autres. Dans un souci de rigueur, nous avons essayé le plus possible de nous en tenir aux conditions les plus simples ; nous avons conçu et réalisé un marquage fluorescent afin d'obtenir une protéine modèle pour les techniques de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence résolue dans le temps et utilisé une surface modèle pour les études d'adsorption.

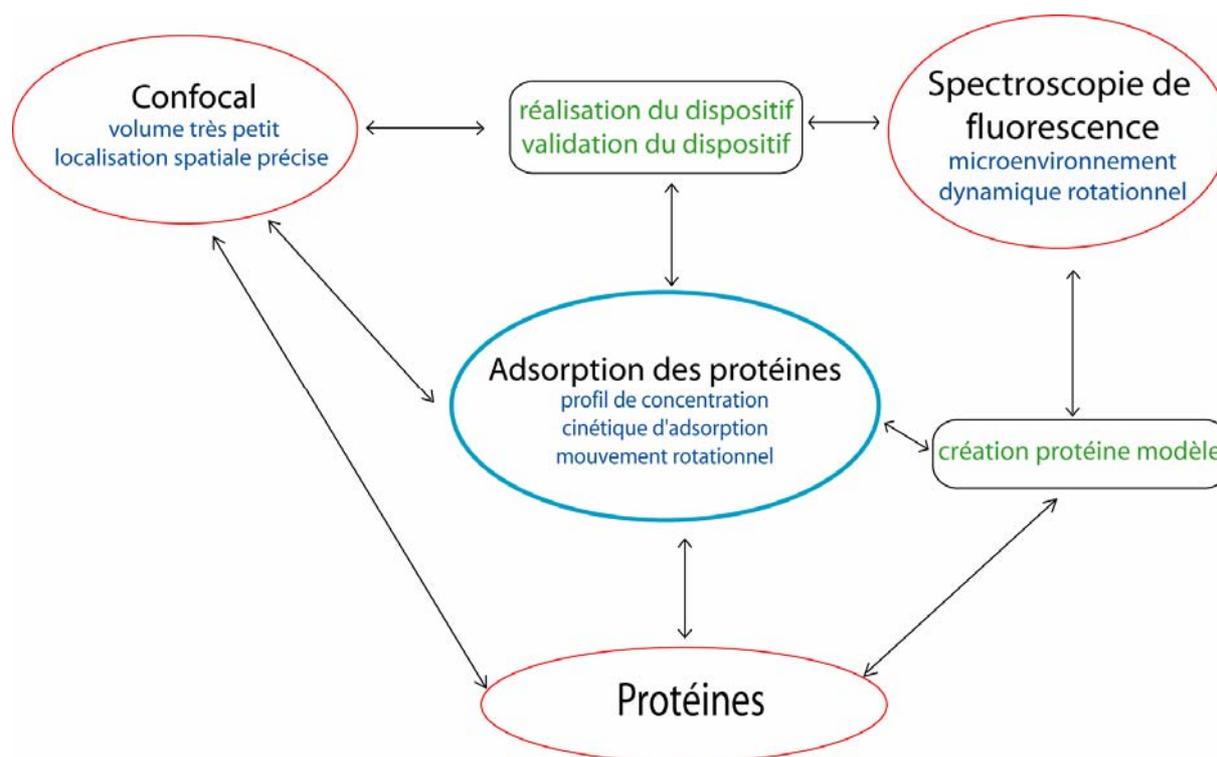


Figure 1 : Synoptique des contraintes et des réalisations effectuées au cours du projet de thèse

Dans ce travail de thèse nous avons couplé, dans le cadre d'études d'adsorption, la technique de fluorescence dynamique par comptage de photons et la technique de microscopie confocale. La mise au point de ce dispositif expérimental est liée au grand nombre de contraintes inhérentes aux différentes techniques regroupées, ainsi qu'à l'objet d'étude et aux types de mesures que nous voulons réaliser. La sensibilité, la résolution spatiale de la détection ainsi que la précision des déplacements de l'échantillon sont essentiels à sa réalisation. L'information de polarisation de fluorescence doit être rigoureusement conservée pour permettre des mesures de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence résolues dans le temps. L'ensemble de ces exigences doit être intégré aux contraintes qu'imposent les mesures d'adsorption sous flux.

Les études d'anisotropie de fluorescence présentent également un certain nombre de contraintes liées à l'objet d'étude qu'est la protéine. Généralement, la fluorescence intrinsèque des protéines, ou les marquages classiquement utilisés, rendent peu compte du mouvement de la protéine. Afin de faciliter les analyses d'anisotropie, il est nécessaire d'utiliser une protéine de géométrie sphérique qui soit très fluorescente. De plus, afin d'éviter des phénomènes de dénaturation, la protéine devra avoir une structure globulaire bien définie et être stable. L'utilisation du mode confocal nécessite, quant à elle, l'utilisation de protéines peu photosensibles en raison de la forte densité d'énergie dans la zone d'illumination. Ainsi en

parallèle au développement du dispositif confocal, nous avons choisi comme protéine modèle l'avidine et mis au point un marquage fluorescent permettant de rendre compte au mieux de son mouvement. Nous avons étudié toutes les propriétés photophysiques de ce marquage.

Ce travail faisant appel à plusieurs domaines, le premier chapitre a pour objectif de donner les définitions et d'apporter les bases théoriques utiles au développement de ce projet de recherche. Le second chapitre décrit les techniques d'études déjà développées au laboratoire pour étudier et caractériser les phénomènes d'adsorption de protéines aux interfaces. Le troisième chapitre décrit le marquage de la protéine modèle et présente les résultats de son étude spectroscopique. La mise en place du système confocal ainsi que les protocoles expérimentaux mis au point pour les études de profils de concentration sont décrits dans le quatrième chapitre. Le chapitre suivant présente les premières études de profil de concentration et de dynamique moléculaire de la protéine modèle. Ces études ont été réalisées, d'une part sur et au voisinage d'une surface de mica fraîchement clivée, d'autre part dans et au voisinage d'une membrane classiquement utilisée en hémodialyse.

Enfin, le manuscrit se termine par une discussion générale. Les limites du dispositif d'étude développé ainsi que les modifications nécessaires à son amélioration y sont discutées.

Liste des abréviations

- A-B4al : Avidine biotine éthylènediamine alexa fluor 594
- A-B7al : Avidine biocytine alexa fluor 594
- AFM: Microscopie à force atomique
- Alexa : alexa fluor 594
- B4al : biotine éthylènediamine alexa fluor 594
- BSA: Albumine de serum bovin
- FRET : Fluorescence par transfert d'énergie résonnant
- GFP : Green fluorescent protein
- MCA : analyseur multicanaux
- PHA : Pulse Height Analyser
- PM : Photomultiplicateur
- RSA : Modèle d'adsorption séquentielle aléatoire
- TAC: time-to-amplitude converter
- TCSPC : La technique de comptage de photons uniques corrélés en temps
- TIRF: Fluorescence total par réflexion induite
- TTS : Transit Time Spread

Chapitre I. Partie théorique

Le travail réalisé au cours de cette thèse fait appel à des connaissances extrêmement diverses. Aussi, ce premier chapitre a pour objectif de restituer un certain nombre de notions fondamentales à la compréhension des chapitres suivants.

Ce chapitre comporte cinq parties. La première traite de la fluorescence et de ses propriétés. Elle introduit les principales définitions et équations qui seront utilisées par la suite pour le traitement des données. La seconde partie, porte sur le traitement mathématique de l'optique gaussienne spécifique aux sources lasers. Ici sont décrits des éléments essentiels pour comprendre comment a été réalisé le dispositif confocal que nous avons développé. Les relations introduites dans cette partie nous serviront notamment à estimer le volume excité et à évaluer le profil de l'irradiance selon l'axe d'excitation. Le principe, l'utilisation et les avantages de la microscopie confocale sont exposés dans la troisième partie. Les protéines et leurs propriétés sont décrites ensuite. Enfin, sont définis succinctement les principes et les modèles décrivant les mécanismes d'adsorption des protéines aux interfaces, avec les principales méthodes d'études.

1. La Fluorescence

Le phénomène d'absorption d'une onde électromagnétique par une molécule est soumis aux règles de la mécanique quantique. Pour qu'un photon d'énergie $h\nu$ soit absorbé, il faut que cette énergie corresponde au minimum à la différence énergétique entre le niveau électronique de plus basse énergie et un des niveaux électroniques excités de plus haute énergie. De plus, pour que cette transition soit possible, il est nécessaire que la multiplicité des états soit compatible à savoir une transition de type singulet – singulet ($S_0 \rightarrow S_n$). Après excitation la molécule se désactive selon deux classes de processus : radiatifs et non radiatifs.

- **Les processus non radiatifs** correspondent aux mécanismes de relaxation non associés à une émission de photon : relaxation vibrationnelle, conversion inter-système singulet – triplet, transfert d'électron, séparation de charges, réaction chimique...
- **Les processus radiatifs** correspondent au retour vers le niveau électronique fondamental par émission d'un photon d'énergie égale à la différence d'énergie entre les niveaux (du niveau excité vers le niveau fondamental après qu'il ait relaxé par vibration).

Le mécanisme de fluorescence est un processus radiatif ; il correspond au retour vers le niveau fondamental S_0 à partir du niveau excité de même multiplicité S_1 . Le mécanisme de phosphorescence correspond, quant à lui, au retour vers le niveau fondamental à partir de l'état triplet T_1 . Ces phénomènes sont illustrés par le diagramme de Jablonski [1] de la Figure 2. Les transitions électroniques entre niveaux de multiplicités différentes sont interdites par les règles de la mécanique quantique, ce qui signifie qu'expérimentalement elles sont très peu accessibles. Ceci a pour conséquence que les phénomènes de fluorescence sont des mécanismes rapides (quelques picosecondes à quelques nanosecondes), tandis que la phosphorescence est un phénomène beaucoup plus lent, (en général de l'ordre de la microseconde à la milliseconde). Les processus de fluorescence à partir de niveaux électroniques autres que S_1 (premier niveau électronique excité) sont extrêmement rares et donc de faible intensité. Si la molécule est excitée à un niveau électronique supérieur, elle relaxe généralement par mode vibrationnel pour atteindre le niveau S_1 .

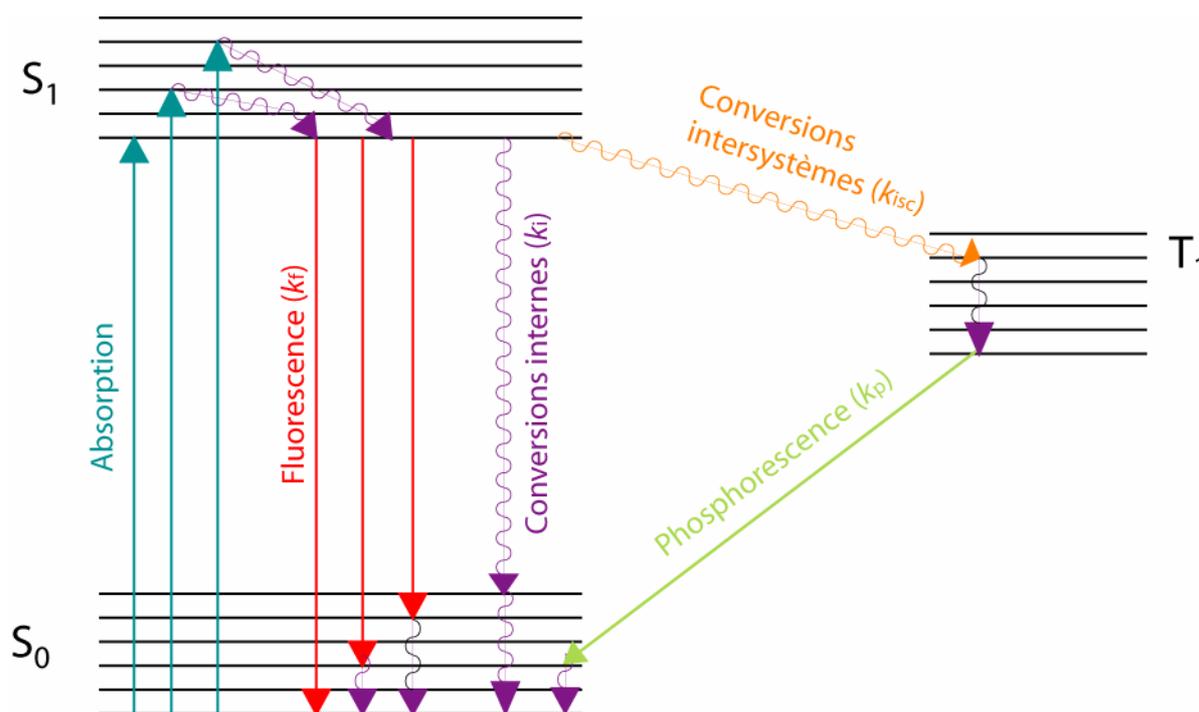
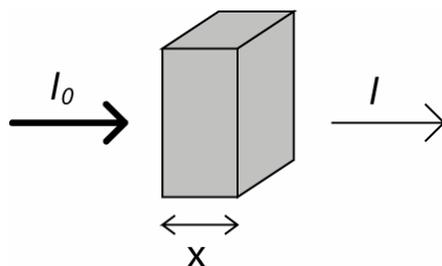


Figure 2 : Diagramme de Jablonski

1.1. Spectres d'absorbance, d'excitation et d'émission de fluorescence.

Une molécule fluorescente se caractérise notamment par ses spectres d'absorbance, d'excitation et d'émission.

Le spectre d'absorbance résulte du passage d'un électron du niveau fondamental de plus basse énergie vers un des niveaux électroniques supérieurs (transition verticale). Les électrons se distribuent sur les différents niveaux de vibrations des états électroniques excités de la molécule selon l'énergie de la radiation induisant la transition. Pour chaque longueur d'onde associée au photon absorbé, il est possible de définir une probabilité de transition électronique. A partir de celle-ci est définie une constante, le coefficient d'extinction molaire ϵ_λ , qui permet de relier l'énergie absorbée au nombre de molécules excitées (loi de Beer-Lambert). Ainsi, pour une longueur d'onde donnée, il est possible de mesurer l'absorbance A ; celle-ci varie linéairement avec la concentration C suivant l'équation :



$$A_{(\lambda)} = \log_{10} \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon_{\lambda} C x$$

Équation 1 : Loi de Beer-Lambert

avec :

- I_0 l'intensité de la lumière incidente,
- I l'intensité de la lumière transmise,
- C la concentration de la molécule absorbante,
- ε_{λ} coefficient d'extinction molaire,
- x la longueur du trajet optique parcouru par la lumière dans la solution.

Le spectre d'émission de fluorescence (Figure 3) rend compte du nombre de photons émis par un fluorophore aux différentes longueurs d'onde d'observation. Ces longueurs d'onde correspondent aux transitions électroniques de l'état S_1 de plus basse énergie vers les différents niveaux de vibration de l'état fondamental S_0 . En solution, les molécules du solvant se réorganisent autour de la molécule excitée. Ainsi, l'état S_1 est généralement de plus basse énergie lorsqu'il est occupé par un électron. Le décalage, entre le maximum d'émission et le maximum d'absorbance, est appelé déplacement de Stokes [2]. Le spectre d'émission de fluorescence (1', 2', 3', 4' Figure 3) sera le symétrique du spectre d'absorbance (1, 2, 3, 4, Figure 3) par rapport au point de croisement entre les spectres d'absorbance et d'émission (transition 0-0), lequel correspond à la différence d'énergie entre les niveaux vibrationnels de plus basse énergie des états S_0 et S_1 .

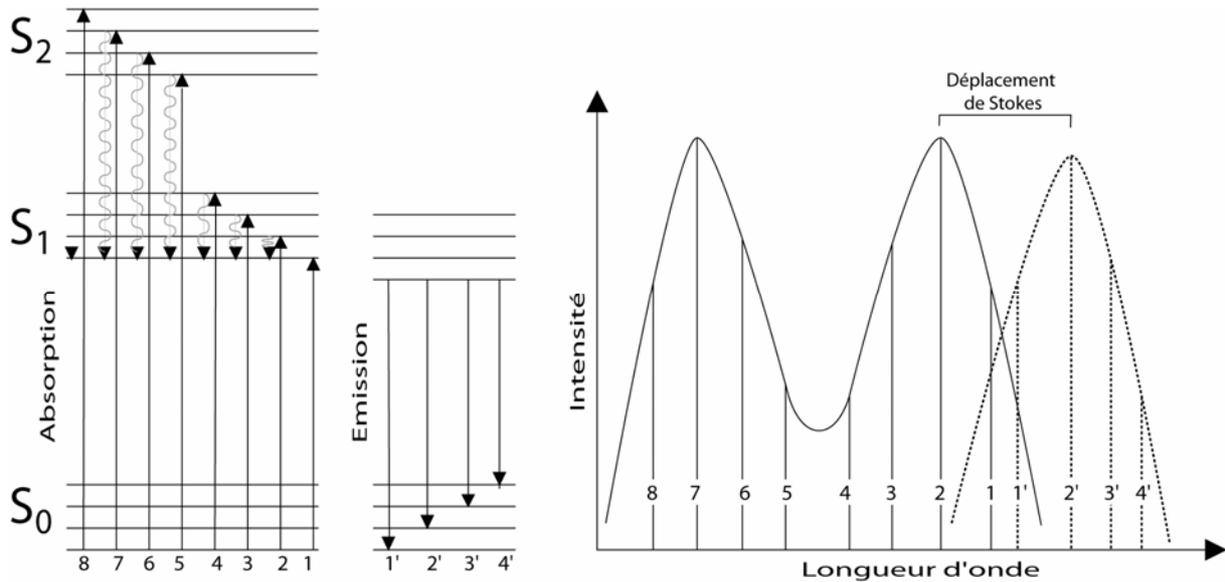


Figure 3 : Relation entre les niveaux électroniques et les spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence.

Le **spectre d'excitation** de fluorescence est obtenu par la mesure du nombre de photon émis à une longueur d'onde choisie dans le spectre d'émission (de préférence au maximum d'émission) lorsqu'on fait varier la longueur d'onde d'excitation. Ce spectre est généralement symétrique du spectre d'absorbance de la molécule fluorescente dans le cas de molécules simples (un seul chromophore dans la molécule) et en l'absence de processus photochimique à l'état excité.

1.2. Rendement quantique et durée de vie de fluorescence

Si n_1 est le nombre de molécules d'état excité S_1 , on peut écrire à partir du diagramme de Jablonski (Figure 2) :

$$\frac{-dn_1}{dt} = [k_f + k_{ic} + k_{isc}]n_1$$

Équation 2

avec :

- k_f la constante de vitesse de relaxation par fluorescence,
- k_{ic} la constante de vitesse de relaxation par conversion interne,
- k_{isc} la constante de vitesse de relaxation par conversion inter-système.

Cette équation a pour solution :

$$n_1(t) = n_1(0)e^{\frac{-t}{\tau_F}}$$

Équation 3

avec :

- $n_1(0)$ le nombre de molécules dans l'état excité à l'instant $t=0$,
- et $\tau_F = \frac{1}{[k_F + k_{ic} + k_{isc}]}$.

La constante de temps associée à l'exponentielle, τ_F , caractérise la durée de vie de l'état excité. Pour une molécule fluorescente, l'évolution du nombre de photons émis dans le temps, après excitation, au cours de la relaxation, est proportionnelle au nombre des états excités. La distribution de ces photons dans le temps sera identique à la décroissance exponentielle de la population de l'état excité. Dans ce cas, τ_F correspond à la durée de vie de fluorescence de l'état excité.

Le rendement quantique de fluorescence ϕ_F rend compte de la compétition entre les différentes voies de relaxation d'une molécule excitée. Il est défini par le rapport entre l'énergie re-émise par fluorescence et l'énergie totale absorbée, soit encore, par le rapport entre la constante de désactivation k_F et la somme des constantes de tous les processus de relaxation.

$$\phi_F = \frac{k_F}{[k_F + k_{ic} + k_{isc}]}$$

Équation 4

ou encore,

$$\phi_F = \tau_F k_F$$

Équation 5

Tout processus qui modifie la durée de vie τ_F de l'état excité modifiera le rendement quantique de fluorescence de la molécule.

Il est possible de définir l'intensité de fluorescence idéale I_F pour laquelle ne sont pas prises en compte les pertes provoquées par les phénomènes de réabsorption de la radiation émise.

$$I_F = I_0 \omega \frac{\Omega}{4\pi} A_T \phi_F$$

Équation 6

avec

- I_0 le flux radiant incident sur la surface de l'échantillon,
- ω le rayon du faisceau de la radiation incidente,
- Ω l'angle solide de collection de la fluorescence mesurée,
- A_T le facteur d'absorption totale.

Pour des absorbances faibles, A_T , et donc I_F est proportionnel à la concentration de l'échantillon.

1.3. Polarisation de fluorescence

Un fluorophore soumis à une lumière polarisée absorbe préférentiellement les ondes dont le vecteur de polarisation est parallèle à son moment de transition dipolaire d'absorption. Ainsi lorsqu'une molécule fluorescente est soumise à une radiation polarisée, il s'effectue une photosélection ; la répartition des états excités est anisotrope et de ce fait l'émission de fluorescence également. Suite au mouvement Brownien des molécules en solution, le système retourne progressivement vers un état d'émission isotrope (Figure 4).

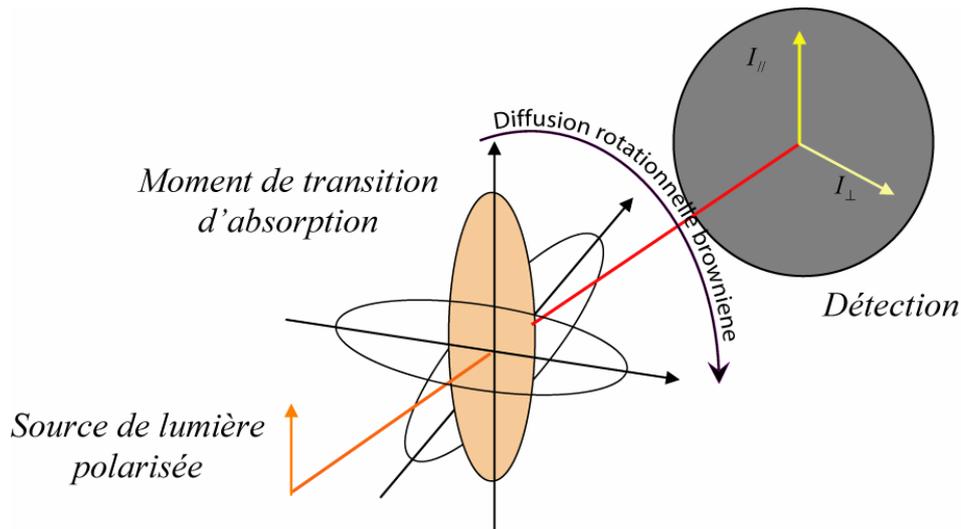


Figure 4 : Effet de la diffusion rotationnelle sur la polarisation de la lumière

Si l'on observe l'émission de fluorescence à travers un polariseur, il est possible de mesurer la quantité de molécules orientées suivant l'axe du polariseur. Une mesure de polarisation de fluorescence consiste à exciter une molécule par une lumière polarisée et à observer l'émission suivant les axes parallèle et perpendiculaire à la direction de polarisation de l'excitation.

Le degré de polarisation P et l'anisotropie r d'une molécule fluorescente sont définis par les équations suivantes :

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Équation 7

et

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Équation 8

où

- I_{\parallel} est l'intensité de fluorescence mesurée suivant l'axe parallèle à celui de la polarisation de l'excitation,
- I_{\perp} est l'intensité de fluorescence mesurée suivant l'axe perpendiculaire à celui de la polarisation de l'excitation.

La valeur de ces rapports est intimement liée à la vitesse de réorientation des molécules dans la solution. L'évolution dans le temps de l'intensité de fluorescence selon un axe défini de polarisation, résultera de deux mécanismes distincts : d'une part de la disparition de l'état excité par relaxation et, d'autre part, de la réorientation du vecteur de polarisation d'émission par rotation de la molécule. Pour les deux orientations d'observation, parallèle et perpendiculaire, les intensités d'émission sont données par les expressions suivantes :

$$I_{\parallel}(t) = \left[\frac{1}{3} + \frac{4}{15} e^{\frac{-t}{\theta_r}} \frac{3 \cos^2 \xi - 1}{2} \right] e^{\frac{-t}{\tau_F}}$$

$$I_{\perp}(t) = \left[\frac{1}{3} - \frac{2}{15} e^{\frac{-t}{\theta_r}} \frac{3 \cos^2 \xi - 1}{2} \right] e^{\frac{-t}{\tau_F}}$$

Équation 9

avec :

- θ_r le temps de corrélation rotationnel de la molécule en solution,
- ξ l'angle que font les moments de transition dipolaire, d'absorption et d'émission du chromophore.

Soit, à partir des équations 8 et 9 l'anisotropie r en fonction du temps :

$$r(t) = \frac{2}{5} e^{\frac{-t}{\theta_r}} \left(\frac{3 \cos^2 \xi - 1}{2} \right)$$

Équation 10

On définit r_0 la polarisabilité maximale que peut avoir la molécule :

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \xi - 1}{2} \right)$$

Équation 11

L'Équation 10 devient alors :

$$r(t) = r_0 e^{\frac{-t}{\theta_r}}$$

Équation 12

r_0 est une propriété intrinsèque de la molécule, elle est liée directement à la valeur de ξ . Si les moments de transition d'absorption et d'émission sont parallèles ($\xi = 0^\circ$) ou perpendiculaires ($\xi = 90^\circ$), les valeurs limites respectives de r_0 sont alors 0,4 et -0,2.

La mesure du temps de corrélation permet d'accéder au coefficient de diffusion rotationnel D_{rot} de la molécule.

$$D_{rot} = \frac{1}{6\theta_r}$$

Équation 13

Dans le cas d'une sphère, ce coefficient D_{rot} est obtenu par la relation suivante :

$$D_{rot} = \frac{k_B T}{8\pi\eta r^3}$$

Équation 14

avec :

- T la température,
- η la viscosité du milieu,
- r le rayon de la sphère
- k_B la constante de Boltzman.

De ce fait, le temps de corrélation d'une molécule peut être relié à la viscosité et à la température de la solution selon la relation suivante :

$$\theta_r = \frac{\eta V}{k_B T}$$

Équation 15 : loi de Stokes-Einstein [3]

avec : V le volume hydrodynamique moléculaire.

Dans les cas plus complexes où le chromophore ne peut être assimilé à une sphère, on peut définir plusieurs axes de rotation ; l'expression de $r(t)$ devient :

$$r(t) = r_0 \sum \beta_i e^{\frac{-t}{\theta_{r,i}}}$$

Équation 16

Les paramètres β_i représentent les fractions des pertes de polarisation suivant chacun des axes de rotation. Les θ_i sont les temps de corrélation rotationnels associés à chacun de ces axes. Le nombre de temps de corrélation est lié à la géométrie de la molécule émettrice. Dans le cas des macromolécules telles que les protéines, si ces dernières sont assimilables à des sphères, elle aura une infinité d'axe de rotations équivalents. On observera, dans ce cas, un seul temps de corrélation. Dans le cas d'une protéine en forme d'ellipsoïde, les temps de corrélation seront multiples. Cette propriété permet, par exemple, de mettre en évidence des changements de conformation de protéine [4, 5]. De même, dans le cas d'un chromophore fixé à une macromolécule, l'anisotropie globale observée pourra être décomposée selon deux contributions correspondant à la rotation du chromophore et à la rotation de la macromolécule.

L'analyse du temps de corrélation est soumise à des contraintes liées à la durée de vie de fluorescence et à la taille de la molécule. Si l'on veut être capable d'observer une dépolarisation, il faut que durant l'émission la molécule se réoriente de façon significative. Si le mouvement est trop lent, la fluorescence se désactivera totalement avant que la molécule ne se réoriente ; en revanche, si le mouvement est trop rapide, la dépolarisation sera immédiate et le milieu apparaîtra comme s'il était isotrope. On peut obtenir, pour les protéines, une approximation du temps de corrélation rotationnel à partir de sa masse molaire M . En prenant pour hypothèse que le volume hydraté spécifique d'une protéine est de l'ordre $1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (valeur couramment obtenue pour une protéine), et dans des conditions expérimentales classiques ($T=20^\circ\text{C}$ et $\eta=0,98 \text{ Pa}\cdot\text{cm}^2$) [6], l'Équation 15 devient :

$$\theta_r \text{ (ns)} = 0,42 \times 10^{-3} M \text{ (g mol}^{-1}\text{)}$$

Équation 17

En 1979, Ph. Wahl avait montré que la fenêtre temporelle pour laquelle il était possible de déterminer le temps de corrélation devait se situer dans la gamme $0,1\tau_F < \theta_r < 10\tau_F$ [7]. Depuis, eu égard au développement des méthodes de calcul et à la création de nouveaux modèles théoriques, il est possible de déterminer des temps de corrélation jusqu'à 25 fois plus longs que la durée de vie de fluorescence [8].

1.4. Effet de l'environnement local sur la fluorescence

Les propriétés de fluorescence d'une molécule excitée dépendent étroitement de son micro-environnement. La fluorescence étant liée aux caractéristiques des niveaux électroniques de la molécule, toute interaction physique qui influera sur les transitions électroniques aura un effet sur celles-ci : variation du pH [9], de la polarité du solvant [10], ou d'interactions intermoléculaires [11]. Du point de vue de l'anisotropie, d'autres paramètres tels que la viscosité [12] et la température auront également une influence. Ces propriétés font de la fluorescence une technique de choix en biologie pour l'étude des structures [13] et pour la compréhension des mécanismes au niveau cellulaire [14]. La mesure du temps de corrélation est utilisée pour déterminer par exemple la viscosité intracellulaire [15]. Les techniques de fluorescence sont aussi utilisées en chimie pour étudier le confinement des chromophores dans des structures poreuses [16] et comprendre les interactions entre molécules [17, 18].

1.5. Extinction de fluorescence

On utilise le terme « extinction de fluorescence » ou « *quenching* » pour tous les phénomènes tendant à diminuer l'intensité de fluorescence. Cette extinction peut avoir plusieurs origines [19]. Elle peut être d'ordre :

- **cinétique** (ou dynamique) ; une des constantes de vitesse du modèle cinétique de relaxation de l'état excité (Figure 2) est modifiée, ou encore une voie supplémentaire de désactivation apparaît (séparation de charges par exemple). Dans ce cas, le rendement quantique de fluorescence et la durée de vie de fluorescence diminuent. Ce phénomène est observé, par exemple, pour certains fluorophores mis en contact avec une molécule comme l'oxygène [20]. Ici, le *quenching* est fonction de la probabilité de collision entre l'oxygène et le

fluorophore. Un autre exemple est le transfert d'énergie de fluorescence non radiatif. Ce processus est couramment utilisé pour des études en FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert).

- **non cinétique** (ou statique) ; l'extinction de fluorescence résulte d'une diminution du nombre de molécules émettrices. Ceci se traduit expérimentalement par une diminution du rendement quantique de fluorescence, mais les constantes cinétiques de relaxation de l'état excité ne sont pas modifiées. Dans ce cas, la durée de vie de fluorescence reste inchangée. Ce phénomène est observé lors de la formation d'un complexe non fluorescent [21], comme par exemple, entre une molécule de tryptophane et certains dérivés de rhodamine ou de fluorescéine [22].

La photodégradation de l'échantillon, ou encore sa photosaturation, ont également pour conséquence la diminution de la fluorescence observée. Toutefois, ces phénomènes ne peuvent pas être considérés comme une véritable extinction de fluorescence.

1.6. Conclusion

Les études de fluorescence présentent l'avantage d'être très sensibles ; elles permettent d'effectuer des expériences à des concentrations faibles de l'ordre du nanomolaire. Les propriétés de fluorescence d'une molécule varient avec le milieu (polarité, pH, viscosité...) ; leurs modifications peuvent traduire des changements de conformation, des interactions intra ou extra moléculaires. La polarisation de fluorescence permet, outre d'étudier le mouvement de rotation d'une molécule, d'observer des modifications de structure comme dans le cas d'une protéine.

2. Optique gaussienne

Dans la plupart des applications qui nécessitent de focaliser, de modifier la forme, la distribution d'énergie d'un faisceau laser, l'approximation du profil gaussien de l'intensité est utilisée. Cette approximation, qui s'applique au mode théorique TEM₀₀, permet à partir d'un certain nombre de relations de calculer la transformation d'un faisceau laser par des éléments d'optique.

Les lasers qui sont utilisés aujourd'hui ne sont pas rigoureusement gaussiens. Toutefois, cette déviation reste souvent suffisamment faible pour pouvoir appliquer les principes de l'optique gaussienne. Du fait que l'émission laser est une onde cohérente, le front d'onde apparaît comme émis à partir de la même origine. C'est cette propriété qui fait dire souvent que les lasers sont des sources ponctuelles. Contrairement aux sources incohérentes les lasers peuvent être focalisés avec une très grande précision.

Dans le mode TEM₀₀ la lumière émise par le laser est une onde parfaitement plane avec un profil d'irradiance transverse gaussien (Figure 5).

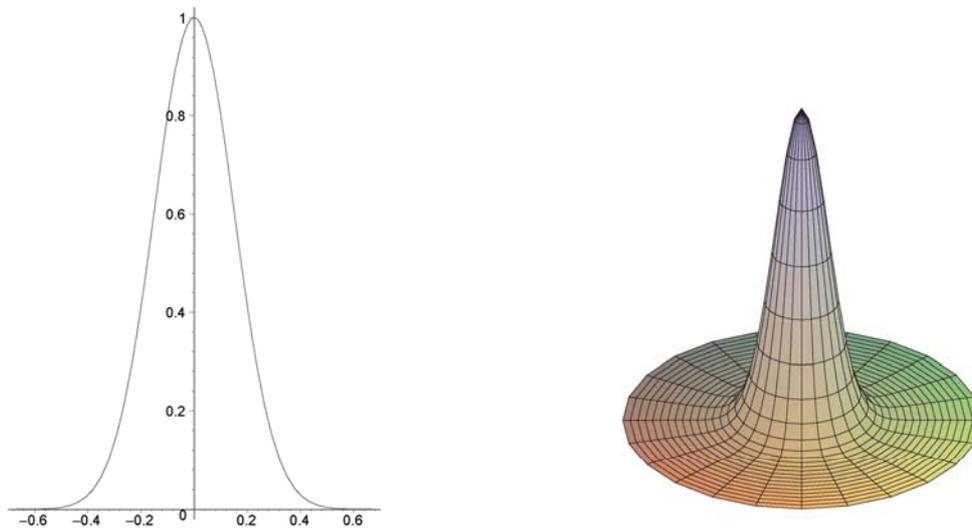


Figure 5 : Irradiance transverse d'un faisceau gaussien

Afin de décrire la propagation du faisceau lumineux il est nécessaire de définir son diamètre d'une façon ou d'une autre. Communément la définition adoptée est celle du diamètre pour lequel l'intensité dans le faisceau tombe à $1/e^2$ (13.5%) de l'énergie au pic.

Du fait des phénomènes de diffraction, il est impossible de garder un faisceau laser parfaitement collimaté ; toutefois cette déviation est suffisamment faible et son accord tellement bon avec la théorie qu'il est possible de décrire avec une très grande précision le résultat de cette dispersion. Même si le front d'onde émis à l'origine par la source est rigoureusement plan, celui-ci va rapidement acquérir une courbure. Ce phénomène est parfaitement décrit par les équations suivantes :

$$R(z) = z \left[1 + \left(\frac{\pi w_0^2}{\lambda z} \right)^2 \right]$$

$$w(z) = w_0 \left[1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2} \right)^2 \right]^{1/2}$$

Équation 18

avec,

- z la distance de propagation de l'onde,
- λ la longueur d'onde du laser,
- w_0 le rayon à $1/e^2$ à $z=0$, là où l'onde est plane,
- $R(z)$ est le rayon de courbure de l'onde à la distance z ,
- $w(z)$ le rayon à $1/e^2$ à la distance z .

Pour de grandes distances, alors $w(z)$ tend vers une valeur asymptotique :

$$w(z) \cong \frac{\lambda z}{\pi w_0}$$

Équation 19

La distribution d'énergie dans le faisceau à la distance z est obtenue suivant l'équation :

$$I(r) = I_0 e^{-2r^2/w^2} = \frac{2P}{\pi w^2} e^{-2r^2/w^2}$$

Équation 20

où, $w = w(z)$ et P représente l'énergie totale dans le faisceau, identique pour toute valeur de z .

La transformation que subit un faisceau laser par une lentille est relativement complexe. Deux cas peuvent être distingués : le cas d'un faisceau « parallèle » entrant et le cas d'une source ponctuelle collectée par la lentille. Le résultat des calculs montre que les relations obtenues pour chacun de ces cas peuvent être réduites à une seule expression :

$$w = \frac{\lambda f}{\pi w_0}$$

Équation 21

où f représente la focale de la lentille et w le rayon du point de focalisation.

La taille du point de focalisation dans le cas d'une lentille utilisée à la limite de diffraction dépend du type d'illumination. Si celle-ci est uniforme, la distribution d'énergie du point de focalisation suivra un profil de disque d'Airy et le diamètre de focalisation pourra être calculé selon la relation :

$$d_{zero} = 2,44 \lambda f / \#$$

Équation 22

En revanche, si l'illumination se fait selon un profil gaussien, l'expression du diamètre de focalisation devient :

$$d = K \cdot \lambda \cdot f / \#$$

Équation 23

où,

- K est une constante déterminée à partir du rapport de troncature T , calculé comme le rapport du diamètre du faisceau gaussien à $1/e^2$ et celui limité par la lentille,
- λ la longueur d'onde du laser,
- $f/\#$ le rapport entre la focale et le diamètre de troncature de la lentille.

L'énergie perdue du fait de la troncature introduite par la lentille ou tout autre élément qui réduit le diamètre du faisceau peut être calculée selon la relation :

$$P_l = e^{(-2/T)^2}$$

Équation 24

Si le rapport de troncature $T = 2$, le calcul montre que la perte en énergie est de 60% contre 13.5% pour $T = 1$; dans le même temps, l'augmentation du diamètre du point de focalisation calculé à partir de la relation (Équation 23) n'est que de 8%.

Expérimentalement, le rapport de troncature T est fixé selon la priorité que l'on accorde à l'énergie ou au diamètre de focalisation.

A partir des équations précédentes il apparaît immédiatement que le point focal sera d'autant plus petit que, le faisceau entrant sera de diamètre important, que la focale de la lentille sera courte et le rapport de troncature adapté pour limiter l'effet de la diffraction. On retrouve ici les conditions idéales de la microscopie confocale, où la résolution latérale est directement reliée à l'ouverture numérique NA de l'objectif. De fait NA et $f/\#$ sont reliés selon la relation :

$$NA = \frac{1}{2f/\#}$$

Équation 25

Si on néglige l'effet de courbure du front onde, la distribution de l'énergie au point de focalisation peut être calculée à partir de l'expression de l'irradiance pour toutes positions de z . Au maximum de la gaussienne, l'énergie sera :

$$I_{r=0} = \frac{2P}{\pi w^2}$$

Équation 26

soit en exprimant w :

$$I_{r=0}(z) = \frac{2P}{\pi w_0^2 \left[1 + \left(\lambda z / \pi w_0^2 \right)^2 \right]}$$

Équation 27

ou encore,

$$I_{r=0}(z) = \frac{\alpha w_0^2}{w_0^4 + \beta z^2}$$

Équation 28

avec, $\alpha = \frac{2P}{\pi}$ et $\beta = \left(\frac{\lambda}{\pi} \right)^2$.

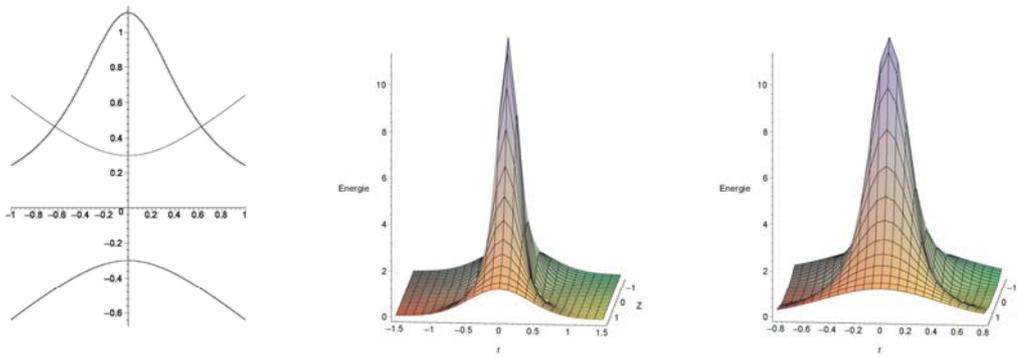


Figure 6 : Représentation du profil de distribution de l'énergie selon l'axe Z et le plan XY

La représentation de la Figure 6 montre que le profil de la distribution de l'énergie selon l'axe z est plus large que celle dans le plan XY.

Il est possible d'exprimer la demi largeur à mi-hauteur W_z de la distribution en Z à partir du diamètre du faisceau laser au point de focalisation w_0 en $z=0$.

$$W_z = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$$

Équation 29

L'expression de l'énergie selon l'axe Z s'écrit alors :

$$I_{r=0}(z) = \frac{2P}{\lambda} \left(\frac{W_z}{W_z^2 + z^2} \right)$$

Équation 30

A partir des Équation 28 et 30, il est possible d'ajuster le profil d'énergie enregistré selon l'axe z . Ceci est représenté sur la Figure 7.

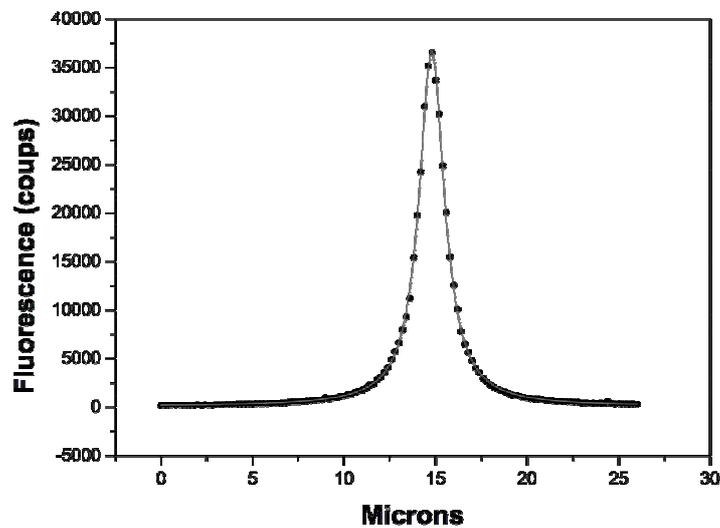


Figure 7 : Profil de fluorescence de protéines adsorbées sur une surface de verre. Ajustement par régression non linéaire à partir de l'expression 30.

A partir des équations 18 et 20 il est possible d'exprimer le rayon r_{iso} pour lequel l'énergie dans le profil reste constante en fonction de z .

En posant :

$$Z = 1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2} \right)^2$$

Équation 31

on obtient :

$$r_{iso} = \sqrt{r^2 Z - \frac{w_0^2 Z \log_{10} Z}{2}}$$

Équation 32

La Figure 8, représente l'évolution de r_{iso} pour trois longueurs d'ondes ; les diamètres des faisceaux ont été calculés à partir de l'équation 22, dans les limites de la diffraction pour un objectif de $NA=1,2$.

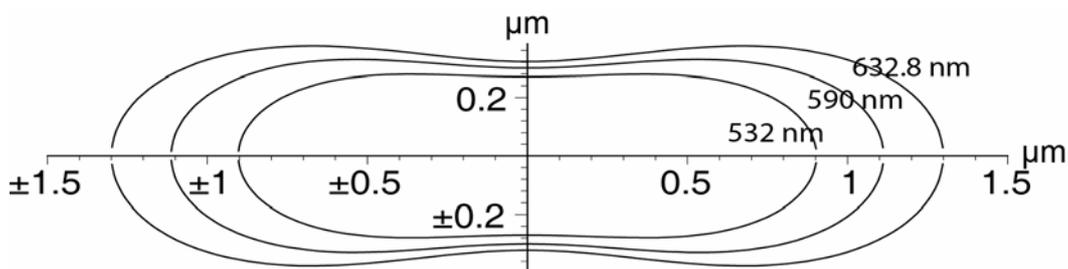


Figure 8 : Courbes d'iso-énergie selon l'axe z, calculées pour un objectif de $NA=1.2$ utilisé à la limite de diffraction (équation 22), à 532 nm, $w_0 = 0,270$, à 590 nm, $w_0 = 0,300$ et 632.8 nm, $w_0 = 0,322$.

A partir de l'Équation 32, il est possible de calculer le volume pour lequel l'énergie du faisceau pour un r donné est identique quelque soit z. Si on prend $r = w_0$, on a alors le volume qui correspond à l'énergie au *beam waist*, soit à 86,5% de l'énergie totale. Dans ces conditions on obtient :

$$\lambda = 532 \text{ nm}, \quad w_0 = 0,270 \text{ nm}, \quad \text{volume} = 0,529 \mu\text{m}^3, \quad W_z = 0,430 \text{ nm}$$

$$\lambda = 590 \text{ nm}, \quad w_0 = 0,300 \text{ nm}, \quad \text{volume} = 0,727 \mu\text{m}^3, \quad W_z = 0,479 \text{ nm}$$

$$\lambda = 632,8 \text{ nm}, \quad w_0 = 0,322 \text{ nm}, \quad \text{volume} = 0,900 \mu\text{m}^3, \quad W_z = 0,515 \text{ nm}$$

Ces calculs mettent en évidence l'évolution rapide du volume excité en fonction de la longueur d'onde du laser, donc du w_0 . Par exemple, une augmentation de 10% du w_0 dans le cas du laser HeNe (632.8 m), fait passer le volume excité de $0,900 \mu\text{m}^3$ à $1,32 \mu\text{m}^3$, soit une augmentation de l'ordre de 50%.

3. La microscopie confocale.

Les méthodes d'analyse de la fluorescence, couplées aux techniques de microscopie, sont des moyens d'étude très puissants couramment utilisés en biologie [23]. Les techniques de fluorescence présentent deux intérêts majeurs. Le premier est l'observation de particule ou structure métabolique par marquage direct [23]. Le second est l'utilisation des processus de révélation ou d'extinction de fluorescence pour mettre en évidence des processus biologiques [21, 24].

Le principe de la microscopie confocale a été proposé par Minsky en 1957 [25, 26]. Le terme de confocal fut utilisé pour la première fois par Brakenhoff en 1979 [27] pour décrire un microscope dont les faisceaux d'excitation et d'émission étaient focalisés à la limite de la diffraction sur un filtre spatial. Ce n'est qu'en 1980 que les premiers microscopes confocaux furent utilisés expérimentalement, suite notamment au développement de sources laser plus adaptées ainsi qu'aux progrès de l'électronique et de l'informatique des appareillages. En 1985, les premiers résultats convaincants pour les biologistes furent publiés [28]. Les premiers modèles commerciaux d'appareillages apparurent quant à eux en 1987 [29] ; depuis lors le microscope confocal s'est imposé comme un outil incontournable en biologie.

3.1. Principe du microscope confocal

Dans le cas des microscopes à fluorescence classique (Figure 9 a), la source lumineuse est placée sous l'échantillon. Son utilisation est alors limitée à l'étude d'échantillons très fins.

Afin de pouvoir observer des échantillons plus épais, le faisceau d'excitation doit arriver au dessus de l'échantillon. Ceci est réalisé si l'excitation se fait au travers de l'objectif du microscope. La séparation entre les longueurs d'ondes du faisceau d'excitation et d'émission s'effectue grâce à un filtre dichroïque. Ce principe est celui du microscope à épifluorescence (Figure 9 b). Le principal inconvénient de ce dispositif optique est que le rapport signal/bruit est faible.

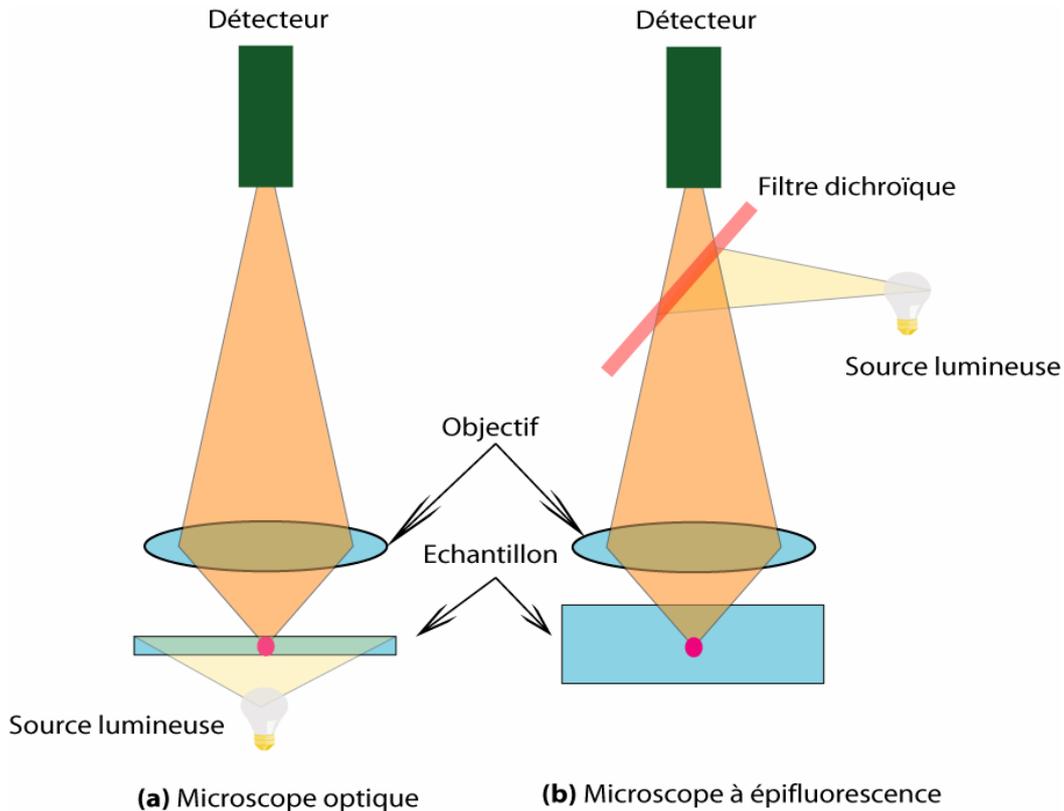


Figure 9 : Comparaison entre le microscope optique et le microscope à épifluorescence

Le microscope confocal (Figure 10) reprend globalement le principe du microscope à épifluorescence. Dans ce cas, la source lumineuse est un laser continu ou impulsionnel. La lumière d'excitation est focalisée sur un premier filtre spatial. Celui-ci a pour fonction de supprimer les fluctuations d'intensité provoquées par les éléments optiques précédant le trou, ainsi que de définir avec précision la position spatiale du point source d'excitation. L'émission de fluorescence de l'échantillon collectée par l'objectif est focalisée sur le trou confocal placé devant le détecteur. Ce dernier aura pour fonction de sélectionner les photons provenant uniquement du plan focal de l'objectif. En effet, toutes les molécules de l'échantillon se trouvant sur le trajet optique du faisceau d'excitation peuvent absorber et émettre des photons. Le nombre de molécules excitées sera plus important dans le plan de focalisation (notamment dans le cas d'une excitation par un faisceau laser gaussien), mais des photons provenant de toute la solution et donnant ainsi un bruit de fond important peuvent néanmoins être collectés. Les photons émis avant et après le plan focal de l'objectif seront arrêtés par le filtre spatial. De ce fait, le dispositif confocal permet par rapport au dispositif à épifluorescence d'améliorer le rapport signal/bruit. Dans le cas d'un faisceau laser gaussien, le point de focalisation de l'objectif peut être décrit approximativement grâce aux équations d'optique gaussienne. Dans des conditions optimales de travail (diamètre de faisceau,

ouverture numérique de l'objectif), le volume d'excitation peut être estimé de l'ordre de $1\mu\text{m}^3$ soit un femtolitre. L'émission de fluorescence est alors spatialement localisée dans l'échantillon. Un dispositif de déplacement fin permet de mesurer l'émission de fluorescence sur différents plans (plan XY) et à différentes profondeurs (Z) de l'échantillon. Ainsi le microscope confocal permet d'obtenir des images remarquables en trois dimensions. Notons toutefois que pour voir un volume aussi petit, la détection de la fluorescence nécessite l'utilisation d'un détecteur de très haute sensibilité et d'un échantillon suffisamment fluorescent. Effectivement, la technique confocale permet d'améliorer la résolution des images par rapport à un microscope classique, mais si une image en microscopie classique est mauvaise, le mode confocal ne la rendra pas meilleure.

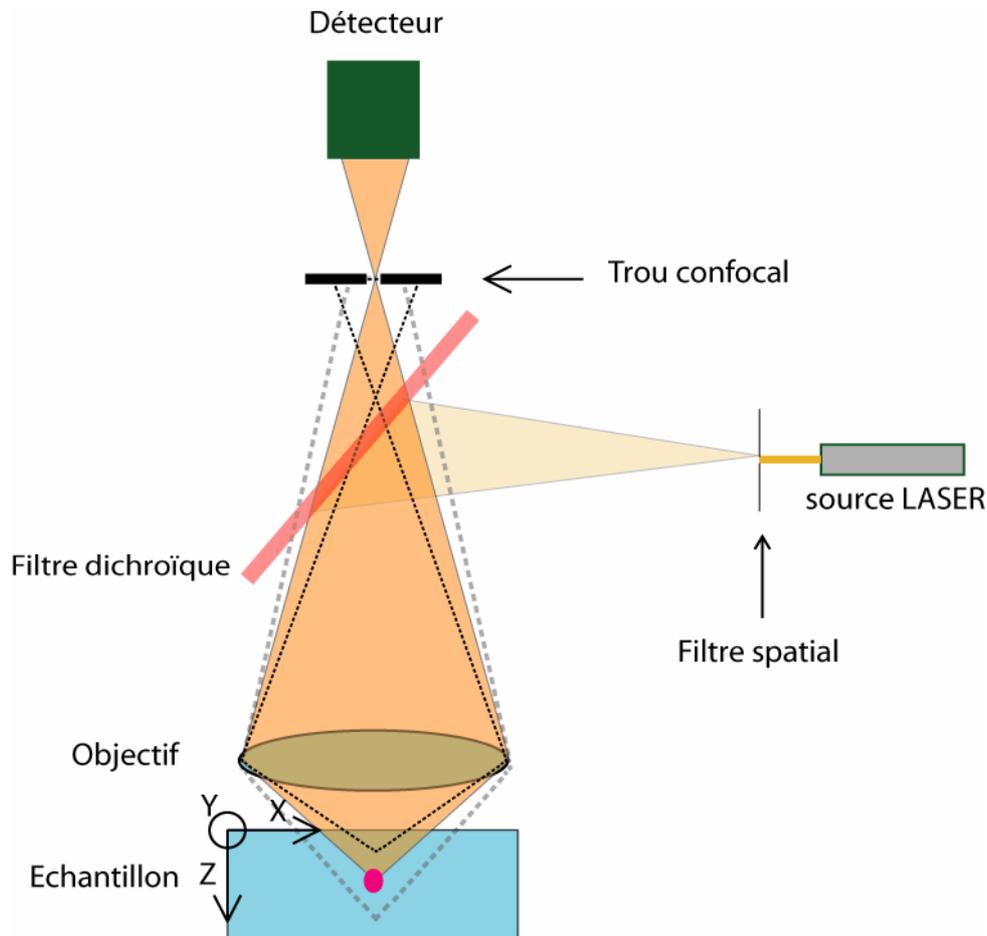


Figure 10 : Le microscope confocal

3.2. Résolution spatiale du microscope confocal

Les performances d'un dispositif optique confocal résident dans sa résolution spatiale. Pour un système optique parfait, la résolution est limitée par l'ouverture numérique des composants optiques et la longueur d'onde du laser d'excitation. Le dispositif confocal permettant d'observer un volume, sa résolution sera définie suivant le plan XY (résolution latérale) et l'axe Z (résolution axiale).

La résolution latérale à la limite de diffraction est donnée par le critère de Rayleigh. Celui-ci pose que deux points sources peuvent être résolus par un système optique, quand le centre du disque d'Airy de l'un recouvre le premier anneau sombre de diffraction de l'autre. Dans ce cas, la plus petite distance résolue correspond au rayon d'Airy :

$$r_{Airy} = 0.61 \frac{\lambda_0}{NA_{obj}}$$

Équation 33

avec :

- r_{Airy} le rayon d'Airy,
- NA_{obj} l'ouverture numérique de l'objectif,
- λ_0 la longueur d'onde du LASER d'excitation.

La résolution axiale z_{min} est donnée, quant à elle, par la relation suivante :

$$z_{min} = \frac{2\lambda_0 n}{(NA_{Obj})^2}$$

Équation 34

avec : n l'indice de réfraction du milieu.

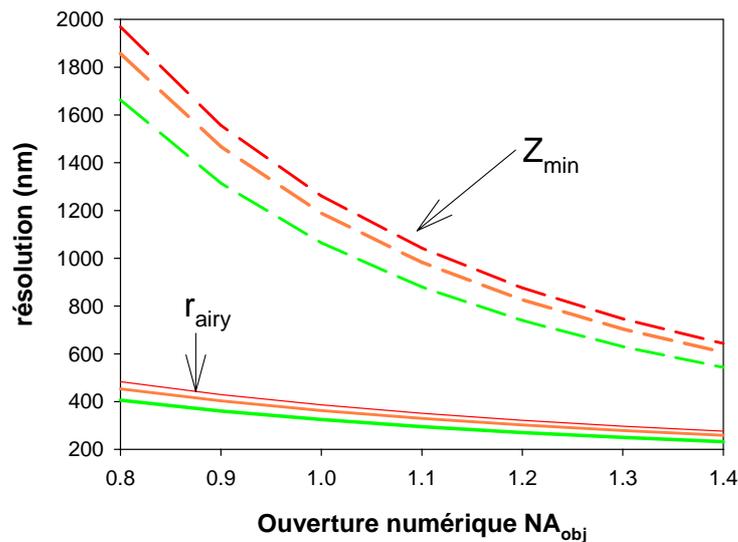


Figure 11 : Résolution latérale XY (ligne) et axiale Z (pointillé) en fonction de l'ouverture numérique pour $\lambda_0 = 532$ (vert), 584 (orange) et 633 (rouge).

On obtient alors pour le rapport entre les résolutions latérale et axiale l'expression suivante :

$$\frac{z_{\min}}{r_{\text{Airy}}} = 3.28 \frac{n}{NA_{\text{obj}}}$$

Équation 35

La résolution spatiale mesurée dépend du filtre spatial de détection. Le diamètre optimal Φ_{\max} de ce dernier doit être au plus égal à la taille de l'image du point de focalisation donnée par l'objectif du point de focalisation, soit :

$$\Phi_{\max} = 2r_{\text{Airy}}G$$

Équation 36

avec : G le grandissement de l'objectif.

Cette configuration permet de détecter la totalité de l'intensité lumineuse provenant du point focal. Si le diamètre du filtre spatial est trop petit, ce dernier diffractera la lumière ; la résolution ne sera pas augmentée, en revanche le nombre de photons détectés sera diminué. S'il est trop grand, il ne joue plus le rôle de filtre spatial et devient inutile. Le diamètre du trou

est sélectionné en fonction du compromis luminosité/résolution que l'on considère comme satisfaisant pour un échantillon donné.

3.3. Photoblanchiment, Photodégradation, Saturation et effet thermiques

D'une façon générale, l'état excité d'une molécule est toujours beaucoup plus réactif que son état fondamental. Suite à une excitation lumineuse intense, des réactions chimiques irréversibles peuvent se produire et conduire à la formation de photoproduits. Les propriétés spectroscopiques de ces produits peuvent être radicalement différentes du produit de départ ; globalement, la concentration des molécules initiales diminue. Cet effet se traduit par une perte progressive de l'intensité de fluorescence émise par l'échantillon. Ce processus est appelé photoblanchiment. Par ailleurs, si l'intensité de l'excitation est trop importante on peut observer un phénomène de photosaturation. Dans ce cas, à partir d'un certain seuil d'énergie toutes les molécules sont excitées ; l'augmentation de l'intensité de l'excitation ne conduit plus à une augmentation du signal de fluorescence. Ce processus, qui n'est pas en soit forcément destructif, peut conduire à des interprétations erronées. Enfin, l'intensité de l'excitation peut induire des effets thermiques. Dans ce cas, l'énergie absorbée par la molécule, est dissipée par les processus de relaxation internes ; ils conduisent à un échauffement qui peut être destructif pour la molécule mais également son environnement. L'importance de cet effet dépend de la molécule excitée et de l'intensité d'excitation. Il dépend également des conditions expérimentales ; pour des molécules en solution, le mouvement *Brownien* et la dissipation de l'énergie dans le milieu sont souvent suffisants pour ne pas trop affecter la mesure. En revanche, dans le cas d'un échantillon solide ou d'un émetteur immobile, la seule parade consiste à diminuer l'énergie d'excitation et donc à augmenter le temps d'acquisition.

L'importance de ces différents processus est d'autant plus grande que la mesure est effectuée en mode confocal ; dans ces conditions, l'énergie est confinée dans un volume très petit (de l'ordre de $1 \mu\text{m}^3$) et le nombre de molécules dans ce volume est très faible (quelques molécules).

Dans le cas d'une source laser pulsée, l'énergie moyenne reçue par l'échantillon est plus faible et, par conséquent, ces processus tendent à diminuer.

3.4. Domaines d'application

Le principal domaine d'application du microscope confocal est l'imagerie [30]. Il est couramment utilisé par les biologistes car il permet d'obtenir *in fine* des images en trois dimensions dans des conditions *in vivo*. La microscopie confocale a été utilisée afin d'observer la cinétique de diffusion de protéines marquées à travers des vésicules [31, 32] ou de matrices chromatographiques [33]. C'est à partir des images obtenues qu'il est possible de suivre l'évolution du profil de concentration en fonction du temps. Les méthodes spectroscopiques utilisent aussi le dispositif confocal, c'est le cas des études de fluorescence en corrélation de photons (FCS) [34]. Dans cette technique, la taille du volume confocal d'excitation permet de détecter statistiquement une molécule fluorescente unique ; ceci rend possible la mesure du temps de diffusion translationnel de la molécule [35].

La détection en mode confocal a également été utilisée pour des études à partir d'ondes évanescentes obtenues en condition de réflexion totale du faisceau d'excitation (TIRF) [36]. Dans ces études, le volume confocal d'excitation est de l'ordre de 0,2 femtolitre ; la détection de molécule unique peut, de ce fait, être effectuée avec des concentrations plus élevées que dans le cas d'un dispositif confocal simple. Très récemment, des études d'anisotropie de fluorescence ont été effectuées en mode confocal [37, 38], néanmoins cette technique demeure encore marginale. L'analyse des durées de vie de fluorescence en mode confocal commence à émerger avec notamment la mise sur le marché, début 2005, par l'entreprise Picoquant d'un dispositif confocal permettant de déterminer des durées de vie de fluorescence en détection de molécules uniques [39].

4. Les protéines

Au début du 19^{ème} siècle, le chimiste hollandais, G.J. Mulder avait étudié les albumines. Les résultats de ses travaux montrèrent que ces composés étaient constitués de carbone, d'oxygène, d'hydrogène et d'azote. En 1838, le chimiste suédois, J.J. Berzelius suggéra à Mulder d'appeler ces albumines « protéines », du grec *prôtos*, premier, car il leur attribuait un rôle dominant parmi les composés biologiques [40]. Les protéines, biomolécules complexes formées par une chaîne d'acides aminés, jouent un rôle primordial dans le processus de la vie. Celles-ci constituent le plus souvent plus de 50% du poids sec des êtres vivants. Parmi les protéines, on trouve les enzymes qui catalysent les réactions biochimiques

(lipase, glucosidase...). D'autres sont capables de fixer des molécules puis de les transporter ; la plus connue étant l'hémoglobine qui transportent l'oxygène et le dioxyde de carbone dans le sang. Les structures cellulaires et tissulaires sont aussi assurées par des protéines telles que la kératine ou le collagène. D'autres encore entrent dans le processus de décodage de l'information cellulaire. Les hormones sont aussi des protéines ; leur rôle est de moduler l'activité biologique de cellules ou de tissus cibles. D'autres enfin, comme les immunoglobulines, sont impliquées dans les mécanismes de défense immunitaire.

4.1. Structure des protéines.

Les protéines sont des polymères linéaires naturels constitués d'acides aminés. Les organismes vivants utilisent tous le même jeu de 20 acides aminés comme éléments constitutifs. Malgré le nombre réduit d'éléments, leur nombre et l'ordre dans lequel ils s'enchaînent permettent une infinité de combinaisons. Les acides aminés adoptent tous le même schéma structurel. Ils sont constitués d'un groupe amine en α d'un groupe acide carboxylique (d'où leur nom d'acide α aminé). Ces deux fonctions servent à l'enchaînement linéaire des peptides (Figure 12) *via* une liaison amide, dénommée dans ce cas « liaison peptidique ». La chaîne latérale $-R$ est propre à chaque acide aminé.

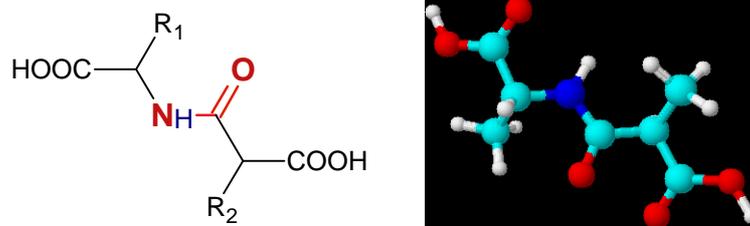


Figure 12 : Schéma de la liaison peptidique

Les propriétés des protéines sont liées à leur structure tridimensionnelle. Leur conformation est le résultat de plusieurs niveaux de structuration successifs [41, 42] :

- **la structure primaire** correspond à l'enchaînement linéaire de la séquence des acides aminés,
- **la structure secondaire** est composée d'organisations ou structures régulières locales telles que les hélices α (structures enroulées) et les feuillets β (structures plissées),
- **la structure tertiaire** est obtenue, au sein d'une même chaîne polypeptidique, par la formation de différentes liaisons : liaisons de nature ionique et hydrophobe, liaisons hydrogènes, liaisons de Van der Waals, ponts disulfures,
- **la structure quaternaire** est obtenue par l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques formant des dimères, trimères, ..., oligomères.

Plusieurs interactions et une liaison covalente (Tableau 1) rentrent en jeu dans la géométrie des protéines.

Les interactions ioniques [43] ont lieu entre les acides aminés qui possèdent des chaînes latérales chargées. L'énergie d'interaction entre deux charges q_A et q_B peut, en théorie, être représentée par la loi de Coulomb. $\Delta E = q_A q_B / \epsilon r$ où q sont les charges exprimées en unité de charge élémentaire (le coulomb), ϵ la constante diélectrique du milieu et r la distance entre les charges. Son application dans le cadre des protéines est plus complexe pour deux raisons :

- **les charges** sont souvent distribuées sur plusieurs atomes et ne peuvent pas donc pas être considérées comme ponctuelles.
- **la constante diélectrique** est mal connue et la charge d'un groupe ionisable dépend de son environnement.

De ce fait la charge d'une chaîne carboxylique latérale peut varier de 2 à 6 suivant sa situation. Les énergies de ces interactions varient de 35 à 90 kJ mole⁻¹.

Les interactions de Van der Waals [44] sont interatomiques et correspondent aux forces de dispersion. Même pour une distribution en moyenne neutre des charges, il existe des fluctuations de la distribution électronique à laquelle est associé un moment dipolaire

instantané. Ces dipôles génèrent autour d'eux des dipôles induits. L'énergie d'interaction varie en $1/r^6$ (avec r la distance entre les dipôles).

- **Les interactions dipôle/dipôle** existent car les atomes ont des charges partielles non nulles. Le cas le plus fréquent est celui de la liaison peptidique. L'énergie des interactions dipolaires s'atténue plus rapidement que les interactions entre charges et dépend également de la constante diélectrique du milieu. Les énergies des interactions dipolaires varient de 1 à 10 kJ mole⁻¹.
- **Les interactions dipôle/dipôle induit**, le dipôle permanent d'une molécule peut susciter un dipôle transitoire dans une molécules voisine.
- **Les interactions dipôle induits/dipôle induit**, quand deux molécules non-polaires sont au voisinage l'une de l'autre, leurs électrons s'influencent mutuellement de façon à produire transitoirement, dans chacune, de faibles dipôles induits.

Les liaisons hydrogènes correspondent au partage d'un atome d'hydrogène (à caractère acide) entre 2 atomes électronégatifs : D-H...A. La liaison est en majorité linéaire (les trois atomes alignés ou presque) comme dans l'hélice α ou les feuilletts β antiparallèles. Toutefois il existe aussi des liaisons non linéaires, comme par exemple entre deux feuilletts β . L'énergie d'une liaison hydrogène varie de 8 à 40 kJ mole⁻¹.

Les interactions hydrophobes interviennent entre les chaînes aliphatiques des chaînes latérales. Elles résultent de la structuration de l'eau. L'énergie de ces interactions varie de 4 à 12 kJ mole⁻¹.

Les ponts disulfures résultent de l'oxydation de deux groupements -SH très proches formant alors une liaison covalente S-S. L'énergie de ces liaisons varie de 320 à 380 kJ mole⁻¹.

Interactions ioniques	
Interactions dipolaires	
Liaisons hydrogènes	
Interactions hydrophobes	
Liaison covalente	

Tableau 1 : Représentation chimique des différents types interactions

Mis à part les ponts disulfures, toutes ces interactions sont de faibles énergies et pour la plupart liées à la constante diélectrique du milieu. Néanmoins leur nombre important suffit à maintenir une structure stable des protéines en milieu physiologique.

En solution aqueuse, les groupements hydrophobes tendent à être exclus de la surface pour se placer au centre de la protéine où l'eau est peu présente. Toutefois, certains résidus hydrophobes peuvent rester en surface. Les groupements latéraux chargés sont très majoritairement situés à la surface des protéines.

4.2. Propriétés des protéines

4.2.1. Les sites actifs et enzymatiques

Certaines protéines interviennent dans les mécanismes de reconnaissance cellulaire. Leurs structures tridimensionnelles leur permettent d'avoir un site de fixation extrêmement sélectif pour une molécule dans une conformation précise. La moindre modification de la géométrie du substrat ou du site de fixation peut provoquer une chute considérable de l'affinité de ce dernier avec la protéine. Cette propriété est illustrée dans le cas de l'affinité entre l'avidine et la biotine [45]. L'avidine, qui est un tétramère, possède 4 sites de fixations possibles pour la biotine. La constante d'affinité de 10^{15} M^{-1} [46, 47] correspond à un complexe quasi-irréversible [48]. Si au niveau du site de fixation, un ou plusieurs acides aminés sont modifiés, la constante d'affinité du complexe diminue fortement [49, 50]. On obtient le même résultat si la partie de la biotine qui entre en interaction avec l'avidine [51] est modifiée chimiquement.

4.2.2. Protéines : molécules polyélectrolytes

Les protéines possèdent toutes une fonction α -amino-acide qui leur confère un caractère amphotère. De plus, certains résidus portent eux mêmes des charges [52] qui évoluent en fonction du pH de la solution (Tableau 2) ; de ce fait, les protéines sont qualifiées de polyélectrolytes.

Acide aminé	Groupe fonctionnel	pKa
Tous	Amino N-terminal	6,8-8,0
Tous	Carboxy-terminal	3,5-4,3
Asp (D)	β -carboxy	3,9-4,0
Glu (E)	γ -carboxy	4,3-4,5
Arg (R)	δ -guanidino	12,0
Lys (K)	ϵ -amino	10,4-11,1
His (H)	Imidazole	6,0-7,0
Cys (C)	Thiol	9,0-9,5
Tyr (Y)	Phenol hydroxyl	10,0-10,3

Tableau 2 : pKa des fonctions acido-basique des acides aminés

Une première approximation consiste à affecter à une protéine une charge globale évoluant avec le pH du milieu. On peut alors définir le point de charge nulle (PCN) et le point isoélectrique (PI). Le premier est le pH pour lequel la somme algébrique des charges ioniques, déterminée par dosage acido-basique, est égale à zéro. Le second est le pH pour lequel la mobilité électrophorétique est nulle.

La densité de charges sur la surface n'est pas homogène (Figure 13). Cette inhomogénéité de distribution de charge peut avoir des conséquences non négligeables dans des processus d'interaction. Tous ces paramètres font des protéines un sujet d'études très complexe.

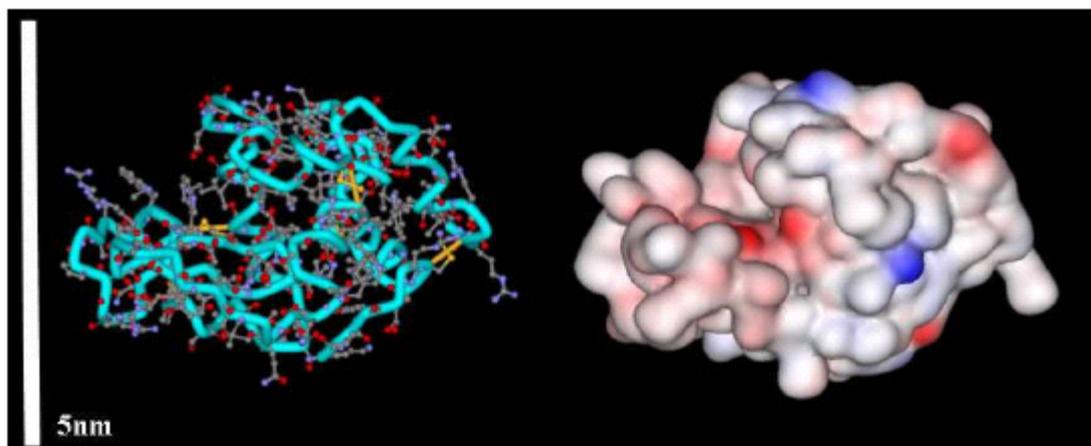


Figure 13 : Structure du lysozyme et répartitions en 3D du potentiel électrostatique (en rouge les charges négatives et en bleu les charges positives).

4.2.3. Stabilité et dénaturation des protéines

La conformation tridimensionnelle des protéines résulte de la somme d'interactions énergétiques faibles. Même si leur nombre important arrive à maintenir la structure de l'édifice, les protéines n'en restent pas moins des molécules fragiles. Leur conformation native peut être modifiée, de façon réversible ou non, par des traitements physiques (irradiation, chaleur) ou chimiques (pH, force ionique, solvant, réactif). La dénaturation des protéines correspond à un changement de conformation, par modification de leurs structures secondaires, tertiaires et quaternaires. Cette modification est complexe et dépend de l'énergie mise en jeu dans le processus de dénaturation. Les conséquences de la dénaturation peuvent conduire à la perte totale ou partielle des propriétés biologiques et à l'apparition ou la disparition de propriétés chimiques. Les paramètres physico-chimiques tels que la solubilité et les caractéristiques spectroscopiques sont également modifiés. La dénaturation peut être de deux types :

- **Réversible** : l'altération est modérée, généralement sur un temps assez court ; la réversibilité de la dénaturation, pouvant n'être que partielle, s'opère par suppression de l'action dénaturante.
- **Irréversible** : le retour à l'état natif est impossible du fait d'une action plus profonde du traitement ou de l'agent dénaturant.

En solution, de nombreux paramètres peuvent avoir des effets dénaturants sur les protéines. Un pH trop éloigné du point isoélectrique provoque une forte densité de charges. Ceci crée une forte répulsion entre les charges et aura pour conséquence de modifier la conformation de la protéine [53]. Un autre paramètre est la nature des ions en solution. La série de Hofmeister [54] a permis de classer les effets de stabilisation des ions. Enfin, la force ionique influe également. A force ionique élevée, la protéine aura tendance à adopter une conformation plus globulaire ; à force ionique faible, il y aura peu d'agrégation mais une plus forte dénaturation.

4.3. Etude des protéines par fluorescence

4.3.1. Fluorescence intrinsèque des protéines

Les propriétés de fluorescence des protéines résultent de la présence de trois acides aminés possédant un noyau aromatique. Ces noyaux confèrent aux résidus tryptophane, tyrosine et phénylalanine la propriété d'absorber dans l'UV et de réémettre des photons de fluorescence (Figure 14) (Tableau 3).

Acide aminé	Absorption		Fluorescence		
	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	Φ	τ_F moy (ns)
Trp (W)	280	5600	348	0,20	2,6
Tyr (Y)	274	1400	303	0,14	3,6
Phe (F)	257	200	282	0,04	6,4

Tableau 3 : Données spectrales des acides aminés aromatiques [6]

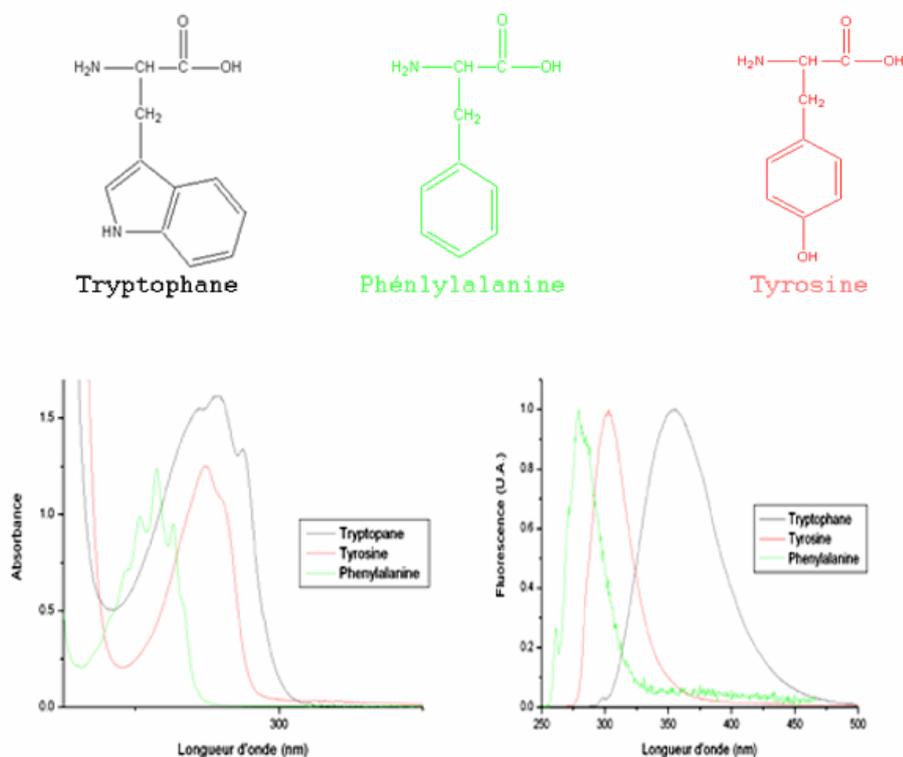


Figure 14 : Formule et spectre d'absorption et d'émission de fluorescence des acides aminés aromatique [55]

Les résidus tyrosines bien que généralement plus nombreux sont souvent éteints (*quenching*) par la proximité des tryptophanes. Les phénylalanines, quant à elles, ont un rendement quantique extrêmement faible qui rend les mesures de fluorescence très difficiles. Dans ces conditions, la fluorescence de la plupart des protéines est celle donnée par les résidus tryptophanes. Les tryptophanes sont extrêmement sensibles à leur environnement [56]; ils se caractérisent par un pic d'absorbance à 280 nm et un pic d'émission de fluorescence à 348 nm. Ils ont un rendement quantique de 0,2 et une durée de vie moyenne de 2,6 ns [57].

L'analyse des durées de vie de fluorescence de protéines contenant plusieurs tryptophanes est complexe. L'interprétation de ces expériences est souvent compliquée par le fait que des déclinés de fluorescences multi-exponentiels sont observés même pour des protéines ne contenant qu'un seul tryptophane [58, 59]. Ce comportement des tryptophanes peut être expliqué par les propriétés de son groupe indole. Deux moments de transition dipolaires sont impliqués dans le processus d'absorption dans le proche U.V (1L_A et 1L_B) [60, 61]. Un transfert d'énergie entre ces deux transitions qui se recouvrent partiellement [62, 63] peut expliquer l'hétérogénéité des durées de vie observée autour de 345 nm [64]. En dehors de ces propriétés photophysiques complexes, la réorientation du solvant et la présence de groupes chimiques appartenant à la protéine, au voisinage du fluorophore excité, peuvent également expliquer la multiplicité des durées de vie [65]. L'existence pour ce résidu de trois rotamères a été établie; la multiplicité des états fondamentaux due à chacun de ces rotamères pourrait, de nouveau, expliquer les durées de vie multiples observées [57, 65-71].

Du point de vue de l'anisotropie, l'étude du mouvement des tryptophanes au sein de la protéine est également très complexe. Les mouvements peuvent être globalement de trois ordres: liés à la rotation globale de la protéine, liés à la flexibilité de la chaîne protéique sur laquelle est fixé le résidu, lié à la libre, ou partiellement libre, rotation du chromophore autour de sa liaison. Les modèles mathématiques qui relient les déclinés de fluorescence aux temps de corrélations associés à ces mouvements sont très compliqués; ils font intervenir les durées de vie multi-exponentielles et le choix souvent subjectif des couplages entre durées de vie et temps de corrélation. Tout ceci a pour conséquence, du point de vue mathématique, la nécessité d'ajuster des combinaisons de très nombreuses exponentielles (souvent plus d'une dizaine). Cette complexité rend la plupart du temps impossible la distinction entre modèles [72].

En dehors de la fluorescence intrinsèque due aux résidus tryptophanes, certaines protéines possèdent des propriétés de fluorescence dans le visible. C'est le cas notamment de protéines provenant d'organismes marins. La GFP (Green Fluorescent Protein) extraite d'une algue : l'*Aequorea victoria* [73] et la dsRed extraite d'un corail, le *Discosomia* [74, 75] sont deux exemples de protéines dont la fluorescence intrinsèque se situe dans le domaine du visible. Celles-ci peuvent être utilisées pour la microscopie. L'analyse de la fluorescence résolue dans le temps de ces protéines a été réalisée. Les déclin de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence de la GFP se décomposent en deux durées de vie, $\tau_{F1} = 2,87$ ns et $\tau_{F2} = 1,6$ ns et un temps de corrélation de l'ordre de 14 ns [76]. Pour sa part, la dsRed est caractérisée par un déclin de fluorescence de durée de vie $\tau_F = 3,67$ ns associé à deux temps de corrélation ; 0,211 ns et 53 ns [77]. A partir de modifications génétiques, ont été développés des mutants de la GFP. Ces mutants font intervenir d'autres types de chromophores [78] qui ont été sélectionnés en fonction de leurs propriétés d'absorption et d'émission.

4.3.2. Les marqueurs fluorescents

La visualisation des protéines par leur fluorescence intrinsèque étant très difficile, il est souvent nécessaire d'utiliser des marqueurs fluorescents. Il en existe un grand nombre, chacun ayant des spectres d'absorbance et d'émission (Figure 15), des rendements quantiques et des propriétés d'interactions très différents.

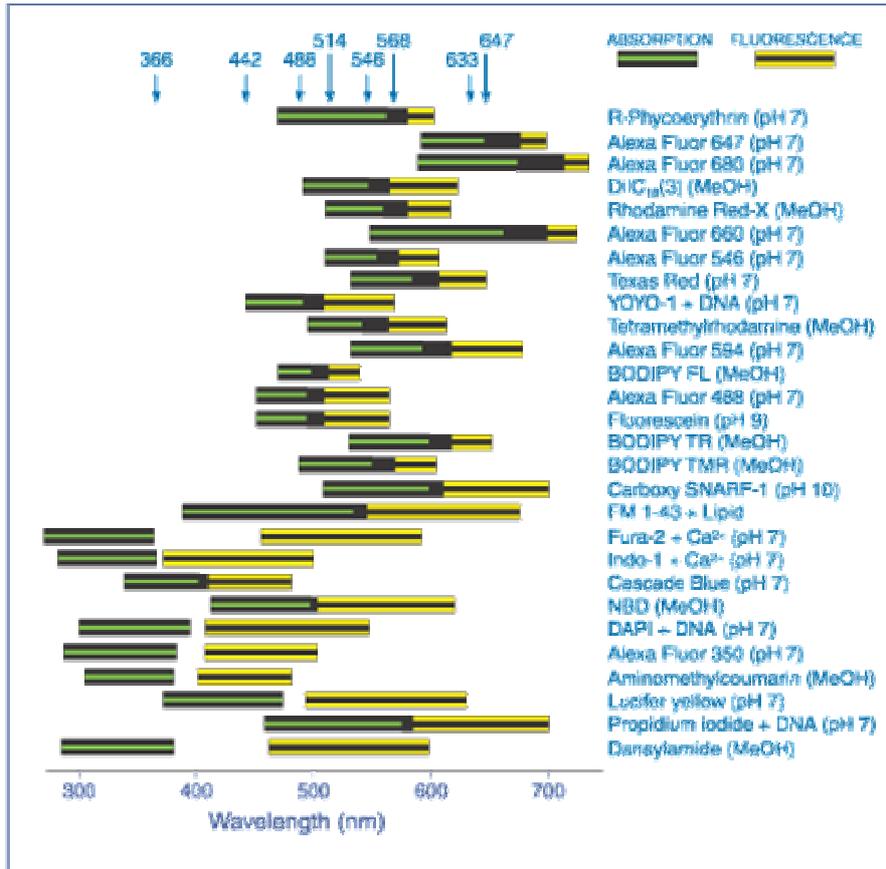


Figure 15 : Domaine spectral d'absorption et de fluorescence de 28 fluorophores couramment utilisés par ordre d'importance [79]

Le nombre croissant de marqueurs fluorescents mis sur le marché ces dernières années est étroitement lié au développement de la microscopie confocale et biphotonique [80].

Si les marqueurs fluorescents semblent être une alternative aux difficultés qu'engendre l'étude de la fluorescence des tryptophanes, ils sont loin de ne poser aucun problème. Par exemple, les plus connus, comme la fluorescéine et la rhodamine, subissent une forte extinction de fluorescence dès lors qu'ils sont en interaction avec des tryptophanes [81]. Cette extinction semble due à la formation d'un complexe non fluorescent entre le chromophore et les tryptophanes [21, 22]. Ce processus, fréquemment utilisé pour effectuer par exemple des dosages à très faible concentration [82], peut s'avérer catastrophique pour l'imagerie et pour les études d'anisotropie de fluorescence.

Depuis quelques années, des fluorophores moins sensibles au pH, aux solvants et aux interactions avec les tryptophanes ont été développés. C'est notamment le cas de la série des « *Alexa Fluor* », des « *Oregon* » [9], des « *Cy* » ou encore des « *ATTO* » [83].

Si, de façon évidente, les marqueurs fluorescents permettent de résoudre les problèmes de longueurs d'onde d'absorption, d'émission, et de rendement quantique de fluorescence, leur utilisation soulève, par ailleurs, le problème de leur fixation et de leur localisation sur les protéines. L'ajout de fluorophore sur les protéines ne doit pas influencer sur leurs propriétés (adsorption, activité biologique etc.). De plus les réactions chimiques de fixations des marqueurs doivent être effectuées dans des conditions non dénaturantes vis-à-vis de la protéine.

4.3.3. Limites de l'étude de l'anisotropie de fluorescence des protéines.

L'analyse des déclin d'anisotropie de fluorescence est liée, d'une part, au nombre de durées de vie de fluorescence, et, d'autre part, au nombre de mouvements possibles de ces émetteurs dans et avec la protéine. Dans le cas d'une protéine sphérique, un seul temps de corrélation est associé à la rotation de la protéine. Si le chromophore possède une seule durée de vie et qu'il ne possède pas par ailleurs de mouvement propre au sein de la protéine, on a alors un modèle simple. Cette condition n'est pas vérifiée dans le cas des tryptophanes qui émettent avec plusieurs durées de vie et qui possèdent une grande liberté de mouvement dans la protéine. L'utilisation de marqueurs fluorescents exogènes permet de résoudre le problème du nombre de durées de vie et du rendement quantique. En revanche, la liberté de mouvement du chromophore vis-à-vis de la protéine reste liée à la façon dont il est attaché.

Les réactions de marquage s'effectuent classiquement sur des groupements aminés présents à la surface des protéines ; ceux-ci sont très facilement accessibles par la sonde. Si une chaîne même courte sépare le fluorophore et la protéine (Figure 16), le chromophore aura la possibilité de tourner librement et pourra également être soumis au mouvement de la chaîne peptique. La sonde fluorescente étant une molécule bien plus petite que la protéine, sa vitesse de dépolarisation est beaucoup plus rapide que celle de la protéine.

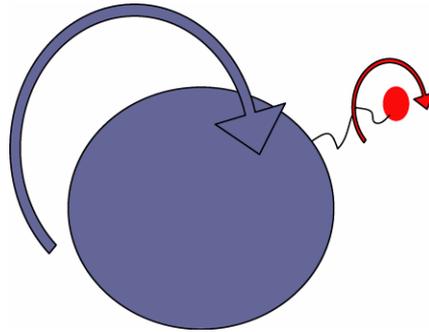


Figure 16 : Schéma du marquage direct d'une protéine par une sonde fluorescence

La photosélection effectuée lors de l'excitation sera rapidement perdue par le mouvement de la sonde ; on ne pourra pas rendre compte du mouvement de la protéine. Dans le meilleur des cas, la fonction de dépolarisation sera composée de deux temps de corrélation. Le plus court relatara le mouvement de rotation de la sonde et le plus long, celui de la rotation de la protéine.

Par conséquent, l'utilisation d'un marqueur fluorescent devient particulièrement intéressante si l'on est capable de fixer celui-ci au sein de la structure protéique.

5. Phénomène d'adsorption des protéines sur des surfaces

La connaissance des processus fondamentaux [84] du phénomène d'adsorption des protéines est utile pour des applications dans un grand nombre de domaines [85] tels que la filtration, l'hémodialyse [86], le diagnostic biomédical [87] pour ne citer que ces trois exemples.

Les protéines, qui sont dotées d'une structure complexe et d'une surface non homogène en termes de polarité, d'hydrophobicité et de répartition des charges, vont avoir la capacité d'interagir avec des interfaces de natures diverses. Plusieurs types d'interactions peuvent conduire à l'adsorption des protéines sur la surface par déplacement de molécules et/ou d'ions du solvant [88]. Dans ce processus, un grand nombre de paramètres entrent en jeu, notamment la structure de la protéine [89], les propriétés de la surface [90], le pH [91] et la force ionique de la solution [92].

5.1. Aspect thermodynamique

Les forces agissantes entre l'interface et la surface de la protéine sont identiques à celles qui permettent de maintenir l'édifice tridimensionnel des protéines. Parmi elles, on trouve notamment les forces électrostatiques, les forces de Van der Waals et les interactions hydrophobes.

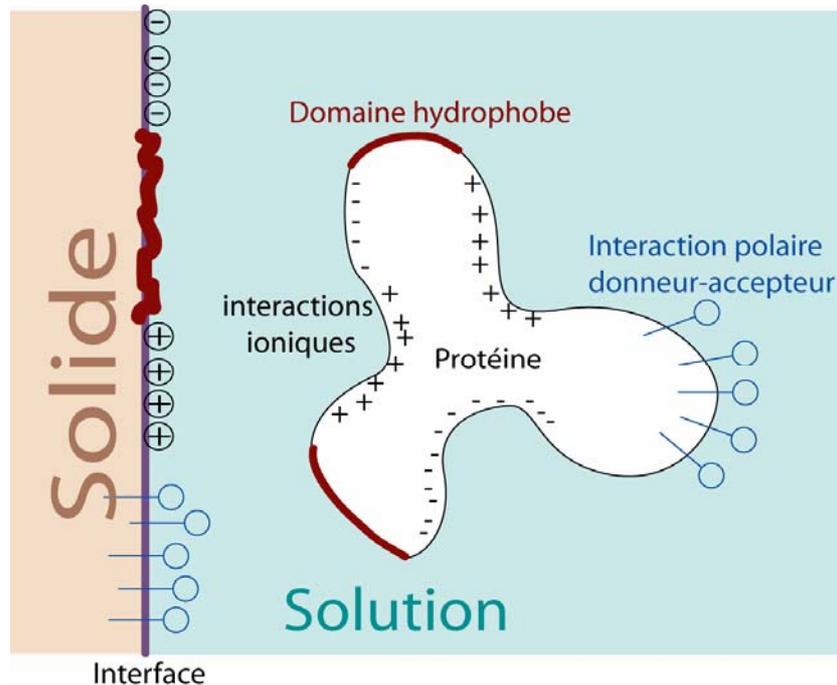


Figure 17 : Représentation schématique d'une protéine interagissant avec une surface d'après J.D. Andrade[93]

En terme d'énergie, l'adsorption spontanée d'une protéine sur une surface n'est possible que si l'enthalpie libre $\Delta_{ads}G$ décroît.

$$\Delta_{ads}G = \Delta_{ads}H - T\Delta_{ads}S$$

Équation 37 : Equation de GIBBS

Dans l'équation de GIBBS (Équation 37), $\Delta_{ads}H$ et $\Delta_{ads}S$ sont respectivement les variations d'enthalpie et d'entropie au cours du processus d'adsorption et T la température.

Dans cette équation entrent en jeu (Tableau 4). :

- les interactions électrostatiques,
- les changements structuraux de la protéine,
- l'incorporation ou l'exclusion d'ions dans la couche adsorbée de la protéine,
- l'état d'hydratation de l'interface,
- la dissociation des acides aminés à la surface de la protéine.

Processus	Contribution à $\Delta_{\text{ads}}G$	Paramètres principaux
Variation de l'état d'hydratation de la surface du solide et de la protéine	$\Delta H \neq 0$ $\Delta S > 0$ $\Delta G \neq 0$	Hydrophobie de la surface du solide et de la protéine
Redistribution des groupements chargés		
1. Contribution électrique	$\Delta H \neq 0$ $\Delta S \neq 0$ $\Delta G \neq 0$	Distribution des charges et constantes diélectrique avant et après adsorption
2. Contribution Chimique	$\Delta H < 0$ $\Delta S < 0$ $\Delta G > 0$	Structure de l'eau : valence et taille des ions transférés
Réarrangements structuraux de la protéine	$\Delta H < 0$ $\Delta S < 0$ $\Delta G > 0$	Stabilité de la structure moléculaire

Tableau 4: Processus intervenant dans l'adsorption des protéines [94].

L'analyse de l'enthalpie libre d'adsorption, telle qu'elle est présentée par Haynes et Norde [94], implique que le système soit complètement réversible.

5.2. Aspect cinétique

Le mécanisme d'adsorption des protéines sur une interface comporte trois étapes distinctes :

- **le transport des protéines** vers l'interface par diffusion et/ou convection
- **l'adsorption de la protéine** sur l'interface par physisorption.
- **Le devenir de la protéine** : changement de conformation, échange avec les protéines de la solution, désorption, diffusion en surface.

Nous nous intéresserons ci-dessous au couplage des processus de transport et d'adsorption aux temps initiaux.

5.2.1. Cinétique initiale contrôlée par le transport

Si le transport des protéines par diffusion et/ou convection à l'interface est beaucoup plus lent que la réaction interfaciale d'adsorption, le processus global sera entièrement contrôlé par le transport.

a. Modèle de Smoluchowski [95] : transport par la diffusion seule

Ce modèle est basé sur les deux conditions suivantes :

- les particules se déplacent du seul fait de la diffusion,
- la réaction interfaciale est infiniment plus rapide ($k_a \rightarrow \infty$) que le transport par diffusion.

La déplétion est alors complète près de l'interface.

Pour un soluté de coefficient de diffusion D et de concentration $C(z,t)$ où t est le temps et z la distance à l'interface, la vitesse d'adsorption est égale au flux par diffusion à l'interface donné par la loi de Fick en solution :

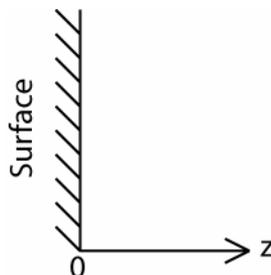
$$\frac{d\Gamma}{dt} = D \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{y=0} ; C = C(z,t)$$

Équation 38

avec : Γ la concentration interfaciale.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \text{ pour } z > 0$$

Équation 39 : Loi de Fick



Les conditions aux limites sont :

$$C(z,0) = C_b \quad t = 0$$

$$C(0,t) = 0 \quad t > 0$$

$$C(z,t) = C_b \quad z \rightarrow \infty$$

C_b étant la concentration de la solution, la solution de l'équation [96] est :

$$\Gamma(t) = 2C_b \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}$$

Équation 40

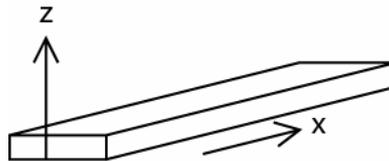
La concentration interfaciale Γ varie comme $t^{1/2}$; la constante cinétique d'adsorption n'apparaît pas puisque le processus est entièrement contrôlé par la diffusion.

b. Modèle de Lévêque [97] : transport par diffusion et convection

Le modèle de Lévêque tient compte à la fois de la diffusion et de la convection. Cette dernière va induire un état stationnaire. Il est basé sur une géométrie de type fente infinie où l'adsorption est contrôlée uniquement par le transport. Dans le cas général, la concentration $C=C(x,z,t)$ est fonction de la distance x à l'entrée de la fente, de la distance z normale à l'interface et du temps t . Le modèle de Lévêque considère l'état stationnaire initial où $C=C(x,z)$. A partir de la loi de Fick en solution on obtient :

$$\begin{cases} \frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - v \frac{\partial C}{\partial x} = 0 \\ \frac{\partial \Gamma}{\partial t} = D \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{y=0} \end{cases}$$

Équation 41



- Le terme $D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$ est négligé.
- V est le champ de vitesse

Les conditions aux limites sont :

$$C(x, 0, t) = 0 \text{ réaction interfaciale très rapide}$$

$$C(0, z, t) = C_b$$

$$\left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{y \rightarrow \infty} = 0$$

Le champ de vitesse v près de l'interface (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) varie linéairement avec z .

$$v = \gamma z$$

Équation 42

avec : γ le gradient de vitesse à la paroi.

La tangente à l'origine du profil stationnaire permet de définir la distance de Lévêque δ_{Lev} et la constante de Lévêque k_{Lev} (Figure 18),

$$\tan \alpha = \frac{\partial C}{\partial z} = \frac{C_b}{\delta_{Lev}}$$

Équation 43

$$\frac{\partial \Gamma(x, t)}{\partial t} = D \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_{y=0} = \frac{D}{\delta_{Lev}} C_b = k_{Lev} C_b$$

Équation 44

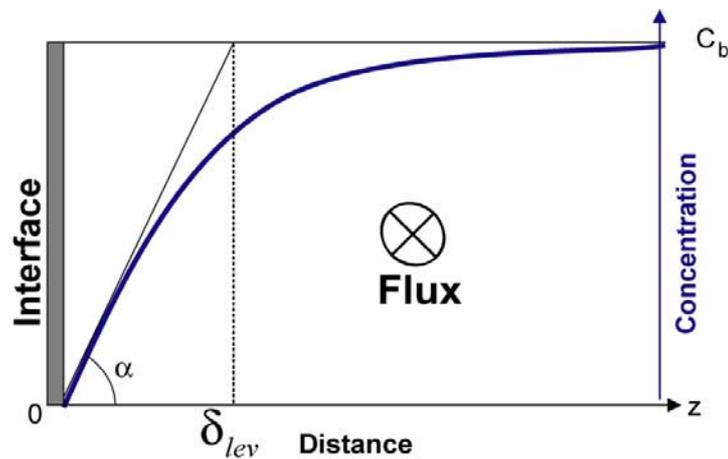


Figure 18 : Profil de concentration théorique dans le cas d'une adsorption contrôlée par le transport avec convection.

La solution de l'Équation 41 avec les conditions aux limites et l'Erreur ! Source du renvoi introuvable. conduit à :

$$k_{Lev} = \frac{3^{1/3}}{\Gamma'(1/3)} \left(\frac{\gamma D^2}{x} \right)^{1/3} \approx 0,538 \left(\frac{\gamma D^2}{x} \right)^{1/3}$$

Équation 45

et :

$$\delta_{lev} = \frac{D}{k_{Lev}} \approx 1,86 \left(\frac{Dx}{\gamma} \right)^{1/3}$$

Équation 46

5.2.2. Cinétique initiale contrôlée par la réaction interfaciale

Dans le cas extrême où le processus d'adsorption (constante d'adsorption k_a) est beaucoup plus lent que celui du transport (diffusion et/ou convection), la cinétique sera contrôlée par la réaction interfaciale : la concentration sera quasi-uniforme (pas de déplétion) sur toute l'épaisseur du volume.

La variation de la concentration interfaciale Γ en fonction du temps s'écrit alors aux instants initiaux :

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k_a C_b$$

Équation 47

5.2.3. Cinétique initiale : Passage du contrôle par le transport (diffusion et/ou convection) au contrôle par la réaction interfaciale.

Pour décrire le passage du contrôle par le transport ($k_a \rightarrow \infty$) au contrôle par la réaction interfaciale (faible valeur de k_a), l'approximation la plus simple consiste à

additionner les temps caractéristiques des deux processus limites, en négligeant leur couplage :

$$\tau = \tau_a + \tau_{transport}$$

Équation 48

soit

$$k^{-1} = k_a^{-1} + k_{lev}^{-1}$$

Équation 49

Cette solution, bien qu'elle ait été quelquefois présentée comme exacte [98], ne reste qu'une approximation. Pour le cas d'une fente, la relation générale exacte, donnant k en fonction de k_a et k_{Lev} , a été donnée par Déjardin, et *al.* [99] avec les approximations suivantes :

- près du régime contrôlé par la réaction à l'interface,

$$k^{-1} = k_a^{-1} + 0,827k_{Lev}^{-1}$$

Équation 50

- près du régime contrôlé par le transport,

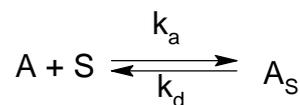
$$k^{-1} = 0,684k_a^{-1} + k_{Lev}^{-1}$$

Équation 51

Une bonne approximation de k/k_a en fonction de k/k_{Lev} sur tout le domaine de k_a et satisfaisant ces deux limites a été donnée récemment [100].

5.2.4. Effet de surface exclue

L'adsorption d'une molécule A en solution sur une interface S peut être représentée par l'équation suivante :



A_s représente les molécules adsorbées sur la surface, k_a et k_d les constantes de vitesse d'adsorption et de désorption. L'équation cinétique générale s'écrit :

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k_a C \phi - k_d \Gamma$$

Équation 52

avec

- $\Gamma = [A_s]$ et $C = [A]$,
- C est la concentration locale à l'interface en solution,

Nous présentons brièvement deux cas extrêmes :

- **le modèle réversible de Langmuir** où $\phi = 1 - \frac{\Gamma}{\Gamma_{sat}}$ et $k_d \neq 0$,
- **le modèle irréversible d'adsorption séquentielle aléatoire** où $\phi = \phi_{RSA}$ et $k_d = 0$.

a. Modèle de Langmuir

Le modèle de Langmuir fait état des hypothèses suivantes :

- l'adsorption est réversible,
- une seule espèce moléculaire s'adsorbe sur une surface homogène ne présentant qu'un type de site d'adsorption,
- une molécule n'occupe qu'un seul site d'adsorption,
- les interactions latérales entre les molécules sont négligées.

Lorsque la réaction globale est contrôlée par la réaction interfaciale, quelle que soit la concentration interfaciale Γ , l'équation cinétique s'écrit sous la forme :

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k_a C_b \left(1 - \frac{\Gamma}{\Gamma_{sat}} \right) - k_d \Gamma$$

Équation 53

où $1 - \frac{\Gamma}{\Gamma_{sat}}$ est la fraction de sites accessibles, Γ_{sat} représente la concentration interfaciale maximale correspondant à la saturation des sites en surface.

La solution est :

$$\Gamma(t) = \Gamma_{sat} \left(1 - e^{-\left(\frac{k_a C_b}{\Gamma_{sat}} + k_d\right)t} \right)$$

Équation 54

La réaction d'adsorption étant considérée comme réversible, à l'équilibre $d\Gamma/dt = 0$, soit :

$$k_a C_b \left(1 - \frac{\Gamma}{\Gamma_{sat}} \right) = k_d \Gamma$$

Équation 55

ou en posant $K = \frac{k_a}{k_d}$,

$$\frac{1}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{sat}} + \frac{1}{KC_b}$$

Équation 56

L'isotherme de Langmuir se caractérise par la variation linéaire de $\frac{1}{\Gamma}$ avec $\frac{1}{C_b}$.

Si le modèle de Langmuir peut être adapté pour des petites molécules, il devient souvent caduc pour des protéines en présence d'une surface sans site spécifique de fixation, et surtout parce que très souvent la réversibilité n'est pas observée. D'autres modèles ont été proposés comme le modèle d'adsorption séquentielle aléatoire (*RSA Random Sequential Adsorption*).

b. Modèle d'adsorption séquentielle aléatoire (RSA)

Le modèle RSA décrit l'adsorption irréversible des particules en partant du principe qu'elles se distribuent aléatoirement et de façon séquentielle sur la surface [101, 102]. Il est défini par les règles suivantes :

- Tout recouvrement, même partiel entre deux particules est interdit,
- Une fois la particule adsorbée, elle ne peut se désorber, ni diffuser sur la surface.

La fonction de recouvrement de surface Φ_{RSA} [103] est approximée par :

$$\Phi_{RSA} = \frac{(1-x')^3}{1+c_1x'+c_2x'^2+c_3x'^3}$$

Équation 57 : équation de Schaalf –Talbot

Avec $c_1=-0,8120$, $c_2=-0,2336$, $c_3=-0,0845$ et $x' = \theta/\theta_\infty$. θ est la fraction de la surface couverte par les molécules de masse moléculaire m ($M = N_{Av}m$), et de section s . θ_∞ est le taux de couverture à saturation. Si Γ est exprimé en masse de protéine par unité d'aire avec N le nombre de molécules adsorbées par unité d'aire nous avons :

$$\theta = Ns = \frac{\Gamma}{m}$$

Équation 58

Pour des particules interagissant par un potentiel « sphères dures », le taux de couverture à saturation est $\theta_\infty = 0,547$ [104].

Près de la saturation $x' \rightarrow 1$

$$\Phi_{RSA} \underset{\theta \rightarrow \theta_\infty}{\approx} \left(1 - \frac{\theta}{\theta_\infty}\right)^3$$

Équation 59

A faible concentration $x' \ll 1$

$$\Phi_{RSA} \underset{\theta \rightarrow \theta_\infty}{\approx} 1 - 2,188 \frac{\theta}{\theta_\infty} \approx 1 - 4\theta$$

Équation 60

Pour une aire occupée de $s = \pi r^2$, (r étant le rayon du disque), l'aire d'exclusion est de $\pi(2r)^2 = 4s$, d'où la limite $1-4\theta$.

Les modèles de Langmuir et RSA ne permettent pas toujours de décrire les données expérimentales. Plusieurs autres modèles théoriques ont été proposés. Certains tiennent compte du changement de conformation [105, 106] ou de la dénaturation [107] de la protéine à la surface l'adsorption, d'autres considèrent l'influence de l'hétérogénéité de la surface sur

l'adsorption [108]. Notons que la valeur finale est beaucoup plus lente à atteindre dans le modèle RSA que dans le modèle de Langmuir.

5.2.5. Evènements après l'adsorption

a. Echange avec la solution

Pour un couple protéine/surface, et bien que la désorption des protéines en présence de tampon seul puisse être très lente, l'échange entre des protéines adsorbées et celles en solution, peut être beaucoup plus rapide [90]. Cet échange dépend essentiellement des conditions dans lesquelles l'adsorption a été effectuée.

b. Changement de conformation

Les protéines adsorbées sur une surface peuvent subir des changements de conformation voire même une perte de leur activité biologique. C'est le cas, par exemple pour la β lactoglobuline lorsqu'elle est adsorbée sur une surface d'or [109], de l'albumine ou du fibrinogène sur de la silice [110]. Les surfaces peuvent être divisées en deux types : état de surface hydrophile et état de surface hydrophobe. Il est très difficile de donner des règles générales sur les phénomènes d'adsorption. Sur une surface hydrophile chargée, la protéine, possédant une densité de charge répartie sur sa surface, aura une surface de fixation petite [111]. Inversement, sur une surface hydrophobe, ce sont les parties hydrophobes de la protéine qui interagiront avec la surface si cela est possible. Les parties hydrophobes étant généralement situées au cœur des protéines, celles-ci subiront, dans ces conditions, une modification de structure plus importante. D'après Donghao et Park, qui ont étudié l'adsorption du fibrinogène sur différentes surfaces hydrophobes, ce phénomène conduirait même jusqu'à la formation d'une molécule hydrophobe [112]. Pour Buijs et *al.*, qui ont étudié l'adsorption de l'immunoglobuline G sur une surface de silice modifiée par des groupements méthyles, cet effet d'interaction hydrophobe ne conduirait qu'à un réarrangement partiel de la protéine visant à optimiser les interactions surface/protéine [113]. Généralement, l'adsorption des protéines est plus importante sur les surfaces hydrophobes que sur les surfaces hydrophiles [114].

Le pH du milieu peut jouer aussi un rôle important dans le changement de conformation des protéines adsorbées sur une surface hydrophile. Quiquampoix et *al.* ont

étudié l'influence du pH sur l'adsorption de la BSA (albumine de sérum bovin) et de la β -glucosidase sur une surface minérale [115]. Dans ce cas, si le pH est proche du point isoélectrique de la protéine, la conformation globulaire des protéines accroît leur adsorption et elle ne subira qu'une faible modification de structure. Si le pH est plus éloigné du point isoélectrique, les forces électrostatiques auront tendance à donner à la protéine une conformation plus étendue en solution et donc moins stable. Ainsi, si la charge globale de la protéine est opposée à celle de la surface, la protéine va s'étaler sur la surface en raison des interactions électrostatiques attractives. Dans le cas contraire, si les forces électrostatiques sont répulsives, l'adsorption des protéines s'effectuera sans étalement sur la surface [116].

Si la protéine et la surface n'ont aucune affinité hydrophobe, l'adsorption sera plus faible ; c'est le cas du lysozyme ou de la RNase avec une surface de silicium oxydé [117]. Dans le cas contraire, les protéines s'adsorberont par des interactions hydrophobes avec la surface et seront le plus souvent dénaturées [118]. A partir de ces observations ont été introduites les notions de protéines dites molles « *soft* » et protéines dites dures « *hard* ». Les protéines molles qui s'adsorbent par des interactions hydrophobes ont une faible stabilité structurelle. Parmi elles, comptent la myoglobine, l'hémoglobine, la BSA. A l'inverse, les protéines dures sont dotées d'une grande stabilité structurale. Les protéines dures ne s'adsorbent pas s'il existe une répulsion électrostatique entre la protéine et la surface. On compte parmi les protéines dures la ribonucléase, le lysosyme ou encore l'avidine. Notons qu'une description liée aux interactions dipolaires entre protéines a également été suggérée [119].

5.3. Méthodes d'analyses

Un grand nombre de techniques d'analyse sont utilisées pour les études d'interactions protéines/surfaces [84, 120-122] et protéines/membrane [123]. La première technique utilisée pour déterminer la cinétique d'adsorption des protéines sur une surface plane fut le radiomarquage [119]. La technique d'étude du potentiel d'écoulement permet, quant à elle, de suivre l'évolution de la densité de charge d'une surface lors du processus d'adsorption [124].

D'autres techniques permettent de quantifier et d'analyser la localisation des protéines adsorbées. Citons, par exemple, la réflexion des neutrons aux petits angles (SANS) qui est une technique d'analyse *in situ* résolue en temps. Cette technique peut être utilisée pour l'étude des membranes transparentes aux neutrons telles que les membranes céramiques à

base de silicium ou d'aluminate [125]. La microscopie confocale trouve une application pour effectuer des images montrant la répartition de protéines marquées différemment [32] sur une interface ou à l'intérieur d'une membrane. La microscopie à force atomique (AFM) est utilisée pour étudier la topographie et ainsi obtenir des images tridimensionnelles d'une surface recouverte par une protéine [126, 127].

La mesure de l'absorption des tryptophanes des protéines par dichroïsme circulaire permet d'obtenir des informations sur les changements de structure des protéines lorsqu'elles sont adsorbées [128, 129]. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est utilisée pour étudier les changements de conformation des protéines en comparant leur spectre infrarouge avant et après adsorption [109, 130]. Maruyama et *al.* [131] ont utilisé cette technique pour quantifier le changement de conformation dans la structure secondaire de la BSA après adsorption sur une membrane d'ultrafiltration.

Les mesures de durées de vie de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence ont été aussi utilisées pour étudier l'adsorption d'une protéine fluorescente (mEosFP [132]) sur des particules de polystyrène greffés avec des chaînes de polyélectrolytes [133]. La fluorescence en réflexion totale interne (TIRF) est utilisée pour mesurer la cinétique d'adsorption [134]. Citons par exemples les travaux de Buijs et *al.* [135] pour le lysozyme sur des surfaces de silice modifiée ou non par des groupement hydrophobes, ceux de Wertz et *al.* [136] pour la même protéine sur une surface de silice modifiée avec de l'hexadecyltrichlorosilane. Cha et Beissinger [137] ont déterminé par TIRF l'influence du gradient de vitesse d'un flux d'une solution de BSA sur sa cinétique d'adsorption sur le verre. La technique TIRF a été développée pour accéder à la mesure de la concentration interfaciale ; elle n'est pas adaptée à la mesure d'un profil de concentration s'étalant sur quelques micromètres ou dizaines de micromètres. En effet, c'est l'angle d'incidence, la longueur d'onde du faisceau d'excitation et l'indice optique de la surface qui vont déterminer où se trouve le point focal. Ainsi pour un angle d'incidence de 73° , l'onde évanescente va pénétrer de 83 nm pour une longueur d'onde d'excitation de 295 nm et de 138 nm pour une longueur d'onde d'excitation de 488 nm. Le TIRF est aussi limité à l'étude de l'adsorption des protéines sur des surfaces transparentes. Notons que des études en fluorescence dynamique (durée de vie et anisotropie) ont été effectuées avec cette technique [138] afin d'observer la dénaturation de la BSA adsorbée sur une surface de silice.

Chapitre II. Matériel et méthodes.

Avant la réalisation de ce projet, seule la technique de fluorescence résolue dans le temps pour mesurer des durées de vie avait été développée dans le laboratoire. Afin d'obtenir des informations sur le mouvement des molécules en solution, il a fallu compléter ce montage pour effectuer des mesures d'anisotropie. De même, afin d'analyser ces données et, dans la perspective du montage confocal de fluorescence, il a été nécessaire de développer les programmes de calcul adaptés.

Dans ce chapitre sont présentés le montage expérimental réalisé et les méthodes de calcul mises en œuvre. Dans un second temps, nous présentons la technique de mesure de la concentration interfaciale par radiodétection.

1. La spectroscopie de fluorescence résolue en temps

L'émission de fluorescence est un processus extrêmement rapide. Il se place typiquement dans l'échelle de temps de la picoseconde (10^{-12} s) à la nanoseconde (10^{-9} s). Cette gamme de temps se situe à la limite de la résolution temporelle accessible par l'électronique. Actuellement, les oscilloscopes les plus rapides, qui fonctionnent en temps réel, sont cadencés à environ 500 MHz, soit de l'ordre de 2 ns par point. Cette résolution est insuffisante pour enregistrer un déclin de fluorescence. Les techniques de mesures qui utilisent les caméras CCD à obturateur très rapide ou les caméras à balayage de fente, sont extrêmement attractives du fait qu'elles permettent théoriquement des temps d'accumulation courts. Toutefois, afin d'accéder à une numérisation rapide, la résolution du codage se fait au détriment de la sensibilité. Lorsque les déclins à observer sont complexes, l'analyse est difficile et l'interprétation reste peu fiable.

La technique de fluorimétrie de phase, qui consiste à exciter un échantillon avec une lumière modulée et à mesurer le déphasage de l'émission introduit par la durée de vie de fluorescence, présente l'avantage d'être une méthode d'acquisition rapide. C'est une technique de choix lorsqu'on veut observer des systèmes qui évoluent dans le temps, comme par exemple dans le cas de la photosynthèse (fermeture des centres réactionnels photosynthétiques sous l'effet de la lumière [139]). Malheureusement, l'analyse mathématique des données expérimentales devient complexe lorsque l'émission de fluorescence est multi-exponentielle. L'utilisation de systèmes permettant d'effectuer des mesures à différentes fréquences de modulation de l'excitation, a permis de résoudre partiellement ce problème. Toutefois, là encore, l'interprétation reste difficile.

La technique de comptage de photons uniques corrélés en temps (TCSPC) est une méthode de détection indirecte du déclin de fluorescence [140]. Elle présente de nombreux avantages :

- les détecteurs utilisés sont sensibles à des événements uniques,
- cette sensibilité permet d'obtenir une statistique des événements observés,
- les méthodes mathématiques de déconvolution permettent d'aller au-delà de la résolution de l'électronique,
- enfin, elle permet une assez bonne résolution des déclins multi-exponentiels.

L'inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite des temps d'accumulation assez longs, ce qui est parfois peu compatible avec certains échantillons. Malgré tout, pour toutes les raisons citées précédemment, elle reste la méthode la plus adaptée pour mesurer des déclin de fluorescence [141].

1.1. Principe de la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps

A partir du diagramme de Jablonski (Figure 2, p 13), nous avons montré que la relaxation de l'état excité se faisait selon un processus exponentiel dont la constante de temps était reliée à tous les processus de désactivation de cet état. Le déclin de fluorescence correspond à celui de l'état excité ; la distribution des photons émis est reliée à la concentration de cet état à chaque instant. L'enregistrement et l'analyse de la constante de temps associée à la distribution temporelle des photons permettent la mesure de la durée de vie de l'état excité.

Le principe de la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps consiste à exciter un échantillon fluorescent par une impulsion lumineuse extrêmement brève (quelques picosecondes), puis à sommer et à classer les photons détectés à partir du décalage en temps de leur émission. Après un nombre important de sommations, on obtient un histogramme (Figure 19) qui correspond au déclin de l'état excité. La constante de temps calculée à partir de cet histogramme donne la durée de vie de l'état excité, ou encore durée de vie de fluorescence.

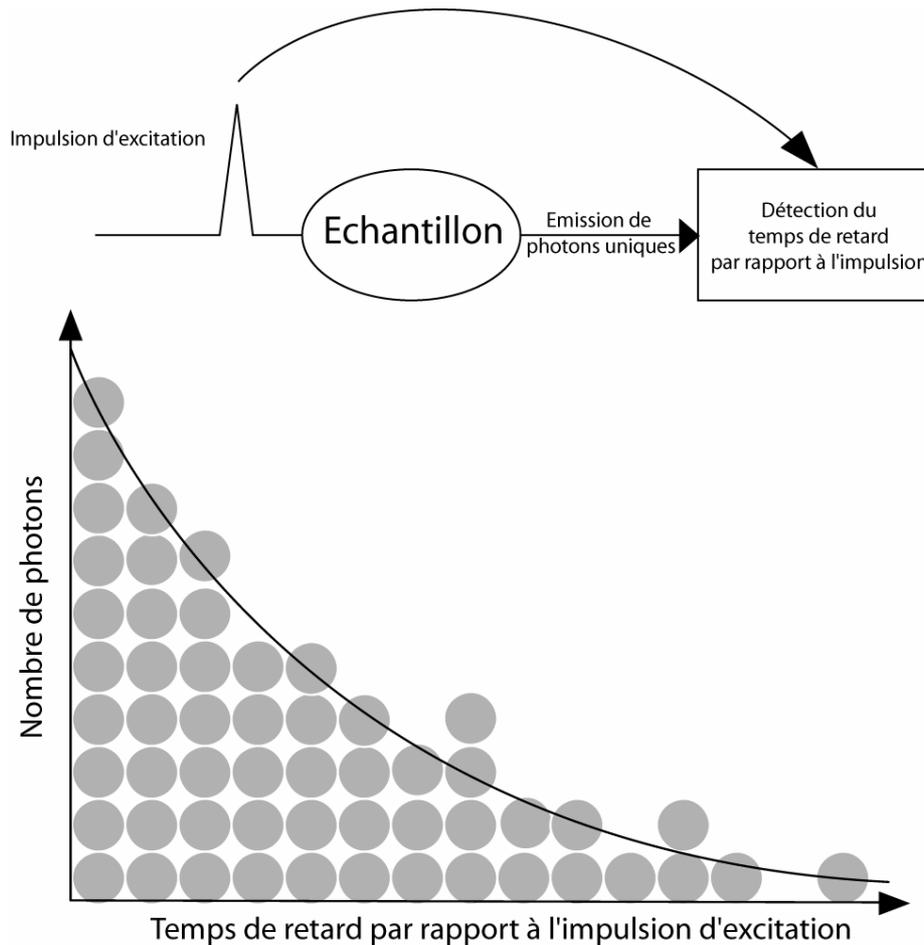


Figure 19 : Histogramme des retards de photons uniques comptés

Le comptage de photons est une sommation d'événements quantiques ; la statistique qui décrit la distribution de ces événements suit une loi de Poisson. Ceci permet d'introduire un critère statistique extrêmement puissant quant à l'ajustement des paramètres du déclin dans la méthode d'analyse des données. Afin d'obtenir une bonne statistique, le nombre de photons détectés doit être suffisant ; l'intégrale du déclin doit être de quelques millions de coups.

1.2. Dispositif expérimental

1.2.1. Dispositif optique

Le dispositif optique (Figure 20), est celui utilisé couramment pour effectuer des mesures de fluorescence en solution. Une impulsion laser brève et polarisée est focalisée dans

une solution contenant un fluorophore. Les photons de fluorescence, réémis dans tout l'espace, sont collectés à 90° du faisceau d'excitation.

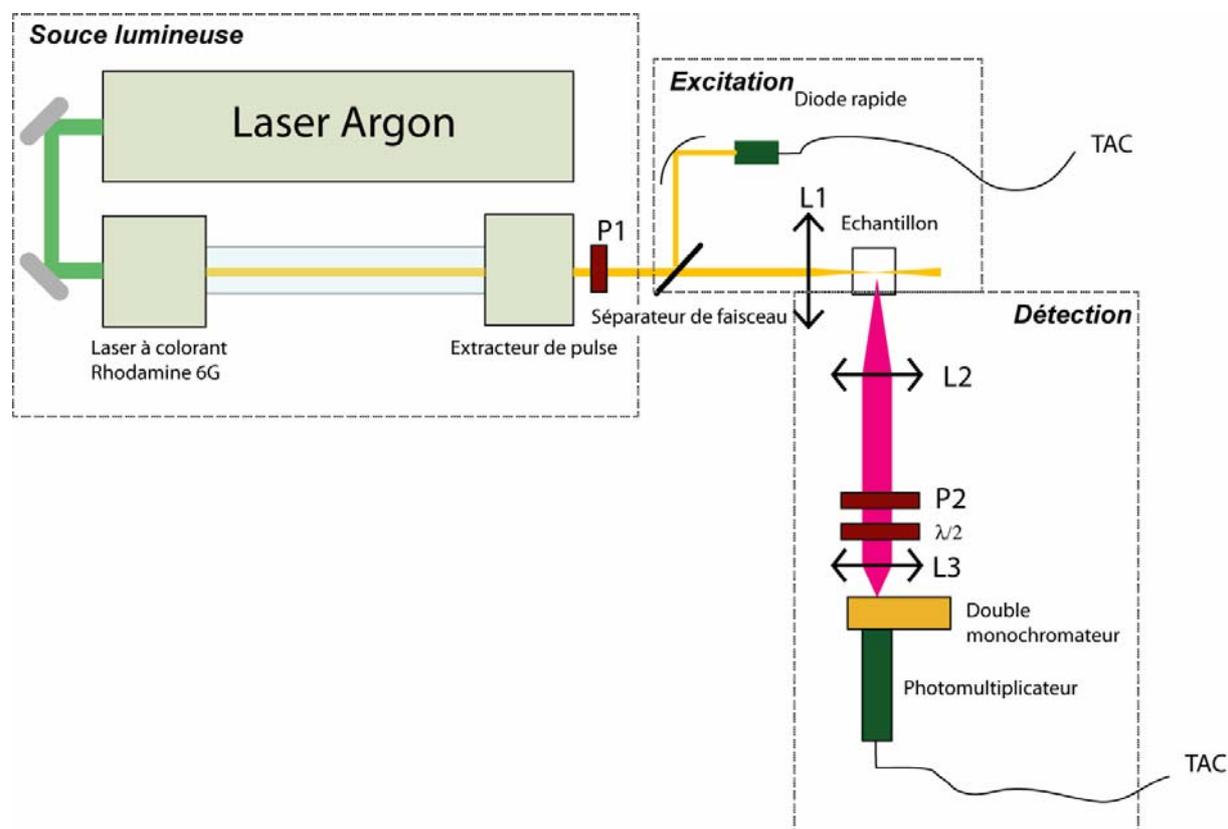


Figure 20 : Dispositif optique d'analyse de fluorescence en solution

Ce dispositif peut être décomposé en trois parties, la source lumineuse, l'excitation et la détection.

a. La source lumineuse

La fluorescence étant un processus rapide, la durée des impulsions d'excitation laser doit être négligeable par rapport à la durée de vie de fluorescence. De ce fait, la source lumineuse utilisée doit délivrer des impulsions de l'ordre de la picoseconde. La source lumineuse utilisée pour ces travaux est un laser à colorant (Spectra Physics 375) pompé de façon synchrone par un laser argon ionisé (Spectra Physics 2030) fonctionnant en mode impulsif (mode bloqué).

Le laser argon ionisé fait partie des lasers à décharge dans les gaz. Les impulsions sont obtenues à l'aide d'un « obturateur » intracavité (système acousto-optique). En sortie, le train d'onde est composé d'impulsions de l'ordre de 100 ps espacées de deux fois la longueur de

cavité, soit une fréquence d'environ 82 MHz. Le système acousto-optique qui génère les impulsions impose de faire fonctionner le laser à une longueur d'onde unique. Celle-ci a été fixée à 514,5 nm afin de pouvoir pomper efficacement le colorant laser (rhodamine 6G). L'énergie moyenne obtenue est d'environ 600 mW. Par construction, ce laser fonctionne en mode TEM₀₀ et est polarisé verticalement.

Le colorant laser utilisé permet d'obtenir une longueur d'onde d'excitation comprise entre 570 nm et 630 nm. Celle-ci peut être sélectionnée grâce un filtre biréfringent. La longueur de cavité du laser à colorant est identique à celle du laser argon ; le pompage est donc synchrone. L'amplification optique au sein du jet de colorant induit une diminution de la durée de l'impulsion sans perte notable d'énergie. La durée d'impulsion obtenue avec le système est de l'ordre de 10 ps.

Un système acousto-optique (Spectra Physics modèle 454) placé dans la cavité du laser à colorant permet d'extraire les impulsions optiques. La fréquence d'extraction est ajustable à des valeurs sous-multiples de la fréquence du laser argon de pompage. Généralement nous avons travaillé avec une fréquence d'excitation de 4 MHz. Cette fréquence, qui correspond à une distance temporelle de 250 ns, permet aux états excités des molécules que nous avons étudiées de relaxer totalement avant l'arrivée d'une nouvelle impulsion. Le faisceau, en sortie du laser à colorant, est de mode TEM₀₀ et est polarisé verticalement.

b. L'excitation

Un séparateur de faisceau placé en sortie du laser à colorant extrait 10 % de l'énergie vers une photodiode rapide. Les impulsions détectées par celle-ci servent de référence temporelle. L'autre partie du faisceau, après passage dans un polariseur Glan Taylor (P1) placé en polarisation verticale, est focalisée par une lentille achromatique (L1) de focale 50 mm sur la cuve contenant l'échantillon.

Pour la configuration d'analyse dans l'UV, en sortie du laser à colorant, est placé un doubleur de fréquence optique (Spectra Physics 390). Ce doubleur permet d'exciter les échantillons à des longueurs d'onde comprises entre 290 nm et 310 nm.

c. La détection

Les photons de fluorescence émis sont collectés par une lentille achromatique (L2) de focale 42 mm. Un achromat (L3) de focale 80 mm focalise le faisceau sur la fente du

monochromateur. Les caractéristiques du couple de lentilles L2/L3 ont été choisies à partir de la taille de la source d'émission (cuve 5x5 mm²), de l'ouverture numérique du monochromateur ($F/\# = 3,5$; $NA = 0,14$) et de la taille de sa fente d'entrée (8x1 mm²) [142]. Le monochromateur a été placé verticalement afin que cette fente soit horizontale (parallèle au plan d'excitation). Un polariseur film UV (P2) est placé entre le couple L2/L3 dans la portion où le faisceau est pseudo-parallèle. Cette disposition garantit une meilleure sélection de la polarisation. Le diamètre du polariseur est de 25 mm. Ce diamètre limite l'ouverture de collection à $F/\# = 1,7$ ($NA = 0,3$) et permet pour la lentille L3 de focaliser l'émission avec une ouverture correspondante de $F/\# = 3,2$, ce qui est en accord avec les spécifications du monochromateur. Le grandissement de l'image est de 1,9, qui permet d'obtenir une image sur la fente de 0,95 mm. Dans ces conditions, le recouvrement de la fente est maximal et la surface du réseau du monochromateur est totalement éclairée.

Le polariseur P2 est motorisé afin de permettre la sélection de l'angle de polarisation. Le monochromateur utilisé est un double monochromateur Jobin-Yvon DH10. Sa conception particulière le rend extrêmement lumineux (le nombre des réflexions internes est limité à deux, une fois sur chaque réseau) tout en lui conservant ses propriétés séparatives.

En sortie du monochromateur, la lumière est focalisée sur un photomultiplicateur de type Hamamatsu H7313 câblé en mode comptage (à une impulsion optique correspond une impulsion électrique). La résolution temporelle (Transit Time Spread: TTS) de ce photomultiplicateur est de 160 ps.

La transmission du monochromateur dépend de la polarisation de la lumière d'entrée. De ce fait, lors de l'accumulation des déclins de fluorescence, une diminution du nombre de coups arrivant sur le détecteur s'opère lors du changement de polarisation de la détection. Ceci introduit un facteur de correction (facteur g) dans la fonction d'anisotropie de fluorescence. Ce facteur dépend de la longueur d'onde transmise par le réseau. Afin de corriger ce facteur instrumental, une lame demi-onde ($\lambda/2$) motorisée a été placée entre le polariseur et le monochromateur. Lors du changement de position du polariseur d'analyse, une rotation de la lame demi-onde rétablit la polarisation d'entrée optimale pour le monochromateur. L'angle de rotation est ajusté en fonction de la longueur d'onde détectée et corrige ainsi la dépendance du facteur g du réseau. Cette méthode permet d'obtenir des pseudo-facteurs g proches de 1. Du point de vue du comptage de photons, elle permet un temps d'acquisition identique pour les déclins verticaux et horizontaux, ce qui garantit une même statistique.

1.2.2. Acquisition des données

Les signaux électriques de la photodiode de référence et du photomultiplicateur de détection sont traités par deux discriminateurs de type DGM-0 et DGM-1 (IPN Orsay). Ces discriminateurs ont un seuil de détection très bas (10 mV), une bande passante très élevée (800 MHz) et une résolution temporelle remarquable (TTS= 11 ps). Ils permettent une excellente détection tout en supprimant le bruit au dessous du seuil, ainsi qu'une dynamique exceptionnelle.

Le principe de la mesure consiste à effectuer une corrélation temporelle entre les photons émis et le temps de référence défini par la photodiode (Figure 21). Cette opération est effectuée par un TAC (Time-to-Amplitude Converter). Ce dernier possède deux entrées, un « START » et un « STOP » ; le « START » déclenche une rampe électrique qui varie linéairement de 0 à 10 V en fonction du temps ; le « STOP » arrête la progression de cette rampe. L'amplitude de variation de la rampe dépend de la différence de temps entre les deux signaux d'entrée. Le déclenchement (« START ») s'effectue lors de la détection par le photomultiplicateur d'un photon de fluorescence. Le signal « STOP » est donné lors de l'arrivée d'un photon d'excitation sur la photodiode. Le taux de comptage étant beaucoup plus bas que le taux d'excitation, le déclenchement n'est pas effectué par le signal de la diode, ceci afin de ne pas saturer l'entrée du TAC. De ce fait, le temps est compté à « l'envers » (le photon émis est corrélé à l'impulsion optique qui suit immédiatement celle de l'excitation).

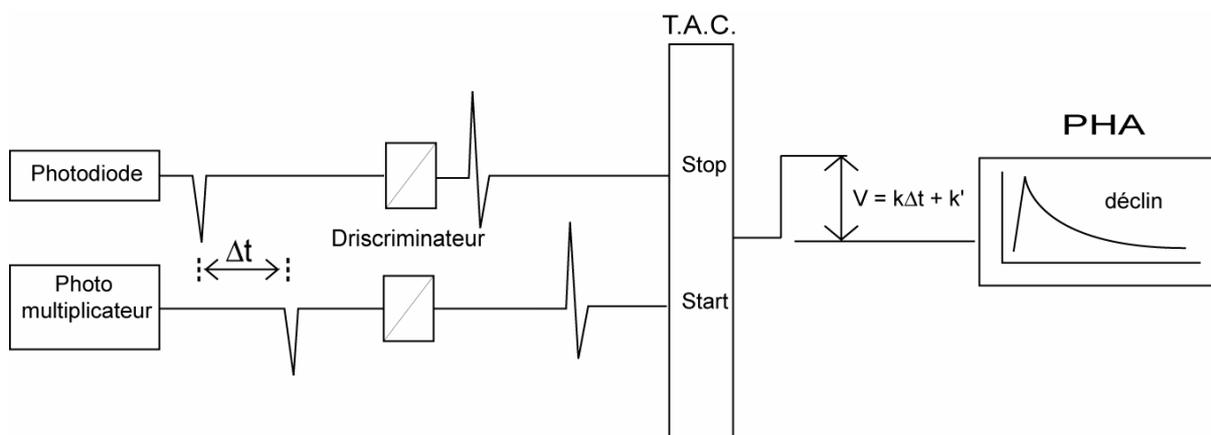


Figure 21: Schéma de la détection

Le signal de sortie du TAC a une amplitude comprise entre 0 et 10 volts, proportionnelle à la différence de temps entre les signaux « START » et « STOP ». Ce signal est transféré vers un PHA (Pulse Height Analyser) d'un analyseur multicanaux Tracor

Northern NS1750 (MCA). Chaque impulsion électrique est comptée comme un événement et rangée en fonction de son amplitude (donc du temps entre l'excitation et l'émission) dans une mémoire de 2048 canaux où chaque canal correspond à un temps de 18 ps. On construit ainsi un histogramme dont la distribution des événements correspond au déclin de fluorescence. Les données sont transférées du MCA au programme d'acquisition.

Afin de rester dans les conditions de comptage de photon unique, le nombre de photons comptés par seconde (ou taux de comptage) doit rester suffisamment faible devant la fréquence d'excitation. L'intensité de la lumière d'excitation est ajustée grâce à un atténuateur variable (filtre neutre) ; les conditions optimales au cours de nos expériences sont de 3000 coups par seconde.

1.3. Mesure des durées de vie et des temps de corrélation.

Comme nous l'avons vu au chapitre I (p 17), l'excitation d'un chromophore par une lumière polarisée induit une photosélection des molécules. L'émission de fluorescence observée contient l'information liée à la réorientation du chromophore. A partir de l'expression des déclins de fluorescence, il est possible de montrer que la contribution de l'anisotropie au déclin s'annule si un terme en « $3\cos^2\theta - 1$ », où θ est l'angle d'observation, s'annule. Ceci correspond à une valeur de $54,73^\circ$. Cet angle est communément appelé « angle magique ».

Les mesures de la durée de vie de fluorescence ont été effectuées en collectant les photons émis pour une polarisation placée à « l'angle magique » (Figure 22 A).

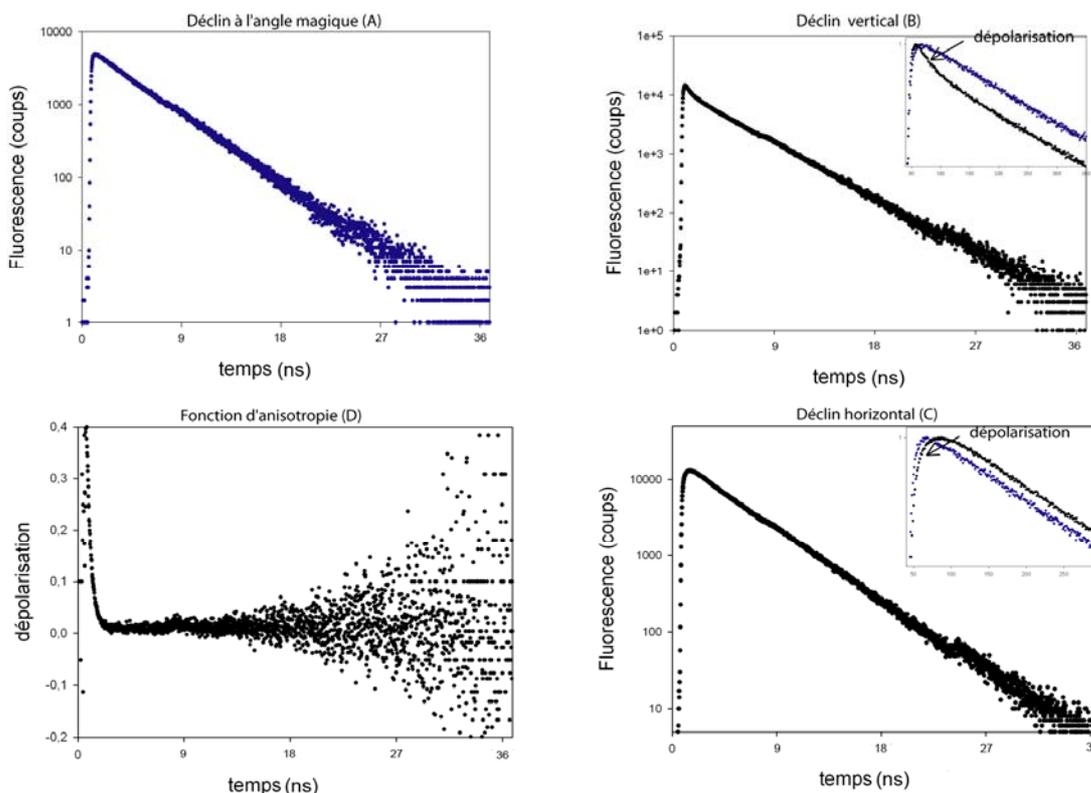


Figure 22 : Déclin de fluorescence et fonction d'anisotropie de la rhodamine 6G

Le déclin pris en polarisation verticale (même polarisation que l'excitation) (Figure 22 B) comporte à la fois une composante d'anisotropie et une composante de durée de vie. La comparaison avec le déclin pris à l'angle magique montre sur les premiers canaux une décroissance plus rapide résultant de la dépolariation rapide du signal de la rhodamine. Le déclin pris en polarisation horizontale (Figure 22 C) présente un retard à l'émission par rapport au déclin pris à l'angle magique. L'apparition des photons suivant la polarisation perpendiculaire à l'excitation provient du seul fait de la rotation des molécules. Plus cette rotation sera lente, plus ce retard sera important. Lorsque toutes les molécules se sont réorientées (milieu isotrope), les déclins « horizontaux » et « verticaux » présentent une pente parallèle à celle du déclin collecté à l'angle magique ; seule la durée de vie de fluorescence contribue au déclin.

La fonction d'anisotropie (Figure 22 D) peut être visualisée à partir des déclins « horizontaux » et « verticaux » grâce à l'équation suivante :

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

Équation 8

Pour une petite molécule comme la rhodamine, la dépolarisation est très rapide. Bien que sur les déclin de fluorescence le processus d'émission aux temps longs ait encore lieu, l'effet de la rotation a disparu sur la représentation de la fonction d'anisotropie.

Expérimentalement, tous les déclin (« angle magique », parallèle et perpendiculaire à la polarisation du faisceau d'excitation) sont collectés durant un même temps d'acquisition. La rotation de la lame demi-onde, en relation avec celle du polariseur d'analyse (P2), garantit une transmission identique du monochromateur pour chaque polarisation. Le profil temporel de l'excitation laser vue par l'ensemble de l'électronique (réponse instrumentale) est obtenu à partir d'une solution diffusante. Pour chaque déclin, on enregistre cette réponse. Celle-ci est collectée avec un taux de comptage identique au déclin associé. L'impulsion laser d'excitation étant infiniment brève (environ 10 ps), la résolution temporelle est déterminée par la réponse du photomultiplicateur et de l'électronique. Dans notre cas, celle-ci est de 160 ps ce qui correspond au TTS du photomultiplicateur.

1.4. Analyse des déclin de fluorescence

Il existe différentes méthodes d'analyse mathématique pour déterminer les paramètres des déclin de fluorescence (*singular value decomposition* [143], *steady-state anisotropy* [144], l'analyse globale [145, 146], *maximum likelihood* [147]...). Ces méthodes utilisent généralement la déconvolution par la fonction instrumentale (pour extraire de l'information aux temps courts), ainsi que l'aspect statistique du comptage. En revanche, elles peuvent différer selon l'approche conceptuelle des durées de vie ou des temps de corrélation, c'est-à-dire selon que l'on a des valeurs discrètes ou des valeurs moyennes de distribution. On peut citer en exemple le cas de l'inhomogénéité du voisinage des tryptophanes au sein d'une protéine qui suggère la possibilité d'obtenir des distributions de durée de vie ou de temps de corrélation [17]. Généralement, la méthode d'analyse va dépendre du système étudié. Dans le cas d'une solution de molécules organiques ou encore de la rotation d'une protéine, l'approche en valeurs discrètes est probablement plus justifiée. D'autres méthodes mathématiques sont basées sur des concepts statistiques beaucoup plus élaborés (« maximum entropie » [148]). Dans tous les cas, le choix de la méthode se fait selon l'objet d'étude et reste de toute façon bien souvent subjectif.

Par rapport à l'objet d'étude, l'analyse en valeurs discrètes nous a semblé plus pertinente. Nous avons utilisé une méthode de régression non linéaire basée sur l'algorithme de Marquardt [149, 150] combinée avec un algorithme de régression linéaire par décomposition singulière. Ce programme est basé sur une méthode d'ajustement itérative des paramètres. On introduit des valeurs initiales des constantes temps, qui correspondent à celles estimées pour le déclin à analyser afin de calculer la convolution de chaque exponentielle avec la fonction instrumentale enregistrée [151]. L'amplitude de chacune des exponentielles est calculée par régression linéaire, en tenant compte de la statistique de Poisson du déclin expérimental. Le calcul de gradient, effectué par l'algorithme de Marquardt, ajuste les paramètres non linéaires (les constantes de temps) afin de minimiser le critère statistique de χ^2 . L'ensemble de cette séquence d'ajustement est répété jusqu'à ce que le minimum du critère statistique soit atteint. Le critère statistique utilisé en comptage de photon est un élément déterminant. La sommation d'événements quantiques suit une distribution de Poisson ; ceci signifie qu'il existe une relation entre le nombre d'événements mesurés et l'écart type de la mesure de ce nombre. En fait, plus simplement, pour toute sommation d'événement N , l'écart type statistique de la somme correspond mathématiquement à \sqrt{N} . Dans ces conditions, le test statistique de l'ajustement s'écrit :

$$\chi^2 = \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n \frac{f(x_i)_{ex} - f(x_i)_{sim}}{\sqrt{f(x_i)_{ex}}} \right)^2$$

Équation 61

avec :

- $f(x_i)_{ex}$ le nombre d'événements enregistrés dans le canal i ,
- $f(x_i)_{sim}$ le nombre d'événements calculés par ajustement pour ce même canal,
- N le nombre de canaux.

La valeur théorique du test de χ^2 pour un ajustement parfait est, dans ces conditions, de 1.0. Expérimentalement, l'obtention d'une valeur inférieure à 1,0 signifie que l'ajustement est bon, mais que la statistique au sens de Poisson est mauvaise ; une valeur supérieure à 1,0 correspond généralement à un mauvais ajustement. Toutefois, la valeur du χ^2 est une moyenne ne rendant pas compte de la distribution du résidu. Pratiquement, c'est la distribution du résidu, c'est-à-dire la valeur pour chaque canal de la différence pondérée par

l'écart type, qui sert de critère. Effectivement, le test est extrêmement sensible au moindre défaut ; la distribution du résidu peut être parfaite, mais si une valeur dans un canal est fautive, le χ^2 augmente considérablement.

D'autres critères statistiques sont utilisés, comme par exemple la fonction d'autocorrélation du résidu ou encore le paramètre de Durbin-Watson [152]. Ces tests restent toutefois assez peu significatifs par rapport au χ^2 .

En dehors de l'ajustement des constantes de temps et de leurs amplitudes, le programme permet celui du bruit de fond, du décalage temporel entre la fonction instrumentale et le déclin ainsi que l'introduction d'un paramètre de diffusion. Il permet en outre d'effectuer des ajustements simultanés de plusieurs déclins.

L'analyse des données d'anisotropie est effectuée selon la même méthode. Le programme ajuste simultanément les déclins enregistrés aux polarisations verticale et horizontale. Les valeurs des durées de vie et leurs amplitudes sont obtenues à partir du déclin à l'angle magique. Le facteur g de pondération des polarisations peut être ajusté automatiquement ; l'utilisation de la lame demi-onde dans les expériences avec le monochromateur nous permet d'obtenir systématiquement des valeurs très proches de 1,0.

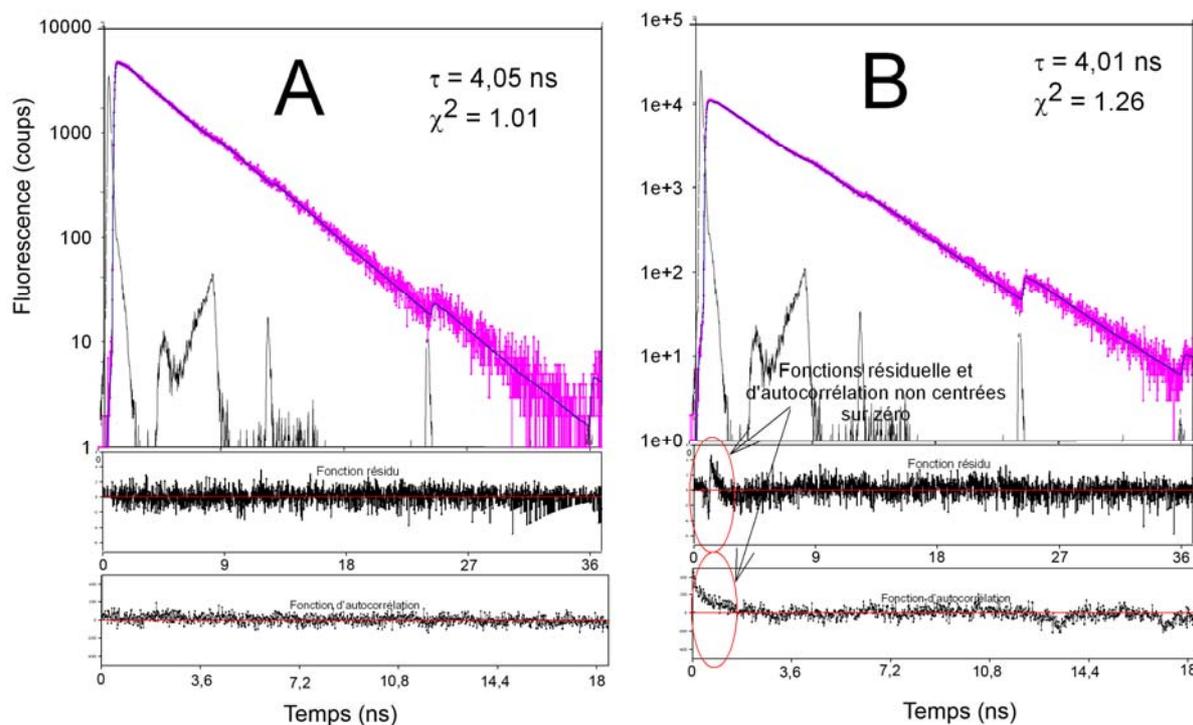


Figure 23 : Comparaison des résultats obtenus entre deux déclins de rhodamine. En rose la fonction le déclin expérimentale, en noir la fonction instrumentale et en bleu la fonction ajustée

La Figure 23 est un exemple d'analyse de données. Les deux déclinés présentés ont été pris à l'angle magique et la durée de vie a été calculée. Pour le déclin A, χ^2 est très proche de 1 et les fonctions résiduelle et d'autocorrélation sont bien centrées sur zéro. Le résultat de durée de vie unique de 4,05 ns est donc validé. Pour le déclin B, χ^2 est de 1,26 : l'ajustement peut être estimé comme bon. Pourtant, la fonction d'autocorrélation et la fonction résiduelle ne sont pas centrées sur zéro. Néanmoins la durée de vie calculée est bonne. Cet exemple illustre bien la complexité de l'interprétation des résultats.

Ensuite il faut vérifier le sens physique des résultats obtenus. Pour ce faire, il existe des méthodes comme le maximum d'entropie [148, 153]. Si les déclinés ne sont composés que d'une seule durée de vie obtenue pour un fluorophore connu, le recours à ces méthodes n'est pas nécessaire. Les résultats peuvent être critiqués par comparaison avec des résultats théoriques et avec leur reproductibilité.

2. Mesure des concentrations de surface

Les techniques d'analyse utilisant le radiomarquage sont d'une grande sensibilité ; elles permettent l'utilisation de solutions très diluées. Pour cette raison, elles sont couramment utilisées pour l'étude de l'adsorption de protéines sur des surfaces.

Le radio-isotope utilisé dans le cadre de ces travaux est ^{125}I . ^{125}I émet un rayonnement γ et a une demi-vie de 1440 heures soit environ 60 jours.

2.1. Marquage des protéines par ^{125}I

Le marquage des protéines est effectué par addition de Na^{125}I dans la solution de protéines en présence d'un catalyseur immobilisé sur des billes de polystyrène (Iodo-beads, Pierce). Elles présentent l'avantage de pouvoir être utilisées sur une large plage de pH et d'être des oxydants plus doux que la chloramine T. Les iodo-beads vont oxyder $^{125}\text{I}^-$ en « $^{125}\text{I}^+$ » qui réagit sur le cycle aromatique des tyrosines suivant un mécanisme de substitution électrophile (Figure 24).

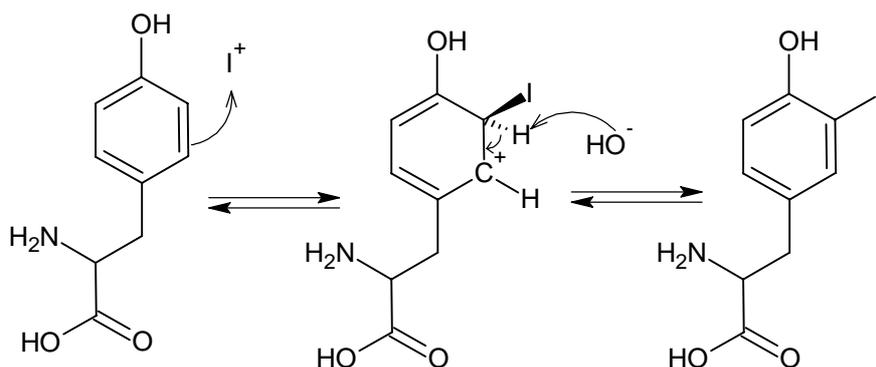


Figure 24 : Mécanisme réactionnel de l'iodation de la tyrosine

Le mode opératoire du marquage est décrit dans l'annexe 2.

2.2. Dispositif instrumental

Le dispositif expérimental représenté Figure 25 a été mis au point par E. Vasina et Ph. Déjardin [100, 119]. Il est composé d'un pousse seringue (Harvard apparatus) dont la vitesse est programmée afin d'avoir le flux de convection désiré dans la cellule. En sortie, le débit est contrôlé par une balance Mettler PM2000.

La radioactivité dans la cellule est détectée par un photomultiplicateur (XP2102B Quartz & Silice). L'acquisition des données de radioactivité est effectuée par un logiciel développé par Canberra & Co.

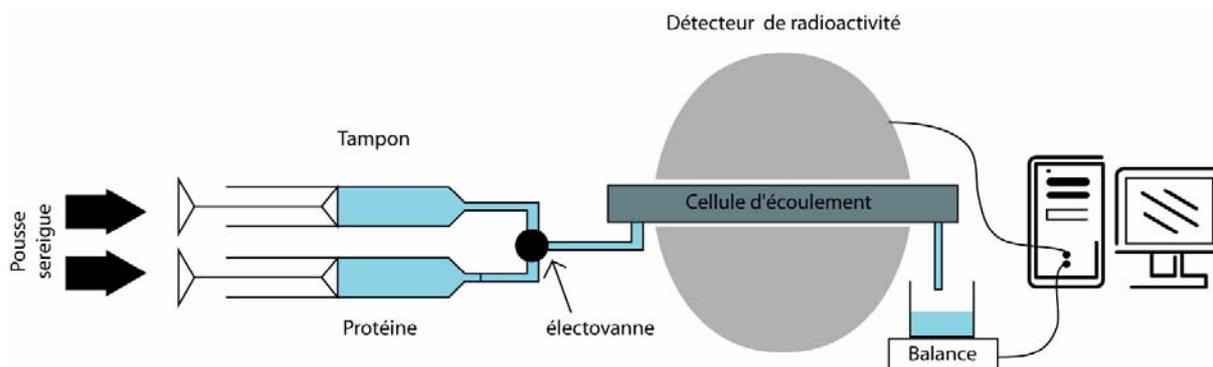


Figure 25 : Dispositif expérimental pour les mesures de concentration de surface

La géométrie de la cellule d'écoulement est de type fente (Figure 26). Elle est composée de deux parties en polyméthylméthacrylate sur lesquelles sont placées les surfaces à étudier. L'espacement entre les surfaces d'études est déterminé par un film de paraffine (Parafilm « M », Chicago, IL).

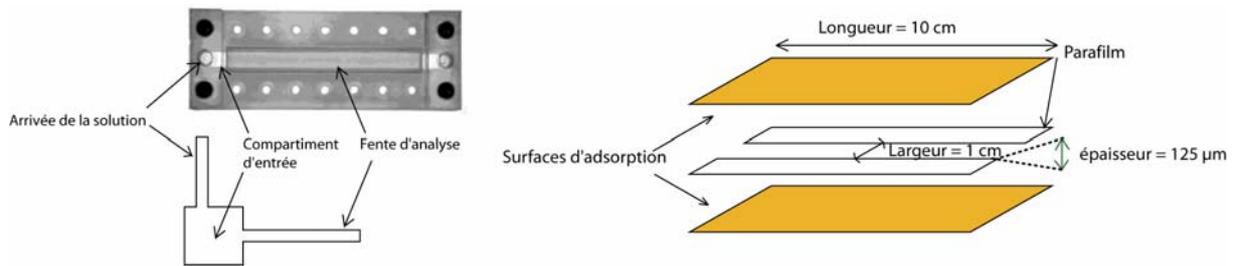


Figure 26 : Cellule d'écoulement utilisée pour les expériences d'écoulement en radiodétection

La détection est limitée à la partie centrale de la cellule d'écoulement en plaçant une plaque de plomb disposant d'une fenêtre de largeur 4 mm et de longueur 3 cm.

2.3. Détermination de la concentration interfaciale et des cinétiques apparentes d'adsorption et désorption.

La Figure 27A représente une expérience type d'étude de cinétique d'adsorption. Dans un premier temps, les surfaces sont conditionnées par passage de solution tampon. De plus cette opération permet de mesurer le bruit de fond. Ensuite lors du passage de la protéine marquée, deux phases peuvent être observées. La première est une augmentation rapide du signal correspondant au remplissage de la cellule en protéine radiomarquée. La seconde est une augmentation progressive de l'activité résultant de l'adsorption des protéines à la surface. C'est à partir de cette étape que seront déterminés les paramètres de l'adsorption. Si les protéines ne s'adsorbaient pas sur la surface, la courbe obtenue lors de cette étape serait une droite horizontale. A la fin de l'adsorption, un rinçage est effectué. La radioactivité chute pour atteindre le niveau dû aux seules protéines adsorbées. Cette étape permet de déterminer les paramètres de désorption. Il est aussi possible de faire circuler une solution de protéines non marquées, afin d'observer les phénomènes d'échange.

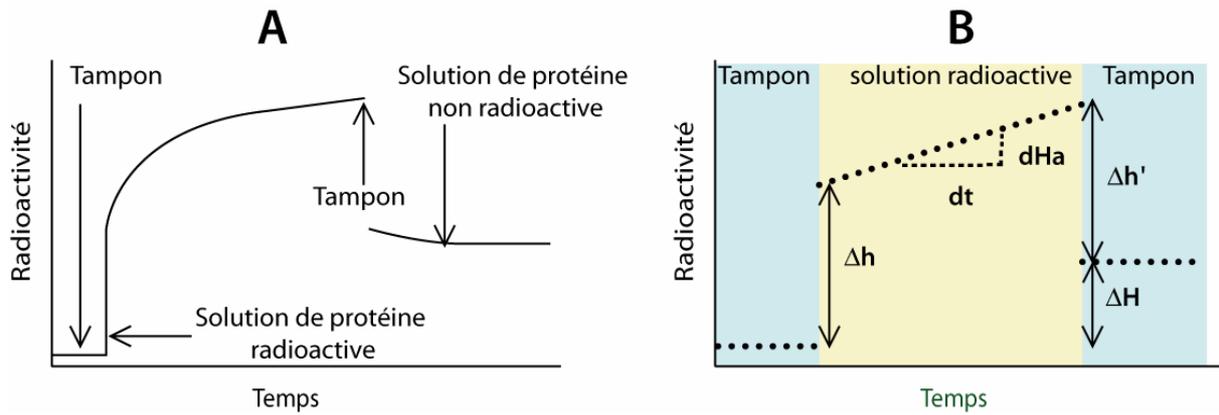


Figure 27: Cinétique d'adsorption. A : Courbe obtenue pour une expérience type. B : courbe d'adsorption théorique

La concentration interfaciale est déterminée par une méthode graphique [154]. Les radioactivités A_v dans le volume et A_s en surface (Équation 62) sont directement proportionnelles à la quantité de protéine. A_v est relié au saut initial ou final (Δh ou $\Delta h'$) de radioactivité.

$$A_v = A_{sp} L l h C_b f_e \quad \text{et} \quad A_s = 2 A_{sp} L l \langle \Gamma \rangle f_e$$

Équation 62

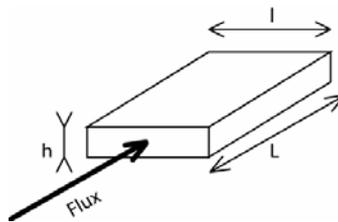


Figure 28 : Schéma de fente d'adsorption

Avec A_{sp} l'activité spécifique du radiomarqueur, L et l respectivement la longueur et la largeur de la fenêtre d'observation, h la hauteur de la fente d'écoulement, f_e le facteur d'écrantage (surface d'étude et cellule) et de géométrie (position de la fenêtre par rapport au cristal du détecteur), C_b la concentration de protéine en solution et $\langle \Gamma \rangle$ la concentration interfaciale.

Le rapport entre les activités à la surface et en solution peut s'écrire sous la forme :

$$\frac{A_s}{A_v} = \frac{2 \langle \Gamma \rangle}{h C_b} = \frac{\Delta H}{\Delta h'}$$

Équation 63

La concentration interfaciale est déterminée par l'équation suivante :

$$\langle \Gamma \rangle = \frac{1}{2} h C_b \frac{\Delta H}{\Delta h'}$$

Équation 64

La constante d'adsorption k (Équation 65) peut aussi être estimée en connaissant la géométrie de la cellule sans avoir à connaître la concentration en solution. (Équation 66)

$$k = \frac{1}{C_b} \frac{d\Gamma}{dt}$$

Équation 65

$$k = \frac{h}{2} \frac{1}{\Delta h'} \frac{dH_a}{dt}$$

Équation 66

3. Conclusion

Dans ce chapitre ont été présentées deux méthodes d'étude très différentes : la spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps qui permet d'une part de définir les propriétés de fluorescence d'un chromophore et d'autre part d'obtenir des informations sur sa mobilité, et la technique de détection des radio-éléments qui permet de suivre, sous flux, le processus d'adsorption d'une protéine sur une surface.

L'association d'une protéine à une sonde fluorescente bien choisie devrait permettre de disposer d'une protéine marquée modèle pour l'étude de la cinétique d'adsorption par fluorescence. Toutefois, l'utilisation du mode confocal pour effectuer des mesures de temps de corrélation étant nouvelle, il faudra que les résultats obtenus dans ce mode soient confrontés à ceux des mesures obtenues dans une configuration optique classique.

La technique de détection des radio-éléments va être utilisée pour les études de cinétique d'adsorption de la protéine modèle sur le mica ; les résultats obtenus seront comparés avec ceux réalisés par fluorescence en mode focale.

Chapitre III. Modèle protéique d'étude : marquage de l'avidine par l'alexa fluor 594

Dans le premier chapitre, nous avons décrit les propriétés fondamentales des protéines et identifié les principales contraintes imposées par les méthodes d'étude. Nous avons vu notamment que la fluorescence naturelle des protéines est souvent complexe et que l'information sur sa mobilité rotationnelle est, dans ces conditions, généralement ambiguë. Cela nous a convaincus qu'il était indispensable, compte tenu de notre objectif, de concevoir une protéine dite « modèle » : si nous sommes libérés des difficultés liées à la protéine, l'optimisation de la méthode et l'interprétation des résultats seront simplifiés.

Dans ce chapitre, nous décrivons la protéine modèle que nous avons choisie ainsi que les différents marquages fluorescents que nous avons réalisés. Les résultats des études de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence résolue dans le temps effectuées dans chacun de ces cas sont présentés et discutés.

1. Contraintes et objectifs du modèle protéique

Le modèle protéique doit être facilement observable et simple à étudier du point de vue mathématique. Les tryptophanes ont plusieurs durées de vie de fluorescence. De plus, les protéines en possèdent plusieurs qui ont tous des environnements différents. De ce fait, l'utilisation de la fluorescence intrinsèque des protéines ne peut être utilisée, au moins dans les premières étapes de mise au point des méthodologies. Les contraintes sont donc d'avoir une protéine qui fluoresce dans le spectre de la lumière visible avec une durée de vie unique et un rendement quantique élevé. De plus la sonde fluorescente doit rendre compte uniquement du mouvement de la protéine avec si possible un seul temps de corrélation. Par conséquent, ces contraintes nous ont poussés à sélectionner une protéine qui se rapprochera le plus possible d'une sphère.

Au niveau de l'étude des interactions surface/protéine, la protéine utilisée doit préférentiellement faire partie des protéines dures. Elle doit être globulaire. Sa structure doit être parfaitement stable à pH physiologique. La protéine et le marqueur devront être dans la mesure du possible peu photosensibles.

Les protéines fluorescentes commerciales ne remplissent pas exactement ce cahier des charges. L'utilisation classique de marqueur fluorescent pose le problème de la libre rotation du fluorophore, ne rendant pas toujours compte du mouvement de la protéine (chapitre I p 49). La solution que nous avons envisagée est d'utiliser une protéine disposant d'un site capable de complexer des petites molécules fluorescentes facilement modifiables.

2. L'avidine

L'avidine est une glycoprotéine de masse molaire 66 KDa extraite du blanc d'œuf, purifiée et caractérisée par Green en 1963 [155]. Sa particularité réside dans le fait qu'elle possède une affinité (p 86) très grande ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) pour la biotine (vitamine B7) [45]. C'est une protéine composée de quatre monomères de masse molaire 16,5 KDa, identiques, formés de 128 résidus d'acides aminés [156]. Chaque monomère possède un site pouvant complexer la biotine. La taille de l'avidine est de $5,6 \times 5,0 \times 4,6 \text{ nm}^3$ sous sa forme cristallisée. [157]. Les quatre-sous unités, lorsqu'elles sont associées, confèrent à la protéine une symétrie moléculaire de type 222, qui permet de l'assimiler globalement à une sphère. L'avidine est

une protéine basique dont le point isoélectrique se situe autour de 10,4 [158]. Elle compte parmi ses acides aminés quatre tryptophanes par sous-unité lui conférant les propriétés spectrales suivantes :

Nombre de tryptophanes par sous unité : 4
Coefficient d'extinction molaire à 282 nm : $96000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Maximum d'absorbance : 282 nm
Rendement quantique : 0,14 [159]

Tableau 5 : caractéristiques luminescentes de l'avidine [46]

La mesure de l'émission de fluorescence des tryptophanes fait apparaître pour l'avidine un maximum d'émission à 344 nm (Figure 29). Le déclin de fluorescence enregistré se décompose en trois durées de vie de fluorescence : 3,12 ns, 1,36 ns et 0,37 ns donnant une durée de vie moyenne de 1,69 ns.

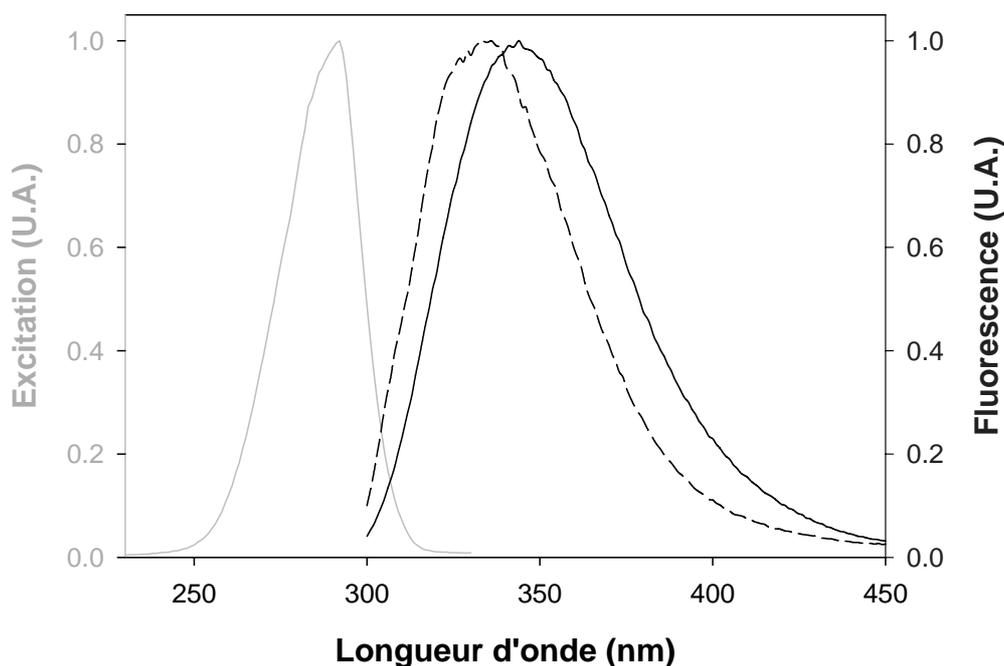


Figure 29 : Spectre d'absorbance et d'émission de fluorescence de l'avidine et du complexe avidine-biotine.
 En gris (trait continu), le spectre d'excitation de fluorescence de l'avidine. En ligne noire continue, le spectre d'émission de fluorescence de l'avidine. En pointillé noir, le spectre d'émission de fluorescence du complexe avidine-biotine.

Une autre particularité de l'avidine est sa stabilité dans des conditions pouvant être qualifiées d'extrêmes. L'avidine commence à se dénaturer à un pH inférieur à 2 ou supérieur

à 13. Elle résiste aux agents dénaturants tels que l'urée 8 M ou la guanidine 3 M [160]. La stabilité thermique de l'avidine est aussi remarquable dans la mesure où elle perd son activité biologique à 85°C [161, 162].

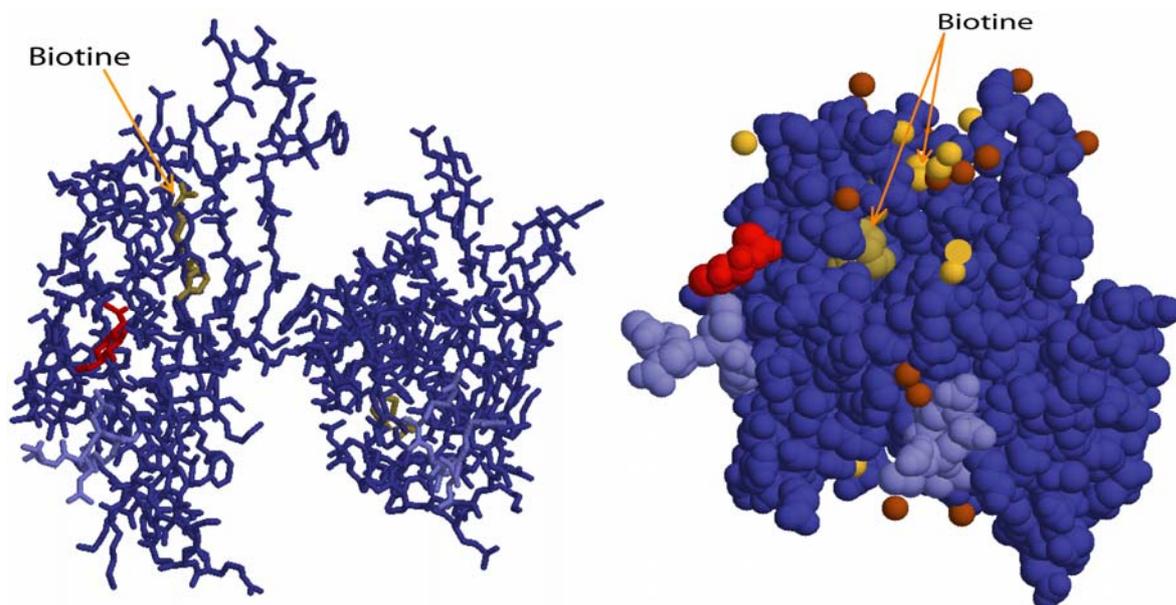


Figure 30 : Structure tridimensionnelle d'un dimère d'avidine contenant de la biotine [163]. En bleu marine, la chaîne polypeptidique, en bleu clair la chaîne N-acetyl-D-glucosamine (partie glycosylée).

2.1. Interaction avidine-biotine

L'affinité de l'avidine pour la biotine a longtemps laissé penser qu'il se formait au niveau du site actif une liaison covalente entre la protéine et son substrat. En réalité, la biotine est complexée à l'intérieur du site récepteur de l'avidine. La stabilité du complexe ainsi formé résulte d'interactions hydrophobes et hydrophiles entre les acides aminés du site de complexation de l'avidine et la biotine (Figure 31).

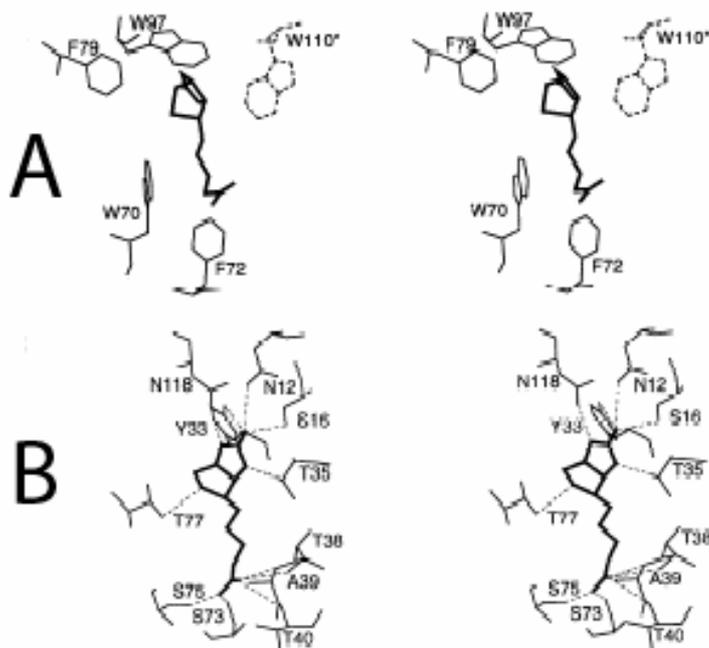


Figure 31 : Interaction hydrophobe (A) et hydrophile (B) entre la biotine et les acides aminés de l'avidine constitutifs du site de reconnaissance de la biotine [164]

Les travaux de Livnah et *al.* [164], décrivent les interactions entre les résidus composant le site de fixation de la biotine et cette dernière. Onze résidus sont impliqués dans des interactions hydrophiles liant la biotine par formation de liaisons hydrogènes (Figure 31 B). Les interactions hydrophobes résultent de la présence de cinq acides aminés aromatiques (Figure 31 A) trois tryptophanes (W97 et W70 et W110) [165] et deux phénylalanines (F79 et F72).

L'interaction de la biotine avec les tryptophanes de l'avidine va modifier les propriétés spectroscopiques de l'avidine [45]. La longueur d'onde du maximum d'émission de fluorescence mesurée pour l'avidine libre est de 344 nm ; sa valeur est déplacée à 333 nm en présence de biotine (Figure 29). Ce décalage de 10 nm peut être interprété par une modification de l'environnement des tryptophanes notamment par un changement de polarité résultant de la complexation de la molécule de biotine. La complexation abaisse le rendement quantique de 0,135 à 0,089 [166] (diminution de 30%), ce qui est confirmé par le fait que la durée de vie moyenne de fluorescence diminue aussi [51], passant de 1,69 ns à 0,96 ns.

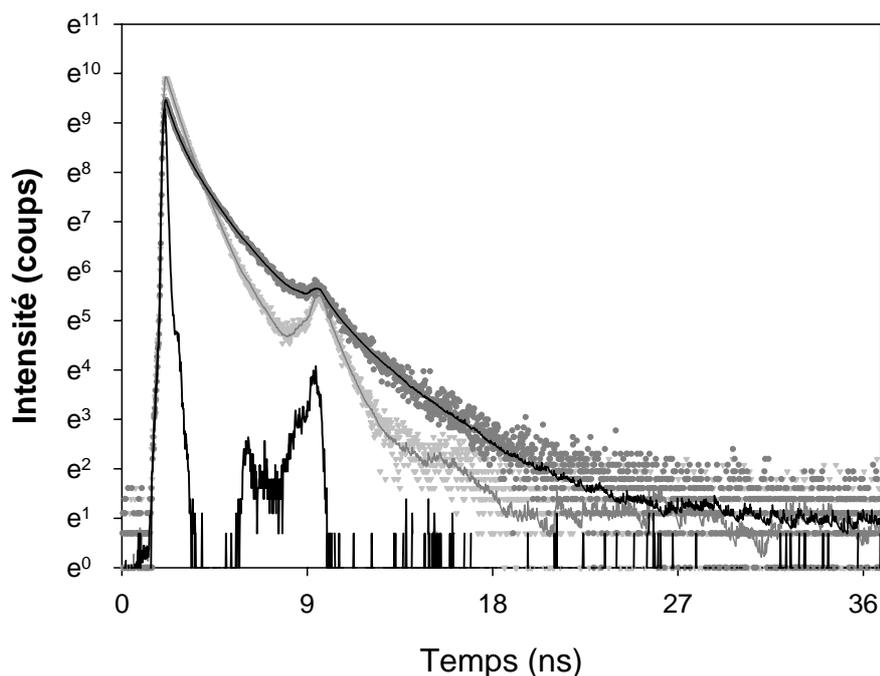


Figure 32 : Déclin de fluorescence de l'avidine et de l'avidine-biotine pris à l'angle magique (sans contribution d'anisotropie). En gris : le déclin de fluorescence expérimental (point) et la courbe ajustée (ligne) de l'avidine-biotine. En noir le déclin de fluorescence expérimental (point) et la courbe ajustée (ligne) de l'avidine seul.

Les mesures, effectuées au laboratoire en présence d'un excès de biotine (Tableau 6), montrent que parmi les trois composantes de durée de vie de l'avidine, les deux plus longues sont réduites, passant de 3,12 ns à 2,65 ns et de 1,36 à 1,04 ns.

	τ_{moy} (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	A_1	A_2	A_3	χ^2
Avidine	1,69	3,12	1,36	0,372	0,095	0,435	0,471	1,081
Avidine-biotine	0,96	2,65	1,04	0,439	0,011	0,565	0,424	1,11

Tableau 6 : Durées de vie et facteurs pré-exponentiels pour l'avidine et l'avidine-biotine

Certains travaux ont utilisé cette propriété pour étudier l'interaction d'analogues de la biotine [165] avec l'avidine, ou pour évaluer l'influence de la modification d'un acide aminé constitutif du site de complexation (chapitre I p 42).

La biotine influe aussi sur la stabilité de la structure quaternaire de l'avidine. Elle diminue la sensibilité à la température et à certaines protéases [49]. Des études ont porté sur la modification ou le remplacement des acides aminés impliqués dans les interactions

stabilisatrices de la structure quaternaire. Ces modifications avaient pour objectif principal d'obtenir des monomères d'avidine [49, 167]. Toutes ces études ont montré qu'en présence de biotine, les monomères modifiés reforment la structure tétramérique de l'avidine.

2.2. Les différents marquages possibles ; le choix du marqueur

Le marquage des protéines par des fluorophores est généralement effectué grâce à des liaisons chimiques *via* les fonctions amines accessibles se trouvant à la surface de la protéine. Cette méthode simple pose toutefois des problèmes pour les études d'anisotropie de fluorescence (chapitre I p 49). En effet, la localisation des sondes fixées n'est pas prévisible. L'environnement des fonctions amines étant différent, les fluorophores ainsi fixés peuvent avoir des propriétés photophysiques différentes. Pour finir, cette méthode peut entraîner une modification structurale des protéines.

L'interaction forte avidine/biotine permet d'envisager de rendre l'avidine fluorescente par l'intermédiaire d'un marqueur fluorescent qui sera lié de façon covalente à la biotine. L'espacement entre les deux molécules (marqueur et biotine) doit être tel que, après la complexation avidine/biotine, le chromophore soit assez proche de l'avidine. De plus, les quatre sites de fixation de la biotine étant équivalents, si plusieurs marqueurs se fixent sur la protéine, ils auront tous un environnement identique. Cette stratégie de marquage n'est pourtant pas aussi simple que ce qui vient d'être évoqué. Il est important de prendre en compte des difficultés annexes, comme en particulier l'extinction de fluorescence d'un certain nombre de chromophores en présence d'avidine.

2.2.1. Extinction de fluorescence par l'avidine

En présence d'avidine, on observe une extinction de fluorescence plus ou moins importante pour certains marqueurs fluorescents lorsqu'ils sont conjugués avec de la biotine. C'est le cas notamment de la fluorescéine [168, 169] ou de la rhodamine biotinylée lorsqu'elle est espacée de la biotine par 14 atomes. Cette propriété est utilisée pour déterminer le nombre de sites de fixation de la biotine restant après l'ajout d'une biotine modifiée [170-172]. Un certain nombre de travaux ont été effectués, soit pour éviter l'extinction de fluorescence, soit au contraire pour la renforcer afin de faciliter les dosages.

La synthèse de ces travaux montre que l'extinction de fluorescence est liée à deux paramètres :

- **la distance entre l'avidine et le chromophore.** En intercalant une chaîne de Polyéthylène glycol suffisamment longue entre la sonde fluorescente et la protéine [173, 174], l'émission de fluorescence n'est pas altérée. A l'inverse, quand le fluorophore est très proche de l'avidine, l'extinction de fluorescence est beaucoup plus importante. Ce résultat a été mis en évidence par les travaux de Gruber et al. [82].
- **la nature des chromophores** [175]. Ceux-ci ne se comportent pas tous de la même façon en présence d'avidine. L'émission des sondes fluorescentes de la famille des ATTO et des Alexa n'est que peu ou pas diminuée par la présence d'avidine [83]. Les chromophores de cette famille sont ceux qui seront principalement évalués pour répondre aux objectifs de marquage que nous nous sommes fixés dans ce travail.

2.2.2. Choix du marqueur et distance

Pour effectuer le marquage correspondant au modèle que nous avons défini, nous avons considéré deux aspects :

- **la longueur de chaîne** entre la biotine et le chromophore,
- **les propriétés photophysiques** du chromophore.

Afin de rendre compte uniquement du mouvement de la protéine, le fluorophore doit être assez proche de l'avidine. De ce fait, la chaîne qui sépare la biotine et le marqueur doit être assez courte. Gruber et al. [176] ont décrit la synthèse d'une fluorescéine espacée de la biotine par 4 atomes (Figure 33) qui satisferait cette condition.

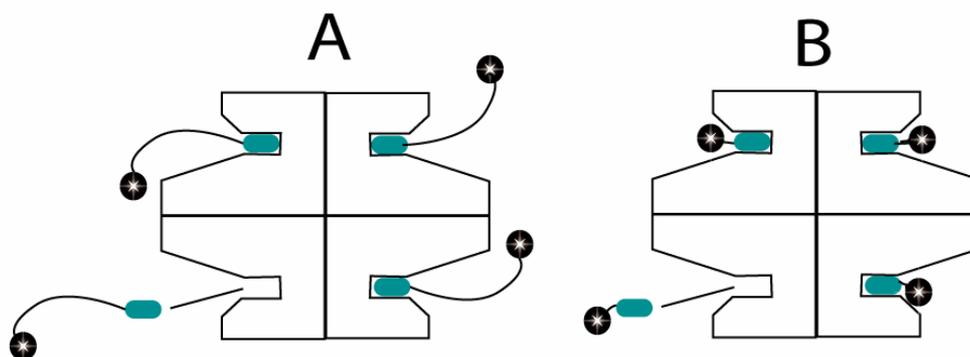


Figure 33 : Modèle proposé par Gruber et al. de l'interaction entre l'avidine et la biotine fluorescente conjuguée. A : ligand long (14 atomes) B, ligand court (4 atomes)

Du point de vue photophysique, la durée de vie de fluorescence de la sonde doit être suffisamment longue pour permettre de déterminer le temps de corrélation d'une protéine de 66 KDa. Enfin, la longueur d'onde d'excitation doit être compatible avec la source lumineuse du dispositif optique utilisé pour les mesures.

Parmi les marqueurs disponibles, ceux de la famille des Alexa Fluor commercialisés par Molecular Probes [79] sont particulièrement intéressants. Leur rendement quantique est très élevé [177] et ils sont, comme déjà souligné plus haut, peu sensibles à l'avidine. Ils existent commercialement sous la forme de « kit » de marquage. La plage de longueur d'onde d'absorbance de l'alexa fluor 594 est en adéquation avec la plage de longueur d'onde du laser à colorant rhodamine 6G (Figure 34).

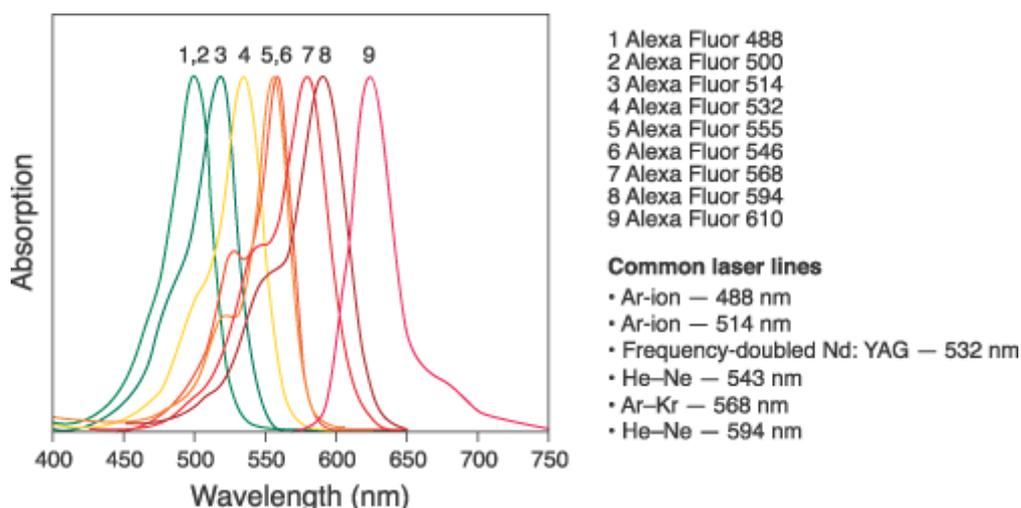


Figure 34 : Spectres d'absorbance des fluorophores de la Série des Alexa Fluor commercialisés par Molecular Probes [79]

L'alexa Fluor 594 est un chromophore utilisé en imagerie confocale pour sa grande stabilité photophysique. Son rendement quantique, que nous avons estimé à 0,8 (en solution

de tampon phosphate), est élevé. Son maximum d'absorbance est situé à 587 nm (Figure 35 A) ($\epsilon_{587} = 78000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Le maximum de l'émission de fluorescence est à 610 nm (Figure 35 B).

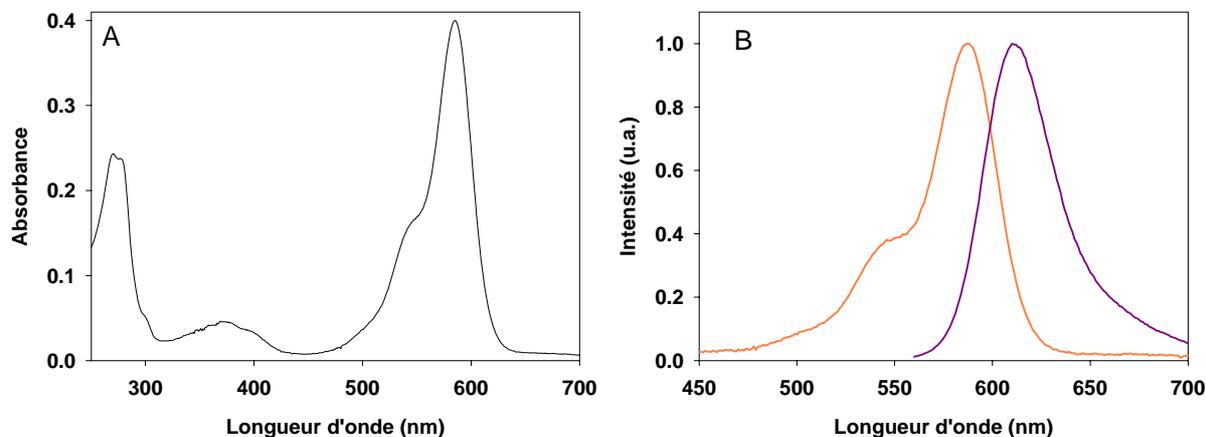


Figure 35 : (A) spectre d'absorbance et (B) spectre d'excitation (rouge) et d'émission (violet) de fluorescence de l'alexa fluor 594

Les mesures de durée de vie de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence résolues dans le temps font apparaître une durée de vie unique de 3,8 ns ainsi qu'un seul temps de corrélation de 327 picosecondes (Figure 36).

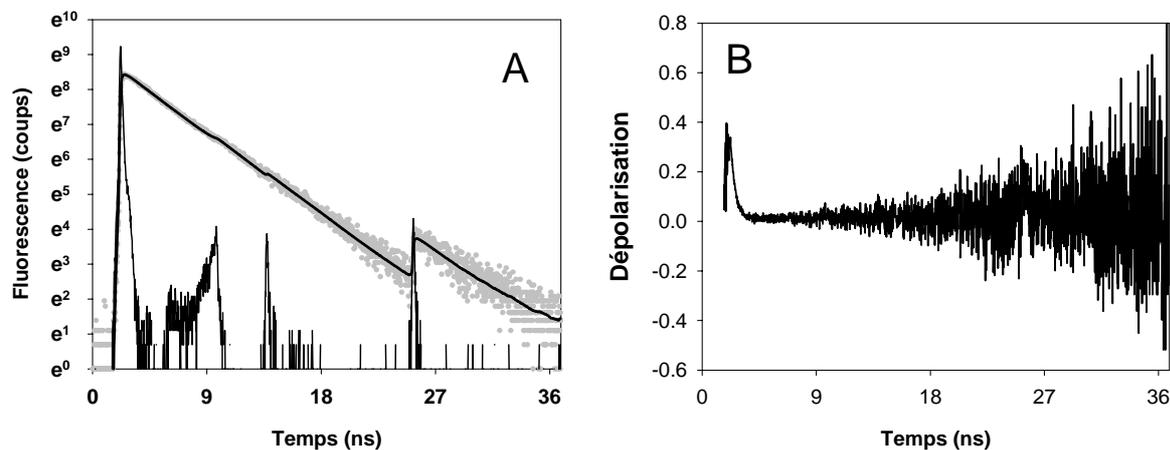


Figure 36 : Spectres de l'alexa fluor 594. A : Déclin de fluorescence à l'angle magique et fonction d'ajustement monoexponentiel. B : fonction d'anisotropie de fluorescence.

A faible concentration, l'émission de fluorescence est proportionnelle à la concentration du chromophore (Figure 37). Cette information sera très utile par la suite pour donner des valeurs de concentration lors des visualisations de flux.

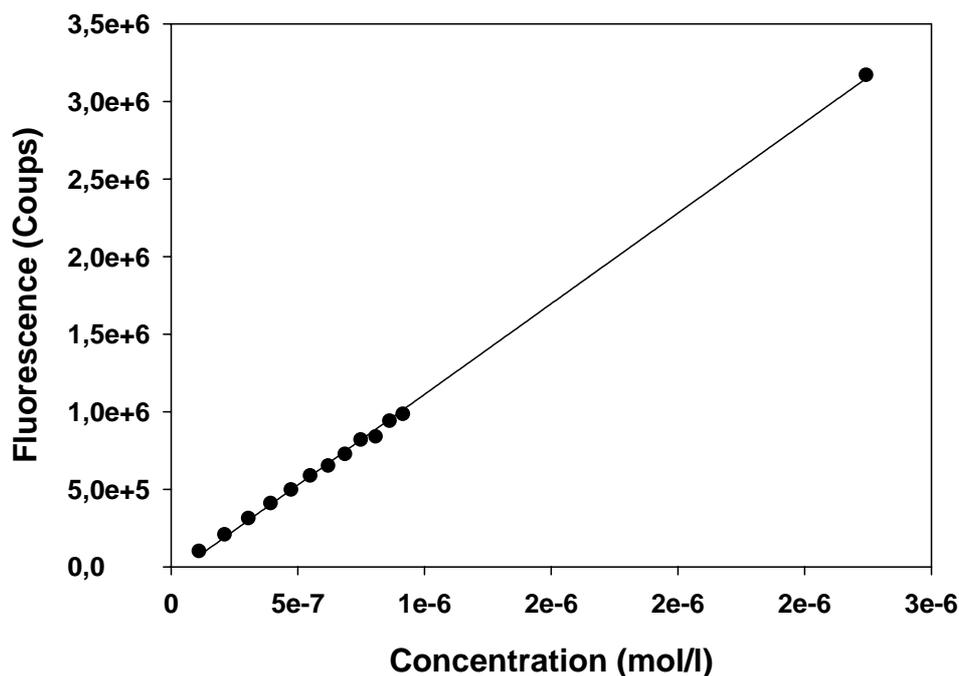


Figure 37 : Evolution de l'intensité d'émission de fluorescence de l'alexa fluor 594 en fonction de sa concentration

Sous forme commerciale, l'alexa fluor 594 est un mélange de deux isomères (Figure 38). L'isomère majoritaire est la forme 1-4 (65%) tandis que la forme 1-3 est présente à 25%. Le reste (10%) est composé de fluorophores ne possédant pas de fonction succinimide, résidus de réaction et de solvant (Correspondance Molecular Probes).

3. Marquage de l'avidine

Nous avons effectué et étudié trois marquages différents (annexe 2) de l'avidine. L'Alexa Fluor 594 possède une fonction succinimidyl ester en position 3 ou 2 du groupement pentacène. Cette fonction est un acide carboxylique activé permettant de former, par condensation avec une fonction amine, une liaison amide dans des conditions légèrement basiques en milieu aqueux. C'est la raison pour laquelle les sondes servant à marquer les protéines sont généralement vendues sous cette forme.

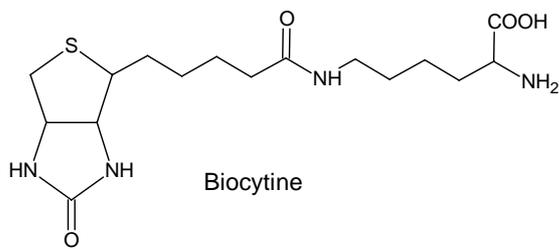
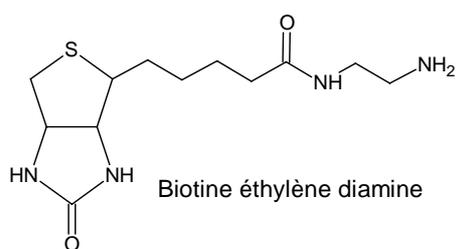
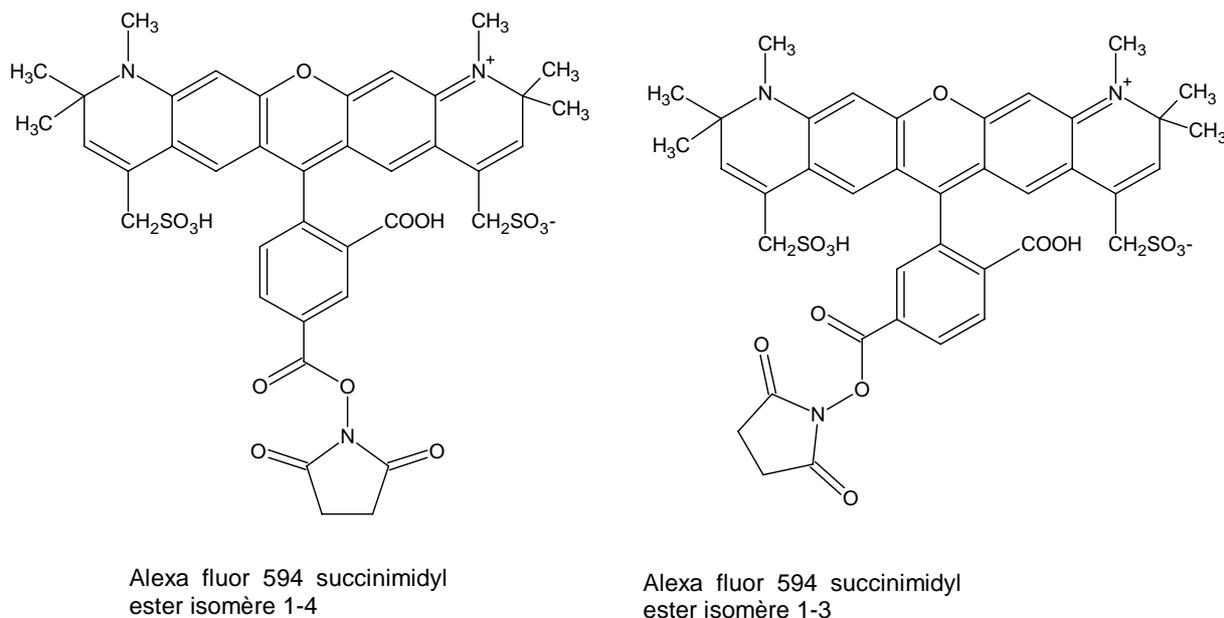


Figure 38 : Formule chimique de l'alexa, et des dérivés de biotine

Le premier marquage, dit « marquage direct » (A-al) (Figure 39 A), consiste à condenser la sonde directement avec la protéine. Dans ces conditions, l'alexa se fixe sur une fonction amine primaire d'une lysine disponible en surface de la protéine. Le second marquage (Figure 39 B) se fait par l'intermédiaire de la biotine éthylènediamine préalablement liée à l'alexa (A-B4al). Dans ce cas, 4 atomes sont intercalés entre le marqueur et la biotine, conformément au modèle décrit par Gruber et Al. [176]. Le dernier marquage a été effectué *via* la biocytine (A-B7al). La biocytine est un dérivé de la biotine sur lequel a été fixé un résidu lysine. Généralement cette molécule est utilisée dans la synthèse de dérivés de biotine conjugués [172, 178]. L'espacement obtenu par cette méthode, entre le site biotine et l'alexa, est de 7 atomes.

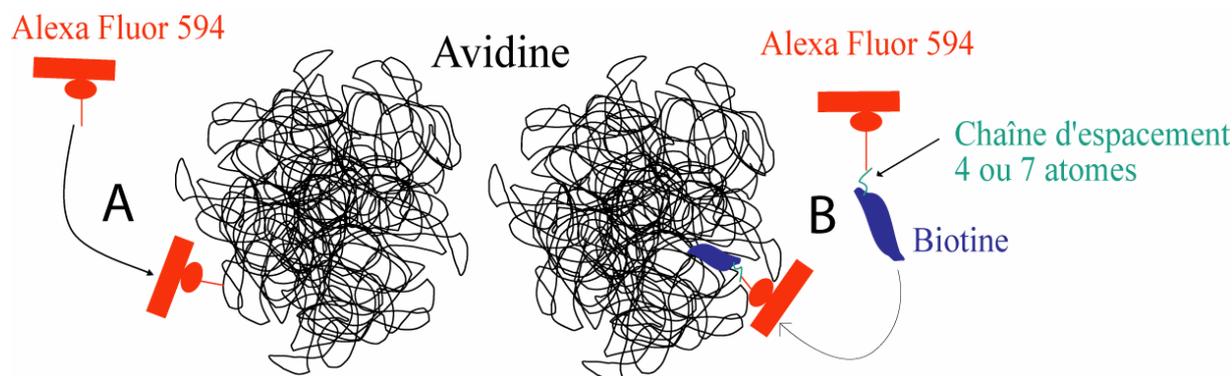


Figure 39 : Les différents marquages de l'avidine A : marquage direct - B : marquage via la biotine

L'objectif de ces trois marquages est de déterminer la méthode la plus pertinente pour l'étude des propriétés de fluorescence dynamique de l'avidine : le mouvement du marqueur doit être une image fidèle du mouvement de l'avidine.

3.1. Marquage direct (A-a1)

Le marquage direct de l'avidine est effectué suivant le protocole fourni par Molecular Probes (annexe 2). Cette méthode est utilisée couramment en imagerie biologique. L'alexa fluor 594 se fixe sur les fonctions amines primaires des lysines présentes en périphérie de la protéine. Le taux de marquage moyen est de 1,8 marqueurs par protéine.

3.2. Marquage via la biotine éthylènediamine (A-B4a1)

Le marquage via la biotine éthylènediamine se décompose en deux étapes. La première étape est la synthèse de la sonde fluorescente biotinylée (Figure 40). Dans une deuxième phase, on met en présence la sonde obtenue avec la molécule d'avidine.

3.2.1. Synthèse de la sonde fluorescente

Dans cette première étape, nous avons fait réagir la fonction acide activée par le succinimidyl ester sur l'amine primaire de la biotine éthylène diamine suivant le même protocole que le marquage direct.

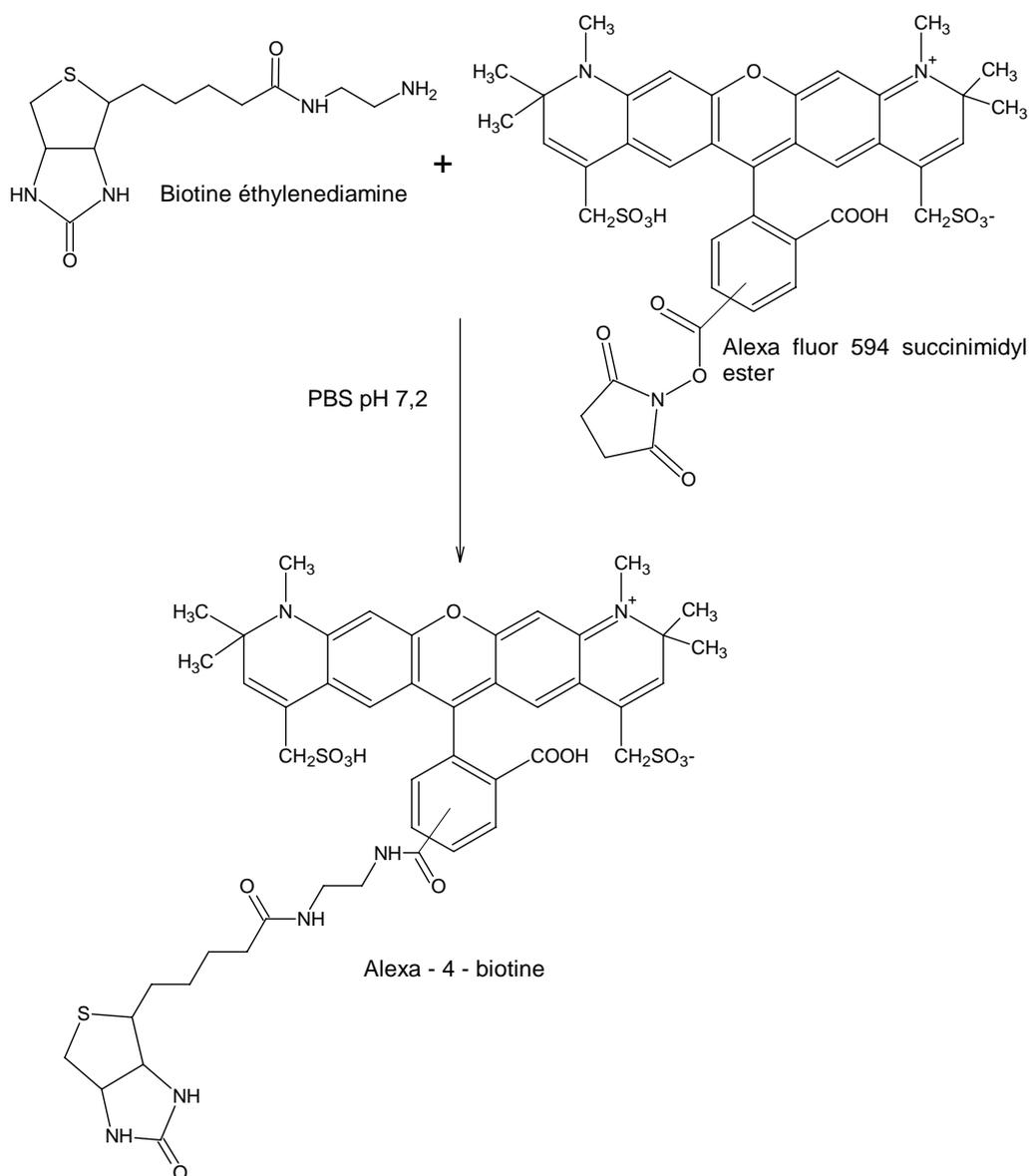


Figure 40 : Schéma réactionnel de la biotinylation de l'alexa fluor 594

La réaction est caractérisée par HPLC phase inverse (colonne μ bondapack Waters, éluant : mélange eau/méthanol 1:1 (Le mode de détection est la fluorescence à 584 nm) (Figure 41). L'alexa fluor 594 succinimidyle ester a un temps de rétention de 7,6 minutes. Un pic à 5,2 minutes existe mais son intégrale est négligeable. En fin de réaction, deux produits sont obtenus, le premier dont le temps de rétention est de 5,2 minutes représente 30% de la totalité de l'alexa initial ; le second, pour un temps d'éluion de 6,15 minutes, représentent 70% de l'alexa initial. Une troisième chromatographie est effectuée après avoir hydrolysé l'alexa fluor 594 succinimidyle éther. On obtient alors un pic à 5,2 minutes.

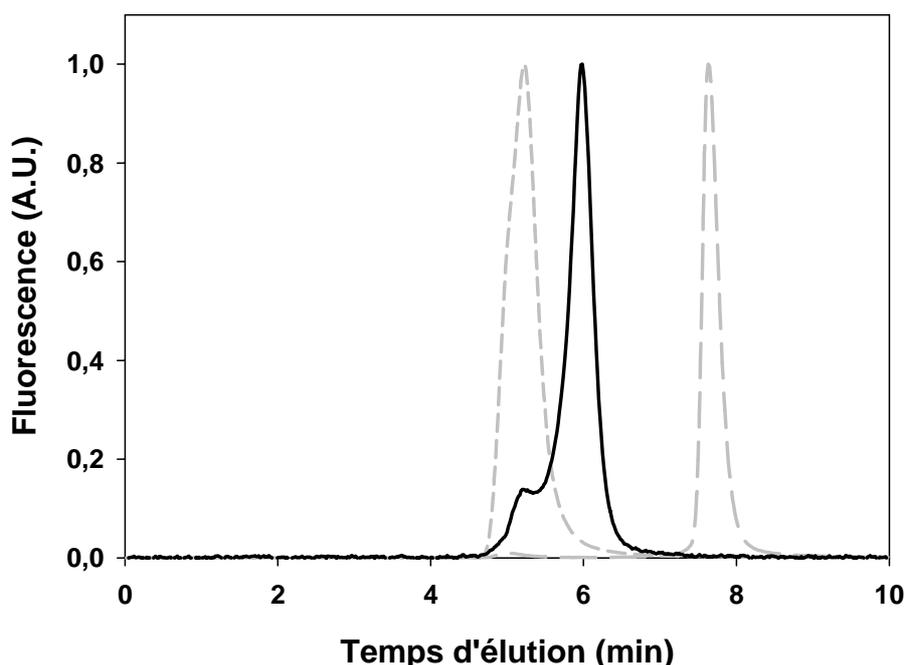


Figure 41 : Chromatogramme obtenu par séparation HPLC. En ligne noire, le produit final de réaction. En pointillé long gris, l'alexa fluor succinimidyl ester à $t=0$. En pointillé court gris l'alexa fluor succinimidyl ester après hydrolyse de la fonction succinimidyl ester

Alors que l'alexa fluor succinimide n'est plus présent en fin de réaction, on constate que 30% d'alexa est hydrolysé (rétention 5,2 min) et 70% biotinylé (rétention 6,12 min). Notons ici que pour effectuer les analyses en HPLC, l'alexa fluor 594 succinimidyl ester a été mis en solution avant d'ajouter la biotine éthylène diamine. L'alexa fluor hydrolysée a été obtenue après avoir laissé l'alexa fluor 594 succinimidyl ester durant 3 heures dans la solution tampon. De ce fait le résultat obtenu est tout à fait logique ; la fonction succinimidyl ester subit une attaque nucléophile par la fonction amine primaire qui se trouve sur la biotine éthylènediamine, mais aussi de la part du solvant, en l'occurrence l'eau. Néanmoins l'eau étant moins nucléophile que l'amine, la réaction peut être effectuée avec des rendements tout à fait acceptables. Afin d'obtenir un couplage entre l'alexa et la biotine éthylène diamine optimal, l'alexa ne doit pas être mis en présence d'humidité avant l'ajout de la solution contenant la biotine éthylène diamine.

3.2.2. Couplage entre l'avidine et B4a1

Le couplage entre l'avidine et B4a1 est effectué dans du tampon phosphate (PBS_A annexe 2) durant 3 heures. L'avidine est séparée des autres composants du mélange sur une

colonne BioRad fournie dans le kit de marquage de Molecular Probes. La séparation donne deux fractions : la première contient la protéine marquée (temps d'éluion de 60 min), la seconde contient de B4al non complexée à l'avidine et de l'alexa n'ayant pas réagi avec la biotine éthylènediamine. La proportion de B4al fixée à l'avidine, calculée à partir des absorbances à 584 ($\epsilon_{587} = 78000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et 282 nm ($\epsilon_{282} = 42126 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), est de 65%. L'alexa succinimidyl ester utilisé est un mélange d'isomères 1-3 (25%) et 1-4 (65%) d'alexa fluor 594. Ce résultat suggère que seul l'isomère 1-4 intervient dans le marquage de l'avidine, probablement pour des raisons stériques.

3.3. Marquage via la biocytine (A-B7al)

Ce marquage utilise le même protocole que le marquage *via* la biotine éthylènediamine. La première étape est la réaction entre la fonction succinimidyl ester du dérivé succinimidyl ester de l'alexa et la fonction amine de la lysine de la biocytine.

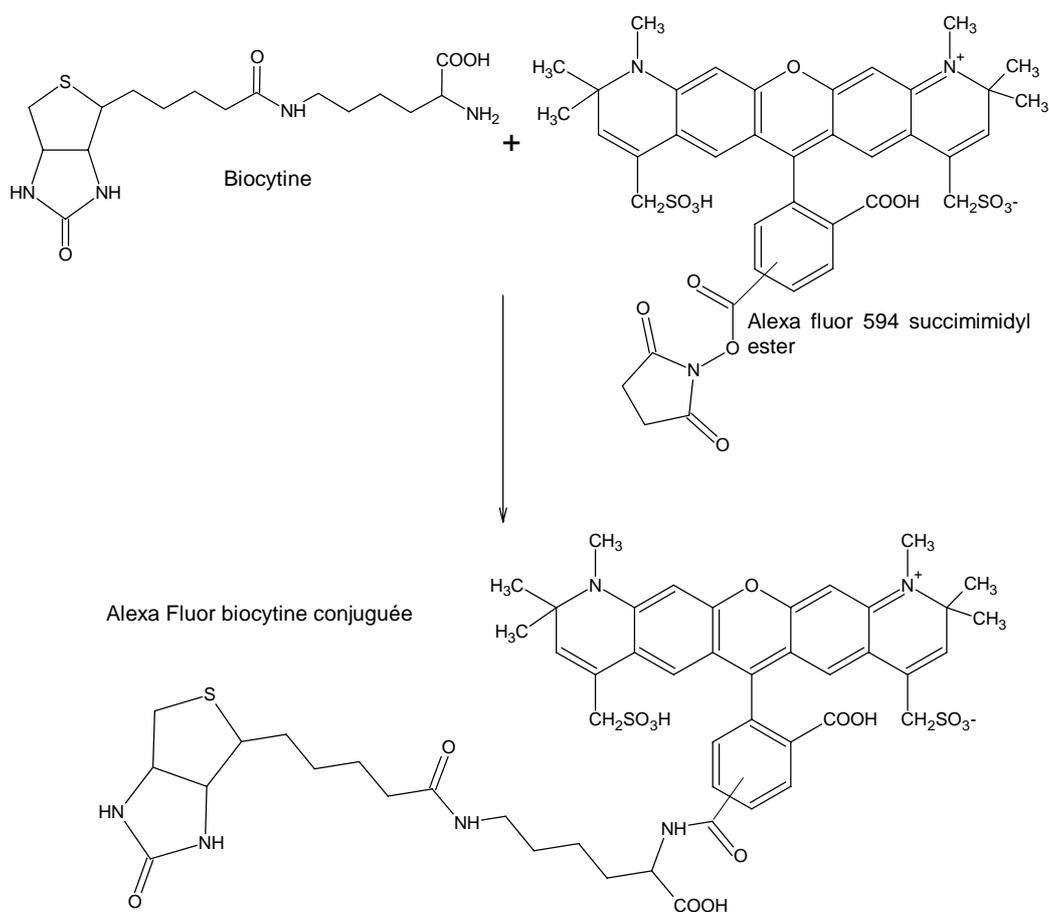


Figure 42 : Schéma réactionnel entre la biocytine et l'alexa fluor 594

La seconde étape du marquage est la réaction de couplage classique entre l'avidine et la biotine.

4. Analyse des marquages

4.1. Analyse de la fluorescence

Les propriétés spectroscopiques ont été étudiées pour chacun des dérivés marqués ainsi que pour le chromophore libre. Le premier résultat remarquable est observé au niveau des spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence (Figure 43).

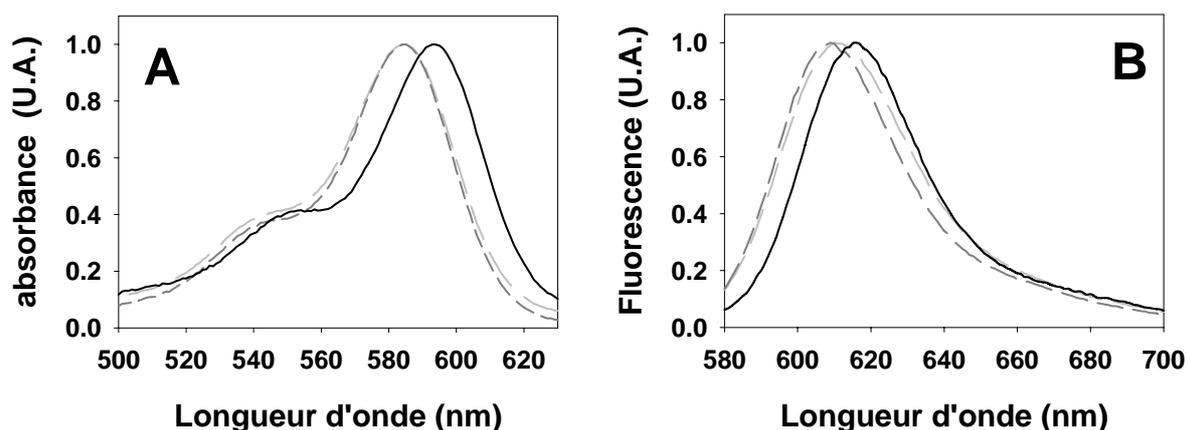


Figure 43 : Spectre d'absorbance (A) et d'émission de fluorescence (B) de l'alexa (gris clair), B4al (gris foncé) et de A-B4al (noir)

	λ_{Max} absorbance (nm)	λ_{Max} émission (nm)
Alexa	585	610
B4al	585	609
A-al	585	609
A-B7al	585	610
A-B4al	593	616

Tableau 7 : Maximum d'absorbance et d'émission de fluorescence des différents marquages

Les longueurs d'ondes maximales d'absorbance et d'émission de fluorescence (Tableau 7) de A-B4al sont décalées vers le rouge respectivement de 8 nm et de 6 nm. Les deux autres marquages ne modifient pas les propriétés spectroscopiques de l'alexa fluor 594.

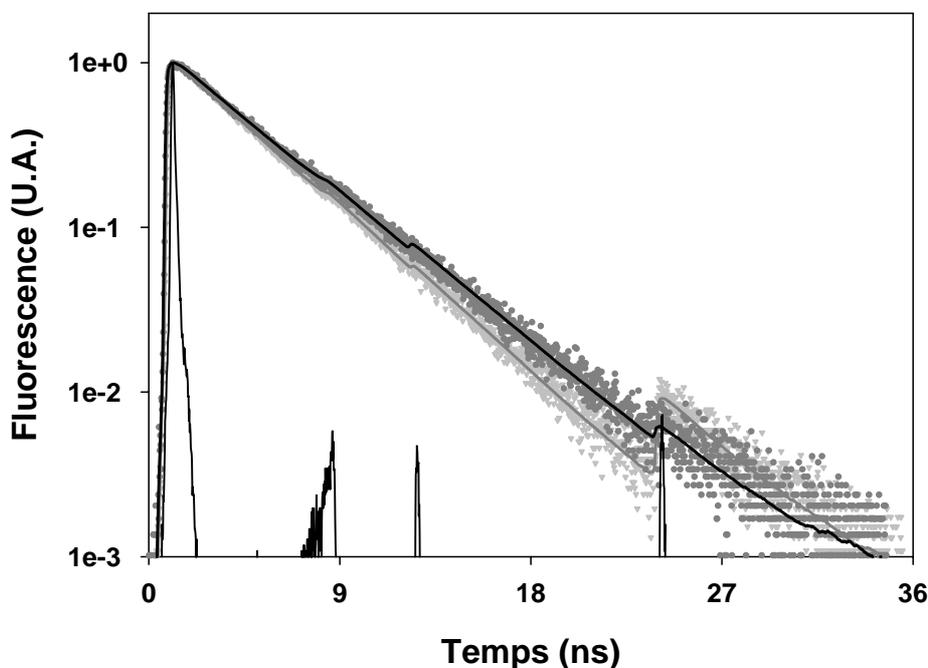


Figure 44 : Déclin de fluorescence à l'angle magique de A-B4al (noir) et de l'alexa fluor 594 (gris). En pointillée les déclins expérimentaux et en ligne les déclins calculés.

L'analyse des données dynamiques (Tableau 8) montre que la durée de vie de A-B4al (4.12 ns) est plus longue que celle de l'alexa (3,7 ns) (Figure 44). Pour les deux autres marquages, elle reste identique à celle de l'alexa libre.

	τ_F (ns)	χ^2	Q
alexa	3.7	1,06	0,79
B4al	3.82	1,22	0,79
A-al	3,79	1,14	-
A-B7al	3,75	1,51	-
A-B4al	4.13	1,05	0,87

Tableau 8 : Résultats de fluorescence dynamique, durée de vie de fluorescence τ_F (ns) et χ^2 le facteur statistique ainsi que Q le rendement quantique de l'alexa fluor 594, l'alexa biotine éthylène diamine, A-al, A-B7al et A-B4al

De plus le rendement quantique de fluorescence de A-B4al (0,87) est supérieur à celui de l'alexa (0,79). Cette augmentation se situe logiquement dans le même rapport que celle observée pour la durée de vie de fluorescence (Équation 5, p 16). A partir du rendement quantique et des durées de vie de fluorescence, il est possible de déterminer la durée de vie radiative (τ_0) ainsi que la constante de vitesse de relaxation par voie radiative (notée k_F) et par voie non radiative (Σk_i) (Tableau 9). Les résultats obtenus montrent que les durées de vie radiatives, et par conséquent les constantes de relaxation par voie radiative, sont identiques pour l'alexa et A-B4al. La somme des constantes de relaxation par voies non radiatives diminue de 40% pour A-B4al.

	τ_0 (ns)	k_F (s^{-1})	Σk_i (s^{-1})
alexa	4,8	$2,08 \cdot 10^8$	$5,3 \cdot 10^7$
B4al	4,8	$2,08 \cdot 10^8$	$5,3 \cdot 10^7$
A-B4al	4,75	$2,1 \cdot 10^8$	$3,15 \cdot 10^7$

Tableau 9 : Evolution des paramètres de relaxation : la durée de vie radiative τ_0 (ns), et les constantes de vitesse de relaxation par voie radiative k_f et non radiative Σk_i de l'alexa fluor 594, de B4al et de A-B4al

Globalement, ces résultats traduisent une stabilisation de l'état excité comme de l'état fondamental du chromophore fixé pour le complexe A-B4al. Cette stabilisation résulte d'une diminution des conversions internes. Au vu des résultats, la modification des propriétés spectroscopiques de l'alexa dans le complexe A-B4al n'est pas provoquée par la biotine ; les propriétés photophysiques de l'alexa et de B4al sont identiques. Ces modifications proviendraient plutôt de l'interaction entre l'alexa et les acides aminés proches du site de fixation de la biotine (Figure 31) car celles-ci ne sont pas observées pour les complexes A-al et A-B7al.

Les temps de corrélation (Tableau 10) obtenus en solution tampon phosphate (PBS_B), confirment que le marquage direct ne rend pas compte du mouvement de la protéine. En effet le temps de corrélation de A-al est identique à celui de l'alexa libre en solution. Le marquage effectué avec la biocytine donne deux temps de corrélation : le premier est identique à celui de l'alexa libre soit 380 ps et le second est de 30 ns. La dépolarisation est majoritairement liée à la libre rotation du chromophore. Enfin, le marquage effectué avec la biotine éthylènediamine donne un seul temps de corrélation de 32,5 nanosecondes. L'application de

la loi de Stokes-Einstein (Équation 15, p 20), en prenant la masse molaire de l'avidine et un volume hydraté spécifique de $1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, donne dans l'eau un temps de corrélation de 28 ns. Compte tenu des approximations, la valeur obtenue par l'expérience est en accord avec le modèle théorique. Le facteur global de dépolarisation obtenu pour A-B4al est de 0,31. Cette valeur reste proche de 0,4. Nous pouvons estimer que toute la dépolarisation de la protéine est observée.

	θ_r (ns)	r_0	χ^2_{Ver}	χ^2_{Hor}
Alexa	0,33	0,34	1,38	1,22
A-al	0,32	0,34	1,4	1,2
A-B7al	0,38	0,37	1,8	1,3
	30,3	0,01		
A-B4al	32,5	0,31	1,24	1,13

Tableau 10 : Résultats en polarisation de fluorescence temps de corrélation θ_r (ns), facteur de dépolarisation r_0 et les tests de statistique pour les déclin verticaux χ^2_{Ver} et horizontaux χ^2_{Hor} pour l'alexa fluor 594, A-al, A-B7al et A-B4al

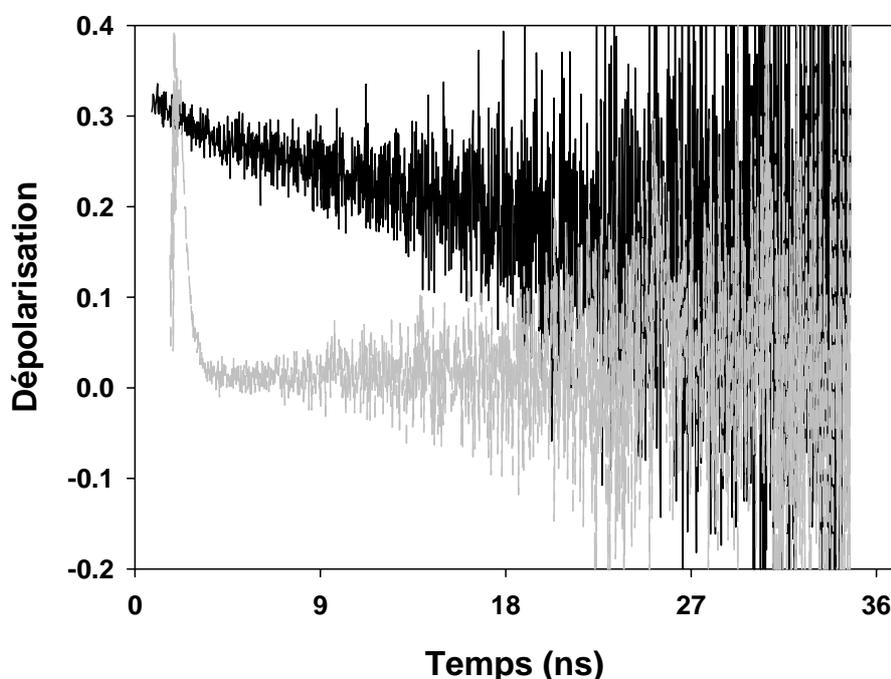


Figure 45 : Fonction d'anisotropie de l'alexa fluor 594 (gris) et de A-B4al (noir)

Les résultats obtenus montrent que l'espacement de 4 atomes entre la biotine et l'alexa fluor permet d'obtenir un marquage dont l'étude rend uniquement compte du mouvement de

rotation de l'avidine. L'absence de composante courte comme dans les cas de l'alexa libre ou éloigné de la biotine suggère que le chromophore est bloqué à la surface de la protéine (Figure 45). Cette interaction de proximité avec la surface pourrait expliquer la différence d'affinité vis à vis du site biotine entre les isomères 1-4 et 1-3. Effectivement, pour ceux-ci, l'encombrement stérique est légèrement différent. Cela expliquerait le fait que seule la biotine éthylènediamine fixée à l'isomère 1-4 de l'alexa fluor puisse être complexée par l'avidine. De ce fait, l'hypothèse avancée pour interpréter le rendement du marquage se trouve confirmée.

L'augmentation de la durée de vie ainsi que les décalages en longueur d'onde des spectres d'émission et d'excitation obtenus pour le complexe A-B4al peuvent ainsi être interprétés sur la base d'une interaction avec la protéine. Il faut rappeler que sur la périphérie de l'avidine, près du site biotine, se trouve le résidu tryptophane W70 (Figure 31). Sachant qu'il a été montré que cette famille de résidus modifie souvent les propriétés de fluorescence des chromophores, il est possible que ce soit l'interaction avec ce tryptophane qui stabilise l'état excité de l'alexa.

Le complexe A-B7al a la même durée de vie que celle de l'alexa libre mais dans ce cas, deux temps de corrélation sont tout de même nécessaires pour rendre compte du mouvement de la protéine, sans toutefois que la contribution de la composante longue soit prépondérante. Encore une fois, ce résultat suggère que l'augmentation de la durée de vie de fluorescence observée pour le complexe A-B4al est relative à la différence de longueur de chaîne intercalée entre la biotine et le marqueur.

Le temps de corrélation unique obtenu dans le cas du complexe A-B4al indique que l'avidine peut être assimilable à une sphère, dont le diamètre hydrodynamique peut être estimé à 6,3 nm. Ce résultat accrédite l'hypothèse que nous avons posée lors du choix initial de l'avidine comme modèle protéique pour ce type d'approche par anisotropie de fluorescence.

4.2. Validation du modèle

4.2.1. Influence de la viscosité

Aux interfaces, les interactions de la protéine avec la surface suggèrent que ce temps de corrélation peut devenir très grand. Dans ces conditions, il nous faut connaître le temps de corrélation maximum qu'il est possible de déterminer avec précision au moyen de nos

équipements. Pour ce faire, nous avons utilisé le rapport de proportionnalité qui existe entre la viscosité et le temps de corrélation défini par la loi de Stokes-Einstein (Équation 15, p 20). Nous avons donc utilisé des solutions de viscosité élevée en mélangeant des solutions de tampon et d'éthylène glycol en différentes proportions.

Les résultats obtenus (Tableau 11) (Figure 46) montrent que le temps de corrélation du complexe A-B4al, celui de l'alexa fluor 594 et celui de A-al augmentent linéairement avec la viscosité. Ces résultats sont en accord avec le modèle théorique. Les facteurs statistiques χ^2 obtenus étant très proches de 1, cela indique que les résultats calculés sont cohérents. Le facteur de dépolarisation r_0 reste constant, de l'ordre de 0,31 pour le complexe A-B4al, 0,36 pour l'alexa et 0,34 pour A-al. Comme prévu, le marquage direct de l'avidine par l'alexa fluor 594 ne rend pas du tout compte du mouvement de la protéine.

	η (mPa.s)	τ_F (ns)	χ^2	θ_r (ns)	r_0	χ^2_{Ver}	χ^2_{Hor}
A-B4al	1,12	4,13	1,05	32,54	0,31	1,24	1,13
	1,79	4,05	1,13	42,06	0,31	1,29	1,18
	2,67	4,00	1,31	55,97	0,31	1,27	1,19
	4,01	3,95	1,15	75,52	0,30	1,25	1,12
	4,89	3,96	1,20	79,17	0,32	1,35	1,30
	7,17	3,86	1,17	108,21	0,32	1,27	1,22
	11,98	3,68	1,12	254,04 2,41	0,28 0,04	1,21	1,19
Alexa	1,12	3,84	1,22	0,33	0,34	1,38	1,22
	1,79	3,87	1,28	0,59	0,35	1,39	1,21
	2,67	3,87	1,18	0,81	0,36	1,45	1,25
	4,01	3,85	1,23	1,24	0,37	1,55	1,57
	4,89	3,84	1,10	1,37	0,36	1,40	1,36
	7,17	3,84	1,46	2,31	0,37	1,14	1,25
	11,98	3,80	1,15	4,67	0,36	1,58	1,25
A-al	0,98	3,73	1,3	0,31	0,33	1,21	1,09
	1,31	3,75	1,5	0,38	0,30	1,7	1,27
	1,98	3,74	1,1	0,60	0,34	1,1	1,1
	4,01	3,74	1,1	1,11	0,34	1,2	1,2

Tableau 11 : Durées de vie τ_F (ns), temps de corrélation θ_r (ns) et facteur de dépolarisation (r_0) de l'alexa, de A-al et de A-B4al en fonction de la viscosité (η). Pour chaque déclin analysé sont aussi notifiés les facteurs statistiques χ^2

Dans le cas du complexe A-B4al, quand la concentration en éthylène glycol est très importante, on obtient deux temps de corrélation. Dans ces conditions, l'environnement de la protéine n'est plus une solution aqueuse mais une solution d'éthylène glycol ; ceci pourrait induire une dénaturation partielle de l'avidine. Dans ce cas, la perte de la géométrie sphérique peut induire plusieurs temps de corrélation.

Les résultats de ces expériences montrent que le traitement mathématique que nous utilisons permet de déterminer avec une relative précision un temps de corrélation 27 fois plus long que la durée de vie de fluorescence. Cette précision est obtenue car le modèle protéique que nous avons choisi est simple à analyser : une durée de vie, un temps de corrélation.

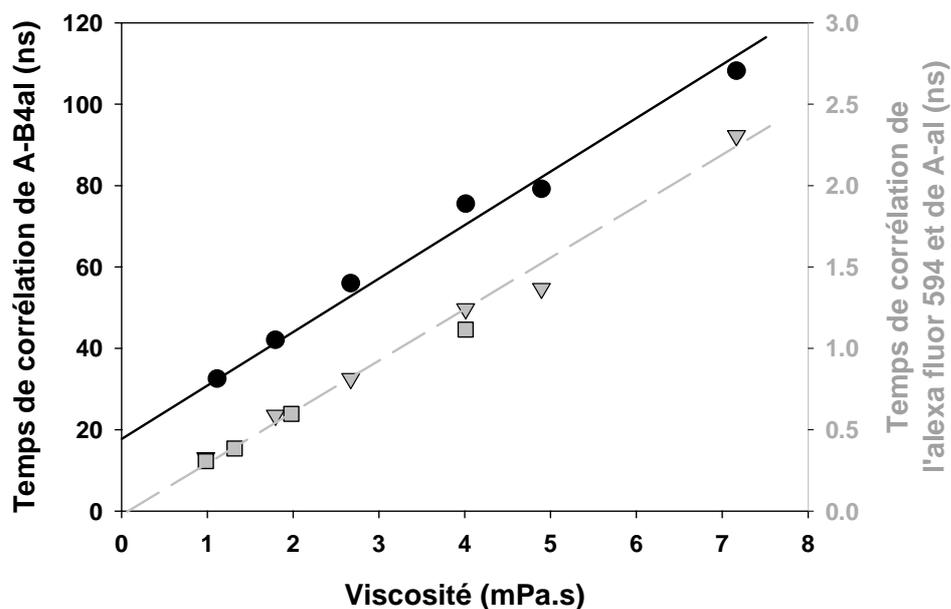


Figure 46 : Evolution des temps de corrélation de l'alexa et de A-B4al (●), de l'alexa fluor 594 (▼) et de A-al (■) en fonction de la viscosité.

L'autre résultat remarquable est la diminution linéaire de la durée de vie de fluorescence du complexe A-B4al avec l'augmentation de la fraction d'éthylène glycol (Figure 47). Celle-ci n'étant pas observée pour l'alexa, nous pouvons en déduire que dans le cas de A-B4al l'éthylène glycol seul ne modifie pas directement sa durée de vie de fluorescence. Cet effet pourrait être expliqué par un changement de la polarité de l'environnement au voisinage du chromophore, ceci entraînant une modification dans le sens d'une diminution des interactions stabilisatrices du complexe alexa/protéine.

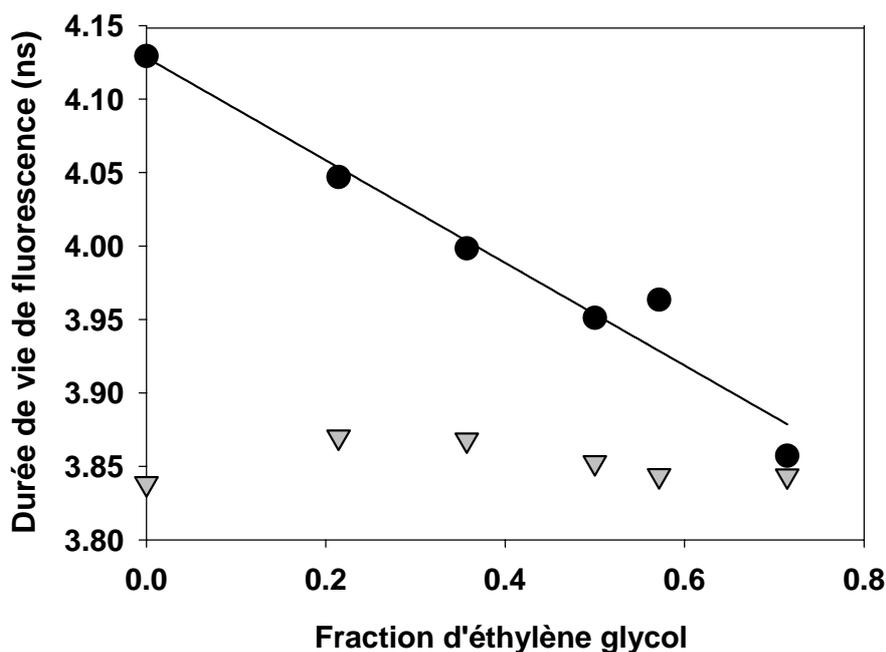


Figure 47 : Evolution de la durée de vie de fluorescence de A-B4al (●) et de l'alexa fluor 594 (▼) en fonction de la fraction d'éthylène glycol dans la solution

La polarité évoluant de façon linéaire avec la proportion d'éthylène glycol f_{EG} , il est possible d'ajuster la décroissance de la durée de vie de fluorescence du complexe A-B4al en fonction de celle-ci. La fonction obtenue est $\tau = -0.39f_{EG} + 4.13$.

L'éthylène glycol se substituant au tampon, la constante diélectrique du milieu diminue, ainsi une évolution de structure s'opère éventuellement en raison d'une possible déstabilisation de paires polaires qui seraient impliquées dans l'interaction chromophore/avidine.

4.2.2. Influence des agents dénaturants

Lors de l'adsorption de protéines sur une surface solide, par exemple une membrane de filtration, celles-ci peuvent être dénaturées (chapitre I p 61). La question que nous nous posons est de savoir si ces changements de conformation peuvent être caractérisés de façon très fine par les techniques de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence résolues dans le temps. Toujours dans l'optique de pouvoir analyser de façon fiable les données dont nous disposerons en mode confocal au cours de ce type d'étude, nous avons procédé à deux tests de dénaturation de l'avidine. Ainsi, nous avons mis le complexe A-B4al en présence de sodium

dodécyl sulfate (SDS) qui est un détergent, d'urée ou encore de guanidine qui sont des agents dénaturant.

a. Influence du SDS sur le complexe A-B4al.

Les effets de certains détergents ont été étudiés [179]. Il résulte de ces études qu'en présence de 1% en masse de SDS la force de la liaison avidine-biotine est diminuée. L'électrophorèse capillaire sur gel avec du SDS [180] permet d'obtenir des monomères d'avidine. Cette méthode est utilisée afin de déterminer le taux de biotinylation de l'avidine. Nous avons étudié l'influence du SDS sur la protéine modèle marquée : A-B4al.

Le premier test SDS1 a été réalisé en ajoutant directement 1% en masse de SDS à une solution tampon phosphate (PBS_B) + complexe A-B4al (9.10^{-8} M). Le second test SDS2 a été effectué avec la même solution SDS1 après passage durant deux minutes dans un bain à ultrasons. Les propriétés de fluorescence sont reportées dans le Tableau 12. Dans cette série d'expériences, deux durées de vie de fluorescence ont été obtenues. La première, d'environ 4 ns et représentant approximativement 90% de l'émission, correspond à celle de l'alexa fluor. La seconde composante, de durée de vie de l'ordre de la nanoseconde, a été attribuée après vérification à un artefact d'accumulation. Nous avons en effet observé que lorsque le taux de comptage était trop élevé, une composante virtuelle de l'ordre de 10% et de durée de vie comprise entre 0,5 ns et 1,2 ns, était nécessaire pour obtenir un bon ajustement. Cette vérification a été effectuée sur différents standards ; les déclin, biexponentiels à fort taux de comptage, deviennent parfaitement monoexponentiels pour des taux de comptage plus faibles.

	λ_{Max} absorbance (nm)	λ_{Max} émission (nm)	τ_{F1} (ns)	a_1	τ_{F2} (ns)	a_2	χ^2
A-B4al (témoin)	595	616	4,02	0,93	1,00	0,07	1,05
SDS1	589	610	3,90	0,90	0,98	0,1	1,26
SDS2	589	610	3,94	0,87	1,21	0,13	1,1

Tableau 12 : Propriétés de fluorescence : longueur d'onde des maximum d'absorbance (λ_{max} absorbance) et d'émission de fluorescence (λ_{max} émission), les durées de vie (τ_{F1} et τ_{F2}) de fluorescence et leur poids relatif (a_1 et a_2) de A-B4al après traitement par 1% en masse de SDS (SDS1) et après passage aux ultrasons (SDS2)

En présence de SDS, les longueurs d'onde des maxima d'émission et d'excitation sont identiques à celles de l'alexa libre en solution, soit respectivement 589 et 610 contre 595 et 616 nm pour le complexe A-B4al. La durée de vie de fluorescence du complexe passe de 4 ns en solution tampon à 3,90 et 3,94 ns. En présence de SDS, on obtient deux temps de corrélation (Tableau 13). Le premier, de l'ordre de 35 ns correspond à celui du complexe protéique A-B4al ; le second, de l'ordre de 400 ps, à celui de l'alexa biotinylé libre en solution. L'essentiel de la dépolarisation ($r_{0,1}$) est effectué *via* le temps de corrélation le plus long.

	θ_{r1} (ns)	$r_{0,1}$	θ_{r2} (ns)	$r_{0,2}$	r_{0t}	χ^2_{Ver}	χ^2_{Hor}
A-B4al (témoin)	35,11	0,37			0,37	1,27	1,1
SDS1	35,23	0,36	0,31	0,03	0,4	1,19	1,05
SDS2	38,44	0,35	0,30	0,04	0,36	1,21	1,12

Tableau 13: Propriétés de polarisation de fluorescence, temps de corrélation (θ_{r1} et θ_{r2}) et facteur de dépolarisation par composante de temps de corrélation ($r_{0,1}$ et $r_{0,2}$), facteur de dépolarisation globale ($r_{0,t}$) de A-B4al après traitement par 1% en masse de SDS

Cette expérience montre que la présence de SDS dénature peu la protéine ; son temps de corrélation ne change pratiquement pas. Cependant, une faible proportion de l'alexa biotinylé est « relarguée » dans la solution. De plus, ces expériences confirment une nouvelle fois que l'avidine est une protéine particulièrement résistante aux détergents [181].

b. Influence des agents dénaturants sur le complexe A-B4al.

L'avidine est une protéine très stable qui résiste à des conditions de dénaturation telles que urée 8 M [182] ou guanidine HCl 3 M [160]. Il faut la mettre en présence de guanidine 8 M, pour qu'elle se dénature ; elle perd dans ces conditions sa structure de tétramère [48]. Cette dénaturation est réversible dès lors que la concentration de l'agent dénaturant diminue. En présence de biotine, l'avidine a une stabilité accrue face aux agents dénaturants. La dénaturation du complexe avidine-biotine, n'est que partielle en présence de guanidine 8M. Dans certaines conditions, telles que guanidine 6 M à pH 1,5 on observe 25 % de biotine relarguée [183].

Nous avons procédé à des tests de dégradation du complexe A-B4al (9.10^{-8} M) en solution dans l'urée 9 M (U9M) puis après dialyse (8 heures) contre une solution de tampon phosphate (PBS B) (U9MD), et en solution de guanidine-HCl : 3 M (G3M) et 6 M (G6M). Ces résultats sont reportés dans les Tableau 14 et 15.

	λ_{\max} Absorbance (nm)	λ_{\max} Emission (nm)	τ_{F1} (ns)	a_1	τ_{F2} (ns)	a_2	χ^2
A-B4al	595	616	4.02	0.93	1.00	0.07	1,05
U9M	590	610	3,86	0,85	0,48	0,14	1,10
U9MD	589	610	3,74	0,82	1,08	0,18	1,28
G3M	590	610	3,93	0,88	0,89	0,12	1,09
G6M	589	610	3,84	0,82	0,57	0,18	1,19

Tableau 14 : Propriétés de fluorescence longueur d'onde des maximum d'absorbance λ_{\max} absorbance et d'émission de fluorescence λ_{\max} émission, les composantes de durée de vie (τ_{F1} et τ_{F2}) de fluorescence et leur poids relatif (a_1 et a_2) de A-B4al en présence d'agent dénaturant

En présence d'urée ou de guanidine, les valeurs des longueurs d'onde des maxima d'absorbance et d'émission ainsi que celles des durées de vie de fluorescence sont égales à celles de l'alexa libre en solution. Ces résultats indiquent la perte dans tous les cas des interactions stabilisatrices du fluorophore par la protéine.

	θ_{r1} (ns)	$r_{0,1}$	θ_{r2} (ns)	$r_{0,2}$	θ_{r3} (ns)	$r_{0,3}$	$r_{0,t}$	χ^2_{Ver}	χ^2_{Hor}
A-B4al	35,11	0,37	-	-	-	-	0,37	1,27	1,1
U9M	126,16	0,31	0,32	0,11	6,49	0,09	0,51	1,16	1,07
U9MD	34,67	0,32	0,97	0,12	-	-	0,44	1,47	1,39
G3M	42,63	0,28	2,48	0,05	-	-	0,32	1,19	1,01
G6M	276,75	0,25	4,53	0,11	-	-	0,36	1,2	1,17

Tableau 15 : Propriétés de polarisation de fluorescence, temps de corrélation ($\theta_{r,1}$, $\theta_{r,2}$ et $\theta_{r,3}$) et facteur de dépolarisation par composante de temps de corrélation ($r_{0,1}$, $r_{0,2}$ et $r_{0,3}$), facteur de dépolarisation globale ($r_{0,t}$) de A-B4al après traitement par des agents dénaturants

Les résultats d'anisotropie de fluorescence montrent que la solution d'urée 9 M dénature bien l'avidine. On observe trois temps de corrélation : 126 ns, 6 ns et un temps court de 322 ps. Le temps de corrélation court suggère un relargage de l'alexa biotinyllé ; ici, la

valeur de $r_{0,2}$ indique que cette proportion est plus grande que dans le cas de la dénaturation par le SDS. Le temps de corrélation de 126 ns peut être interprété par la dénaturation de l'avidine (perte de la forme globulaire). Le temps de 6 ns est de l'ordre de la valeur théorique d'un monomère d'avidine. Après dialyse, on retrouve deux temps de corrélation. Le premier, de 34 ns, correspond à celui de l'avidine native. Le second, de l'ordre d'une nanoseconde, est plus difficile à attribuer. Dans la mesure où la durée de vie de fluorescence et les maxima d'absorbance et d'émission ne sont pas ceux obtenus pour le complexe de départ, nous pensons qu'il y a renaturation partielle de la protéine,

Pour les deux solutions contenant de la guanidine, nous pouvons remarquer que la fonction d'anisotropie contient une composante de temps courte et une composante de temps longue. Les temps de corrélation courts (2,5 et 4,5 ns) sont trop lents pour être associés à l'alexa libre en solution. Les temps de corrélation longs (42,6 et 276 ns) sont supérieurs à celui du complexe A-B4al (35 ns), ce qui suggère qu'il y a bien dénaturation de l'avidine. En revanche, l'absence de relargage du fluorophore biotinylé laisse penser que, dans ces conditions, l'intégrité du site biotine est partiellement conservée, mais qu'il y a soit agrégation, soit changement de conformation de la protéine.

5. Conclusions

Parmi les différents marquages effectués, le complexe de l'avidine avec la sonde biotine éthylènediamine alexa fluor 594 (A-B4al) répond aux objectifs que nous nous étions fixés. Sa durée de vie et son temps de corrélation uniques simplifient l'analyse des résultats et leur interprétation. Les études réalisées ont montré que les propriétés spectroscopiques du complexe A-B4al semblent sensibles à la polarité du milieu ; ceci pourra éventuellement être utilisé dans le cadre d'autres études. Le rendement quantique de fluorescence élevé obtenu pour ce complexe permet de travailler à de très faibles concentrations ; c'est un point important pour l'étude en mode confocal où très peu de molécules se trouvent dans le faisceau d'excitation. Enfin, ce marquage rend parfaitement compte du mouvement de rotation de la protéine.

Avec ses quatre sites de fixation indépendants et non coopératifs, l'avidine présente, de plus, l'avantage de permettre, dans le cadre d'autres études (capteur par exemple), la fixation simultanée de plusieurs marqueurs biotinylés (chromophore, marqueur RPE ...) ou bien encore d'autres protéines.

Chapitre IV. Conception et réalisation d'un dispositif confocal de spectroscopie de fluorescence résolue en temps.

Une partie importante du travail présenté dans cette thèse a été la conception et la réalisation du dispositif de fluorescence confocal pour l'étude d'adsorption de protéines. La finalité du travail est de montrer la faisabilité des mesures et la pertinence de notre approche. Ce dispositif a été réalisé à partir d'équipements existants ou de composants fabriqués au laboratoire.

Ce chapitre débute par une synthèse des différentes contraintes auxquelles nous sommes soumis du fait des techniques que nous avons réunies. Puis nous décrivons le dispositif expérimental et les protocoles expérimentaux qui ont été mis au point pour l'étude, par fluorescence, des cinétiques d'adsorption des protéines aux interfaces. Le traitement mathématique des données est abordé en fin de chapitre.

1. Récapitulation des contraintes expérimentales

Dans les chapitres I et II nous avons identifié les contraintes liées aux techniques utilisées (fluorescence dynamique, anisotropie de fluorescence et optique confocale), d'une part, et celles inhérentes à l'observation d'un profil de concentration, d'autre part. La conception du montage optique est liée à toutes ces exigences. De ce fait, avant de décrire le dispositif expérimental, nous allons les récapituler et définir la stratégie selon laquelle nous avons réalisé ce montage.

Le point central de tout dispositif optique est l'efficacité de sa collection de lumière. En effet, c'est elle qui détermine la qualité (et la quantité) de l'information enregistrée. Dans la mesure où le nombre de photons détectés est en relation avec l'énergie d'excitation, on a toujours intérêt, du point de vue de la fluorescence comme du mode confocal, à optimiser la collection de lumière : cela permet de réduire le temps d'acquisition, et par conséquent d'éviter la dégradation de l'échantillon tout en maintenant un bon rapport signal/bruit. Les mesures de fluorescence résolues dans le temps nécessitent un minimum d'accumulation des déclins ; ici encore, réduire ce temps d'acquisition signifie améliorer la chaîne de détection.

Pour que des mesures d'anisotropie soient envisageables, l'information de polarisation doit être conservée. Ainsi, les éléments qui se trouvent sur la chaîne de collection doivent, d'une part, être limités en nombre, et d'autre part, être choisis afin d'éviter une dépolarisation du signal.

L'apport d'un dispositif confocal porte à la fois sur la bonne résolution spatiale qu'il permet d'atteindre et sur le contrôle de la localisation, dans l'échantillon, de l'information collectée. La résolution spatiale est donnée principalement par l'élément optique de collection. En microscopie confocale, la résolution généralement mise en avant par les utilisateurs est la résolution latérale. Le problème pour les microscopistes est d'obtenir l'image la plus nette et la plus contrastée, et donc d'augmenter le pouvoir séparateur de leur système. Bien que la résolution latérale soit liée à la résolution axiale, cette dernière est peu discutée par les microscopistes. Ce qui nous intéresse principalement ici est de voir ce qui se passe en profondeur d'une solution ou d'un matériau, c'est-à-dire d'observer l'émission de fluorescence en fonction de déplacements selon l'axe Z. Ainsi, le terme de résolution spatiale sera utilisé pour définir la résolution axiale.

Le mode confocal nécessite un système de déplacements fiables et reproductibles. La résolution spatiale, qui, dans notre cas, est de l'ordre du micromètre, nous impose pour numériser correctement le profil de la fonction instrumentale d'excitation (annexe 6), un incrément de déplacement de l'ordre d'une centaine de nanomètres.

Les études d'adsorption sous flux imposent des temps d'acquisition et de balayage suffisamment courts pour permettre de suivre l'évolution des profils de concentration en fonction du temps dans la cellule d'écoulement. Réduire le temps de collection va automatiquement diminuer le nombre de photons détectés, ce qui est préjudiciable à la mesure. La solution qui consisterait à augmenter l'intensité de l'excitation peut engendrer des phénomènes de photodégradation ou de photosaturation ; d'autre part, travailler avec une concentration en protéines plus élevée risque de donner des cinétiques d'adsorption trop rapides. Aussi, la seule solution est de faire un compromis entre la résolution spatiale que l'on considère comme suffisante et la quantité de photons détectés.

A partir de toutes ces considérations, nous avons dégagé cinq parties dans le dispositif optique à réaliser : la source, le séparateur de faisceau, l'objectif, le dispositif d'écoulement et la détection des photons émis (Figure 48).

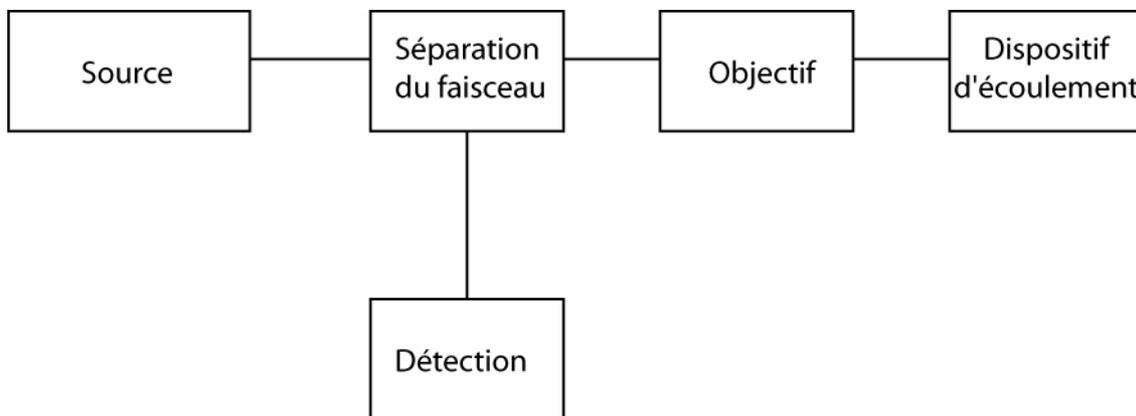


Figure 48 : Schéma général du montage confocal

2. Optimisation du dispositif optique

2.1. L'élément clé du dispositif : l'objectif de microscope

L'élément optique de collection est un point clé du dispositif confocal. Son rôle est à la fois de définir le volume d'excitation et de collecter les photons de fluorescence émis. A partir du traitement mathématique des faisceaux gaussiens (chapitre I p 23), nous avons vu que la taille du point de focalisation d'une lentille était liée d'une part à sa focale, d'autre part au diamètre du faisceau incident. Nous avons également vu que, dans le cas des sources lasers, cette taille pouvait être, au mieux, celle limitée par la diffraction (Équation 22 p 26). Pour atteindre ces conditions, il est nécessaire de corriger un certain nombre d'aberrations optiques. Ces corrections sont extrêmement difficiles à mettre en œuvre ; cependant, les fabricants d'optiques ont réussi depuis quelques années à réaliser des objectifs de qualité remarquable parfaitement adaptés à ces conditions de travail. L'utilisation d'un objectif de ce type s'est avérée indispensable.

Toutefois, expérimentalement, l'utilisation de ces objectifs pose le problème de leur distance de travail. En dehors des optiques « longues focales », inadaptées à l'étude des solutions, la plupart de ces objectifs ont des focales de l'ordre de quelques centaines de micromètres. Pour notre étude, afin d'observer des profils de concentration dans des conditions compatibles avec celles imposées par les phénomènes d'adsorption, nous devons utiliser des cellules d'écoulement d'épaisseurs importantes (axe Z). A partir du modèle de Lévêque, nous avons déterminé une épaisseur minimale de travail de l'ordre de 100 μm . En outre, les concentrations de protéines marquées que nous serons amenés à utiliser seront très faibles (quelques nanomolaires) ; par conséquent, l'ouverture numérique de l'objectif doit être importante afin de collecter le maximum de photons. L'utilisation d'un objectif de grande ouverture numérique permet par ailleurs d'obtenir une meilleure résolution axiale. Malheureusement, les objectifs de grande ouverture numérique ont des focales très courtes (typiquement une centaine de micromètres) ; nous devons donc privilégier l'utilisation d'une optique présentant un bon compromis entre focale et ouverture numérique.

L'ouverture numérique d'un objectif immergé dans un milieu d'indice n est liée au demi angle σ_0 de collection des photons par la relation suivante :

$$NA = n \sin \sigma_0$$

Équation 67

Ainsi, en augmentant l'indice optique du milieu d'immersion pour ce même objectif, on aura une ouverture numérique supérieure à 1 ; ce qui correspond dans l'air à un angle total de collection supérieur à 180° . L'utilisation d'un objectif à immersion va donc d'une part nous permettre d'augmenter la collection de lumière, et d'autre part d'améliorer la résolution spatiale.

Le dispositif d'écoulement nécessite l'utilisation d'une cuve. Le changement d'indice entre la lamelle de verre de la cuve et celui de la solution, modifie l'emplacement du point focal sur l'axe Z (Figure 49). Ce décalage est fonction de l'ouverture numérique de l'objectif, des indices optiques des différents milieux traversés et de l'épaisseur de la lamelle.

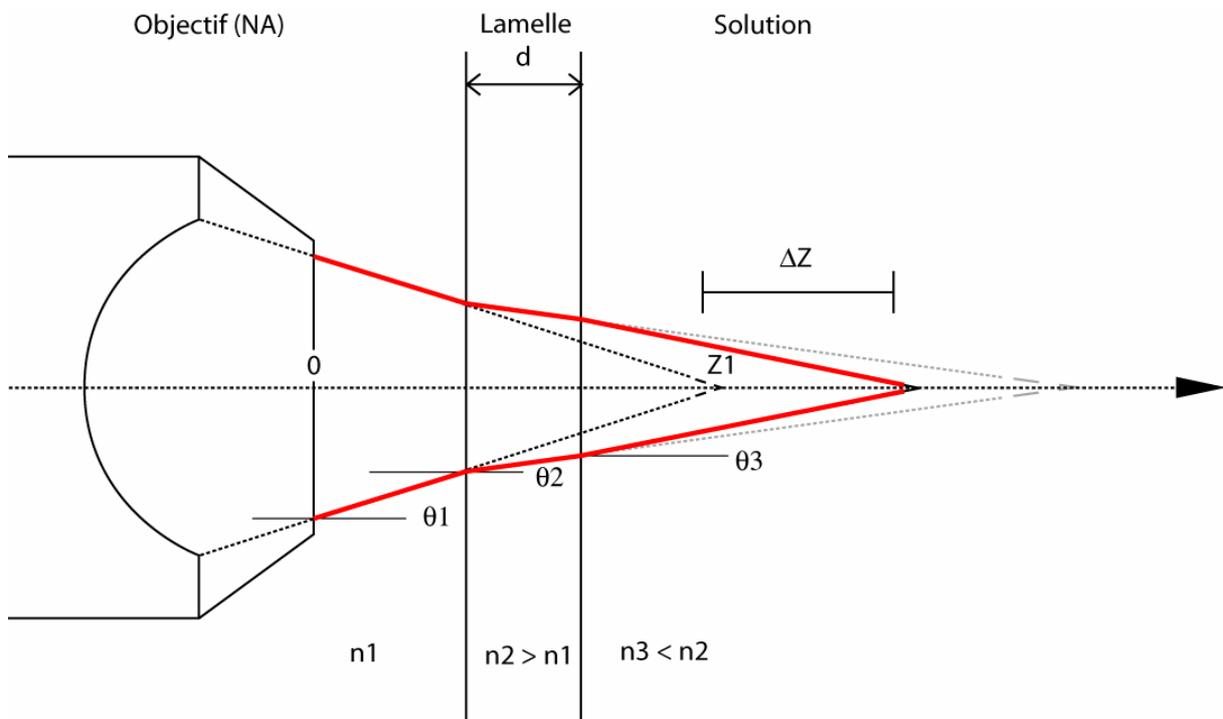


Figure 49 : Décalage du point focal provoqué par le changement d'indice optique

La Figure 49 illustre le décalage ΔZ qui existe entre le point focal théorique et le point focal où l'image est observée. Le faisceau lumineux du milieu d'indice optique n_1 pénètre avec une

incidence θ_1 dans le milieu d'indice n_2 ; il émerge de ce milieu selon un angle d'incidence θ_2 tel que : $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$. Si $n_2 > n_1$, le point focal se situe plus loin que celui obtenu en absence du milieu d'indice n_2 . De la même façon, lorsque le rayon sort du milieu d'indice n_2 pour pénétrer dans le milieu d'indice n_3 , le changement d'indice dévie le faisceau. Si $n_3 < n_2$, alors le rayon sort avec une incidence θ_3 ; le point focal se situe plus près que celui obtenu en absence du milieu d'indice n_2 . Lorsque l'angle d'incidence θ_1 change, le décalage ΔZ varie ; si θ_1 augmente, alors ΔZ augmente.

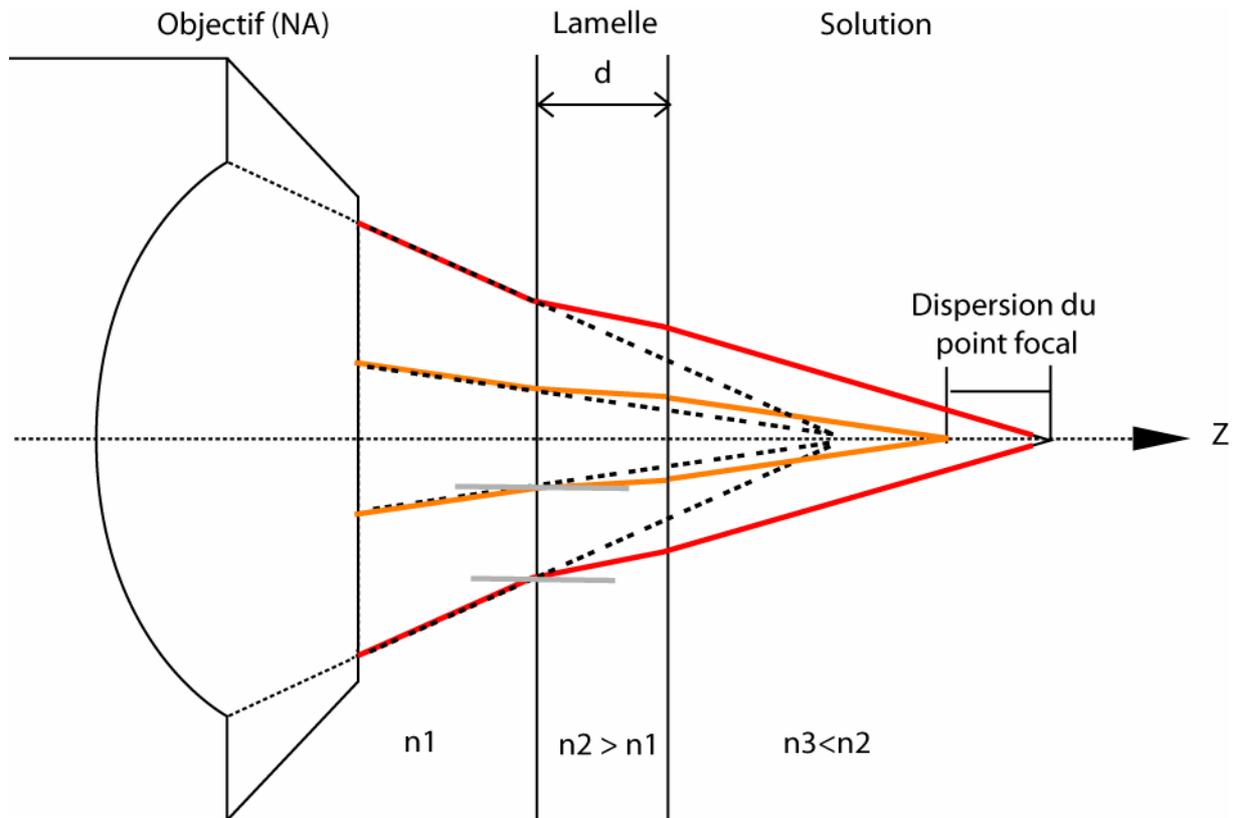


Figure 50 : Dispersion du point focal induit par le changement d'indice

Dans le cas d'une lentille de focalisation, ou bien évidemment d'un objectif de microscope, l'angle d'incidence θ_1 des rayons lumineux qui traversent la lamelle change selon leurs positions par rapport au centre de l'objectif. Après passage dans le verre, les faisceaux sont déviés différemment en fonction de cet angle et le « point focal » est dispersé le long de l'axe optique. Ceci est illustré dans la Figure 50. Dans ces conditions, le volume d'excitation est étiré sur toute la longueur de la dispersion. L'ordre de grandeur de cette dispersion, qui dépend des indices, de l'objectif et de l'épaisseur de la lamelle, est de plusieurs dizaines de micromètres. Cette déformation ne peut être corrigée *a posteriori* ; expérimentalement elle

n'est jamais négligeable. Ce phénomène est mis en évidence dans l'expérience présentée par la Figure 51.

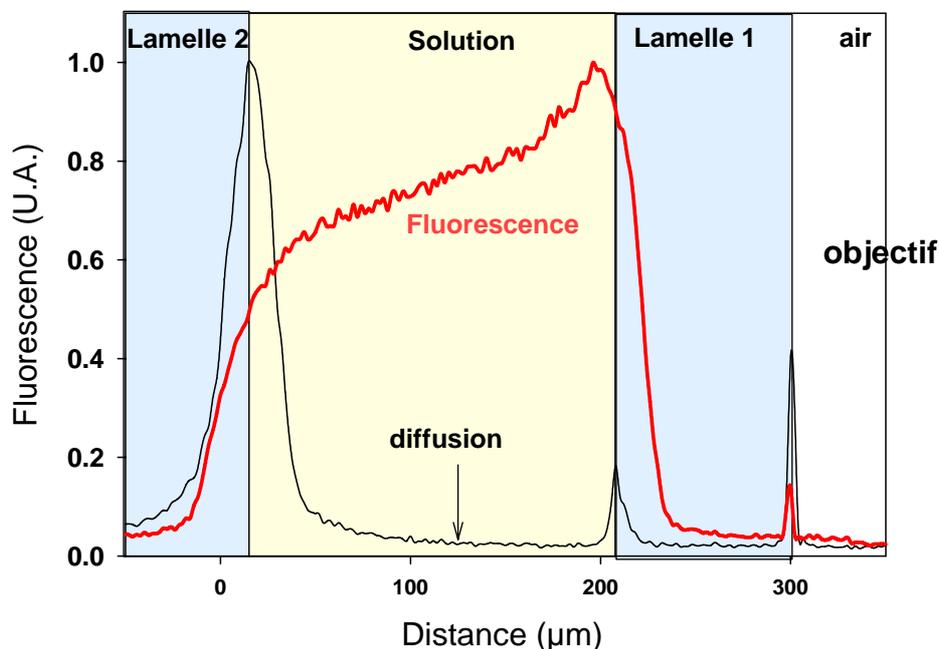


Figure 51 : Spectre de fluorescence et de diffusion d'une cuve contenant de l'alexa pris avec un objectif à sec olympus 100X NA = 0,8

Dans cette expérience, nous pouvons remarquer que les pics de diffusion aux interfaces s'élargissent au fur et à mesure que la lumière pénètre dans la cuve. Ainsi, de droite à gauche sur la Figure 51, la largeur du pic de diffusion à mi-hauteur entre la lamelle 1 et l'air est de $1\mu\text{m}$ tandis que celle du pic de diffusion entre la solution et la lamelle 2 est de $18\mu\text{m}$. En outre, la distance entre les lamelles est surestimée d'un facteur 1,8. Ceci met en évidence que pour le mode confocal, la dispersion provoquée par les changements d'indice peut être très largement supérieure à la résolution spatiale axiale. De la même façon, en présence d'une solution d'alexa (concentration = $1,3\text{ mM}$), l'intensité de fluorescence à l'intérieur de la cuve décroît au fur et à mesure que le point de focalisation pénètre dans la cuve, alors qu'elle devrait rester constante. Cette variation ne résulte pas d'une disparition ou de la dégradation des molécules fluorescentes [184] ; elle est provoquée par la baisse d'intensité d'excitation qui résulte de la dispersion spatiale du point focal et de la perte de résolution sur le trou de détection.

Afin d'éviter ces aberrations et de conserver une résolution spatiale constante, nous avons utilisé un objectif à immersion prévu pour corriger la dispersion du point focal induite par une lamelle de verre. La lentille hémisphérique de l'objectif est conçue de telle façon que les rayons pénètrent sur la lamelle avec une incidence qui est fonction de l'ouverture numérique. Après passage dans les milieux d'indices différents (eau, verre, eau), tous les rayons sont focalisés à la même position. Cette correction est généralement effectuée pour une épaisseur de lame donnée. Toutefois, certains objectifs sont équipés d'un système de correction variable qui permet de compenser des épaisseurs de lames différentes.

En résumé, l'objectif dont nous avons besoin doit avoir une focale d'au moins 100 μm , une grande ouverture numérique et doit nous permettre de travailler sous une lamelle de microscope sans perte de résolution.

L'objectif OLYMPUS 60X à immersion dans l'eau (Figure 52) remplit ces conditions.

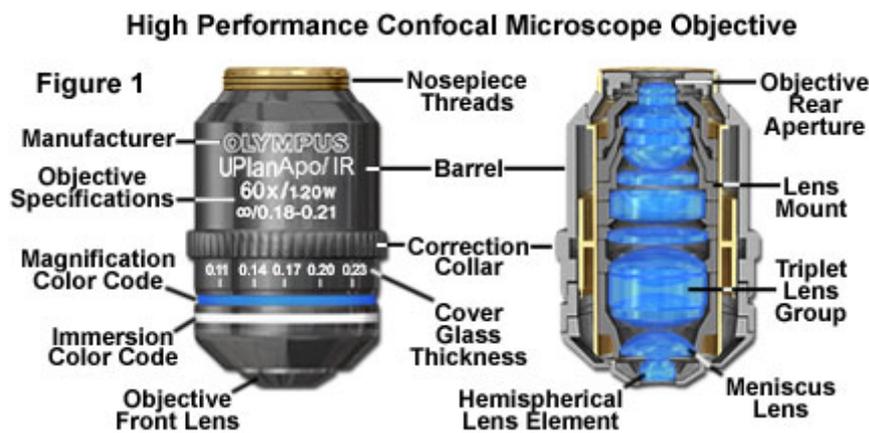


Figure 52 : Description de l'objectif utilisé

Ses caractéristiques sont les suivantes :

- **Distance de travail maximale sous la lamelle** : 230 μm
- **Grandissement** : 60X
- **Ouverture numérique** : 1,2
- **Correction d'indice** pour du verre d'épaisseur comprise entre 110 μm et 210 μm
- **Gamme de longueur d'onde** : visible
- **Résolution latérale** théorique pour $\lambda = 590 \text{ nm}$: 300 nm
- **Résolution axiale** théorique en utilisant l'approximation de l'optique gaussienne pour $\lambda = 590 \text{ nm}$: 958 nm

L'utilisation de cet objectif dans des conditions identiques à celles de l'expérience précédente (Figure 51) est présentée Figure 53. Cette expérience montre que le pic de diffusion en fond de cuve présente une largeur à mi-hauteur identique à celle que l'on observe en face avant (environ 1 μm). De plus, l'épaisseur de la cuve observée correspond à son épaisseur réelle, et l'intensité de fluorescence mesurée reste constante sur la largeur du balayage.

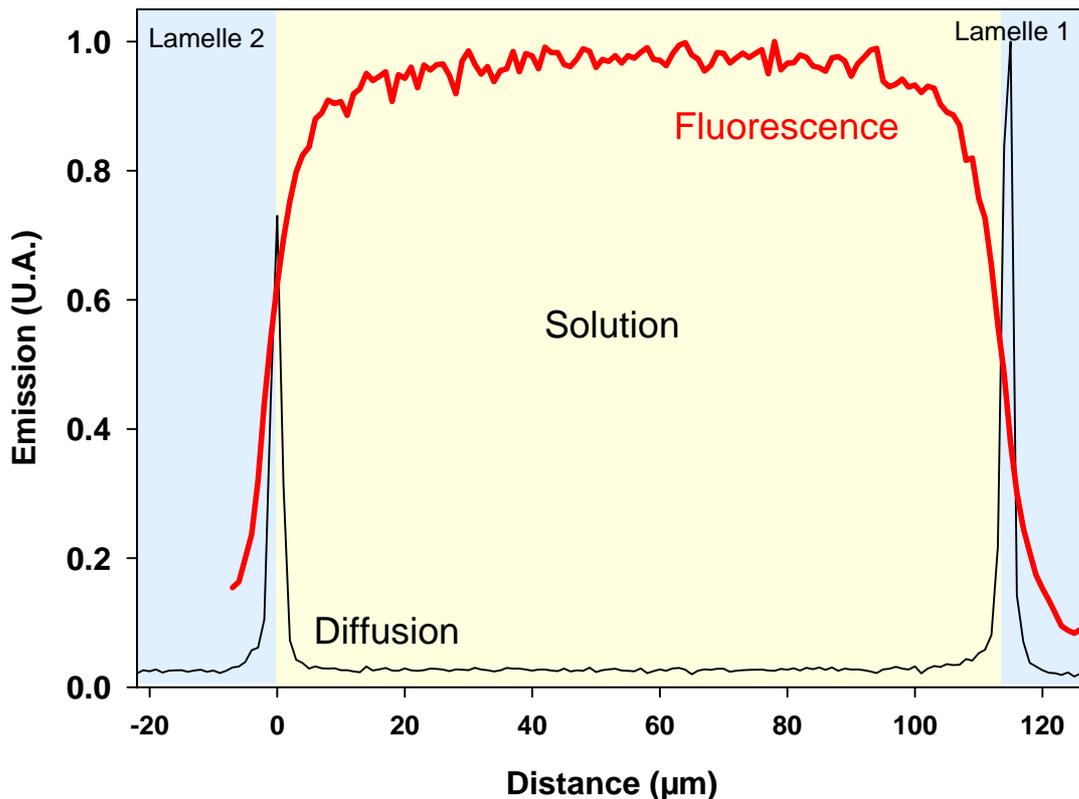


Figure 53 : Spectre de fluorescence et diffusion d'une cuve contenant de l'Alexa effectués avec l'objectif OLYMPUS 100X

Dans le cadre des études de polarisation de fluorescence, se pose la question de la perte de polarisation engendrée par l'utilisation d'un objectif ayant une ouverture numérique importante. Un modèle théorique [185, 186] explicite l'évolution de l'anisotropie de fluorescence r_0 observée en fonction de l'ouverture numérique de collection. Ce modèle met en évidence une sous estimation de r_0 par l'expérience. Dans une première phase, nous ne nous sommes pas attachés rigoureusement aux valeurs de r_0 . Devant la difficulté des mesures, nous avons juste vérifié que celles-ci étaient proches de celles attendues. Pour vérifier l'aptitude de notre objectif, et de façon plus large, de notre système complet, nous avons plus

simplement comparé les résultats d'anisotropie de fluorescence résolue dans le temps obtenus avec le montage « classique » avec ceux obtenus en mode confocal. Ces expériences qui seront présentées et commentées dans le chapitre V (p 142), mettent en évidence que l'ouverture numérique de l'objectif que nous avons choisi ne perturbe pas les mesures d'anisotropie.

La qualité de la détection et la résolution spatiale des mesures de fluorescence sont liées à l'objectif (excitation/détection). Toutefois, afin d'obtenir un point de focalisation à la limite de diffraction, il est nécessaire que la source d'excitation soit à la hauteur des performances attendues. Le traitement de cette autre partie du montage constitue le deuxième poste « Source » du schéma de la Figure 48.

2.2. L'excitation

2.2.1. Les sources lumineuses

La propriété de cohérence de l'onde optique des faisceaux lasers de mode TEM₀₀ permet d'obtenir des points de focalisation de taille inférieure au micromètre. De plus, cette cohérence, grâce à l'utilisation d'un filtre spatial, permet l'obtention d'une source d'excitation parfaitement propre (chapitre I p 23). A elle seule, cette propriété de cohérence fait des lasers les sources idéales pour la réalisation d'un montage confocal [187].

Ces sources présentent également, suivant les expériences à réaliser, les avantages suivants :

- **elles sont monochromatiques** : le colorant est plus facile à cibler, le filtre dichroïque est plus facile à choisir,
- **elles sont peu divergentes** : le faisceau est plus facile à « manipuler »,
- **elles peuvent être polarisées** : possibilité de mesure d'anisotropie.

Nous avons utilisé trois sources d'excitations différentes :

- **Un laser Nd :YAG doublé (532 nm)** : Ce laser continu a été utilisé pour mesurer les profils de concentration. Son principal inconvénient est son manque de stabilité qui induit des changements du mode TEM₀₀.
- **Un laser HeNe (632,8 nm)** : Il a été utilisé essentiellement pour les alignements optiques. Les études d'adsorption n'ont pas pu être effectuées

avec ce laser car sa longueur d'onde n'est pas compatible avec le marqueur fluorescent sélectionné.

- **Un laser à colorant** (chapitre II p 68) : Ce laser a été utilisé en mode impulsionnel aussi bien pour effectuer des profils de concentration que pour toutes les études de fluorescence résolue en temps en mode confocal. Le mode TEM_{00} de ce Laser est parfaitement adapté à une utilisation en mode confocal.

2.2.2. Filtre spatial d'excitation

Dans un montage confocal, le filtre spatial d'excitation a trois fonctions :

- il permet de **définir** avec précision la position de la source d'excitation,
- il permet de **nettoyer** le faisceau d'excitation de la lumière parasite diffusée au cours du passage dans les optiques précédentes,
- il permet d'effectuer une **expansion** du faisceau de façon à ce que celui-ci recouvre parfaitement la pupille d'entrée de l'objectif d'excitation.

Pour que le point de focalisation obtenu par la première lentille puisse être considéré comme une nouvelle source ponctuelle, il est nécessaire de s'assurer que son diamètre n'est pas limité par des aberrations optiques. La lentille de focale 12 mm étant un achromat, seule la limite de diffraction reste à considérer (Équation 22 p26). Cette limite dépend du laser utilisé (rapport longueur d'onde/diamètre du faisceau) ; elle varie de 15 à 30 μm suivant le laser choisi.

Le diamètre du trou au point de focalisation a été choisi à partir de la valeur de la limite de diffraction ; il doit être légèrement inférieur au *beam waist* du point focal de façon à assurer sa fonction de filtre. Nous l'avons fixé à 15 μm pour les expériences avec le laser à colorant, à 25 μm pour le laser YAG.

La pupille d'entrée de l'objectif X60 a un diamètre de 9 mm. Les lasers utilisés ont tous un diamètre de faisceau supérieur au millimètre ; le rapport de grandissement de l'expansion du faisceau doit donc être au minimum de 10 de façon à recouvrir entièrement celle-ci. Nous avons utilisé une lentille de 152,4 mm de focale ; le grandissement dans ce cas est de 12,7. Ce rapport introduit une légère troncature des faisceaux ; ceci n'a pas d'effet sur la résolution spatiale, sa seule conséquence est une perte partielle de l'énergie d'excitation (chapitre I p 23).

2.2.3. Polarisation du faisceau d'excitation

Les études de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence imposent que le faisceau d'excitation ait une polarisation parfaitement définie (chapitre II p 66). Bien que les lasers que nous utilisons soient polarisés par construction, nous avons choisi de placer un polariseur de type Glan Taylor devant de la lentille de focalisation du filtre spatial d'excitation. Il assure après l'ensemble du trajet optique en amont du filtre spatial, une parfaite polarisation de l'excitation.

2.2.4. Atténuation du faisceau d'excitation

L'énergie au point de focalisation de l'objectif d'excitation est confinée dans un volume extrêmement petit, typiquement de l'ordre du microlitre ; dans ces conditions, la densité de photons peut très rapidement atteindre des valeurs telles que des processus de dégradation ou de photosaturation apparaissent. Pour éviter ces phénomènes, il est nécessaire d'atténuer l'énergie du faisceau d'excitation. Le moyen le plus simple est d'intercaler des filtres neutres ou d'utiliser un atténuateur variable ; toutefois, le changement ou la rotation du filtre introduit en pratique une déviation systématique du faisceau laser d'excitation. Cette déviation est suffisante pour modifier l'alignement du trou confocal et donc perturber le réglage de l'ensemble du système. Cette perturbation est particulièrement grave car nous sommes fréquemment amenés à modifier l'énergie d'excitation en cours d'acquisition. Pour cette raison nous avons choisi d'utiliser une lame demi-onde motorisée (rotation du plan de polarisation) en amont du polariseur. Cette méthode ne modifie pas l'alignement optique et ne modifie donc pas les caractéristiques du système.

2.3. Séparation des faisceaux d'excitation et de fluorescence.

L'excitation et la collection de lumière étant assurées par la même optique, les deux faisceaux, en sortie de l'objectif, sont colinéaires. Le rôle du miroir dichroïque est de séparer ces longueurs d'ondes (Figure 54).

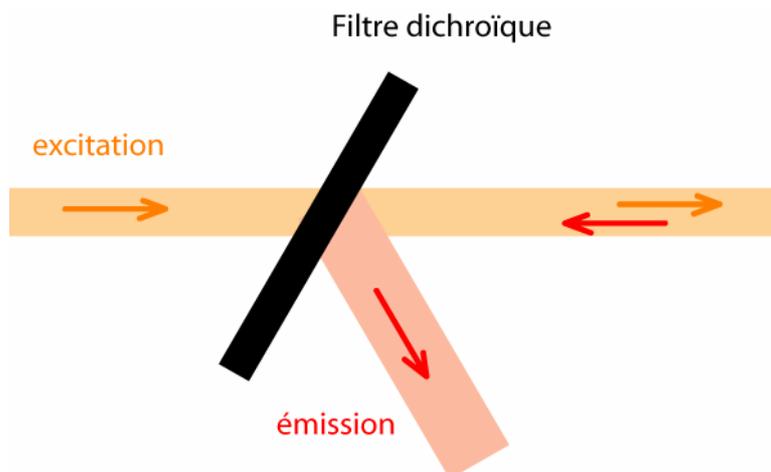


Figure 54 : Séparation des faisceaux d'excitation et émission par un filtre dichroïque

Du fait de la symétrie entre les spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence, le maximum de l'excitation est toujours très proche du maximum d'émission. Dans une expérience de type confocal, où l'on recherche toujours à minimiser l'énergie d'excitation et à maximiser l'efficacité de la collection, le choix du miroir dichroïque est toujours très délicat. Le facteur déterminant est le front de coupure qui sépare la transmission et la réflexion ; l'autre paramètre important est la largeur spectrale de l'émission que l'on souhaite obtenir.

Nous avons choisi un miroir dichroïque Omega 93/XF2023 qui a été placé de façon à réfléchir la fluorescence et à transmettre l'excitation. L'angle du miroir avec l'axe optique a été optimisé de façon à transmettre un minimum d'excitation (la quantité de photons d'excitation disponibles étant considérable), et à réfléchir le maximum de la plage d'émission.

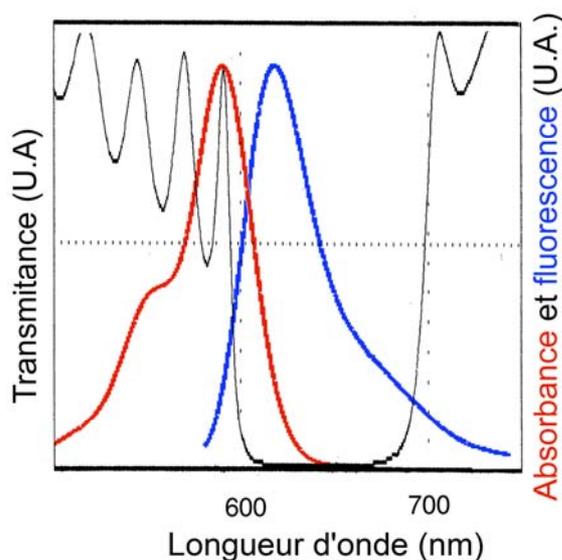


Figure 55 : Transmittance du filtre dichroïque et spectre d'absorbance et d'émission de l'alexa fluor 594

Nous pouvons observer sur la Figure 55 que la transmission du filtre n'est pas totale pour la longueur d'onde d'excitation. Ainsi, une infime partie du faisceau d'excitation pourra être réfléchi vers la chaîne de détection. Cette énergie d'excitation résiduelle a été utilisée, d'une part, dans les expériences de fluorescence dynamique, pour l'acquisition de la réponse impulsionnelle d'excitation, d'autre part, au cours des expériences de balayage en Z, afin d'obtenir les pics de diffusion.

L'autre contrainte extrêmement importante liée au choix du miroir dichroïque est l'influence qu'il peut avoir sur la transmission et la réflexion de la lumière polarisée. Il est essentiel que la lumière réfléchi ne soit pas dépolarisée par cette réflexion ; dans le cas où seul le rapport des polarisations verticale et horizontale est modifié, il est possible de corriger les déclin obtenus (chapitre II p 72).

Pour le miroir dichroïque choisi, l'effet sur la polarisation s'est avéré très faible ; le facteur g de correction a toujours été trouvé très proche de l'unité.

2.4. Optimisation de la détection

La chaîne de détection se décompose en trois parties : le trou confocal de détection, le polariseur d'émission, le photomultiplicateur de comptage.

Le trou confocal sert à éliminer la contribution des photons ne provenant pas du plan focal d'excitation. C'est lui qui permet d'obtenir la résolution en Z. Il se compose, de la même façon qu'un filtre spatial, d'une lentille de focalisation, d'un trou, et d'une deuxième lentille servant à recollimater le faisceau. Les photons de fluorescence n'étant pas émis par une source laser, ce dispositif ne peut pas être assimilé à un filtre spatial dans le sens de l'optique gaussienne. En revanche, la taille du point de focalisation est toujours limitée par la diffraction ainsi que soumise aux mêmes aberrations optiques que celles décrites précédemment. La largeur du domaine d'émission du marqueur fluorescent choisi (600 à 660 nm) nous oblige à utiliser une lentille achromatique afin de focaliser toutes les longueurs d'onde en un même point. Ceci permet de collecter le maximum de lumière avec une bonne résolution spatiale. Le diamètre du trou confocal est déterminé à partir de la taille du point focal de l'objectif et de son grandissement. L'optique que nous utilisons est corrigée à l'infini (UIS) ; ceci signifie que l'émission de fluorescence sortant de l'objectif peut être assimilée à

un faisceau parallèle sur toute la longueur équivalente du tube du microscope (180 mm). Dans ces conditions, le diamètre du trou confocal d peut être calculé par la relation suivante :

$$d = \frac{d_0 GF}{T}$$

Équation 68

avec,

- G le grandissement de l'objectif,
- F la focale de la lentille de focalisation sur le trou confocal,
- T la longueur du tube de microscope : 180 mm (donnée du constructeur),
- d_0 le diamètre du point de focalisation de l'objectif.

En prenant comme diamètre de focalisation celui calculé à partir de la limite de diffraction de l'objectif : ($d_0 = 0,600 \mu\text{m}$ à 590 nm), et une focale de 76,4 mm pour la lentille devant le trou confocal, le diamètre du trou confocal d est de 15 μm .

Nous avons choisi de déplacer la lentille de focalisation plutôt que le trou ; dans ces conditions, l'alignement en X,Y,Z est alors beaucoup plus facile à réaliser.

Les photons sélectionnés par le trou sont recollimatés à l'aide d'une lentille achromatique de 20 mm de focale. Le faisceau pseudo parallèle obtenu a alors un diamètre de l'ordre de 2 mm. La sélection de la polarisation de l'émission est assurée par un polariseur film motorisé placé sur le trajet optique de ce faisceau. Les photons polarisés sont détectés par un photomultiplicateur Hamamatsu H7313 câblé en mode comptage.

Au cours des expériences réalisées sur, ou au voisinage immédiat, de surfaces diffusantes, nous avons dû intercaler un filtre optique afin d'éliminer les photons d'excitation.

2.5. Cuve d'écoulement et déplacement de l'échantillon

Les derniers éléments que nous avons mis au point sont la cuve d'analyse (Figure 56) et le système de déplacement de celle-ci.

La cuve d'analyse doit nous permettre de faire circuler une solution sur la surface à étudier. Les contraintes de réalisation sont nombreuses et difficiles à résoudre compte tenu de sa taille.

La face supérieure de la cuve est une lamelle de microscope dont l'épaisseur, de l'ordre de 140 μm , est compatible avec l'objectif à immersion. Les conditions expérimentales des mesures d'adsorption imposent que l'épaisseur de la fente de circulation soit parfaitement définie et identique en tout point de la cellule. Elle doit, de plus, être compatible avec la distance de travail de l'objectif. L'ensemble du système doit être parfaitement étanche, même sous pression ; les joints doivent être indéformables. De plus, cette cellule doit permettre d'étudier différents types de surfaces. A cause de contraintes techniques, elle n'a pas pu être identique à celle utilisée pour les mesures de radiodétection. Ainsi nous n'avons pas pu faire arriver la solution dans un compartiment d'entrée avant la fente ; la solution arrive directement sur la surface à étudier.

La cellule (Figure 56) est composée de deux pièces inox entre lesquelles sont intercalées la surface d'étude, la conduite d'écoulement et une lamelle de microscope. Le conduit d'écoulement est réalisé à partir d'un film de PET de 100 μm d'épaisseur dans lequel a été découpé une conduite d'écoulement de longueur 45 mm et de largeur 3 mm. La section de la fente est, dans ces conditions, de 0,3 mm^2 . L'arrivée et l'évacuation de la solution s'effectuent *via* des tubes en téflon de 2 mm de diamètre, soit de section 3,14 mm^2 . Tous les éléments composant la cellule ont été polis afin d'éviter les fuites.

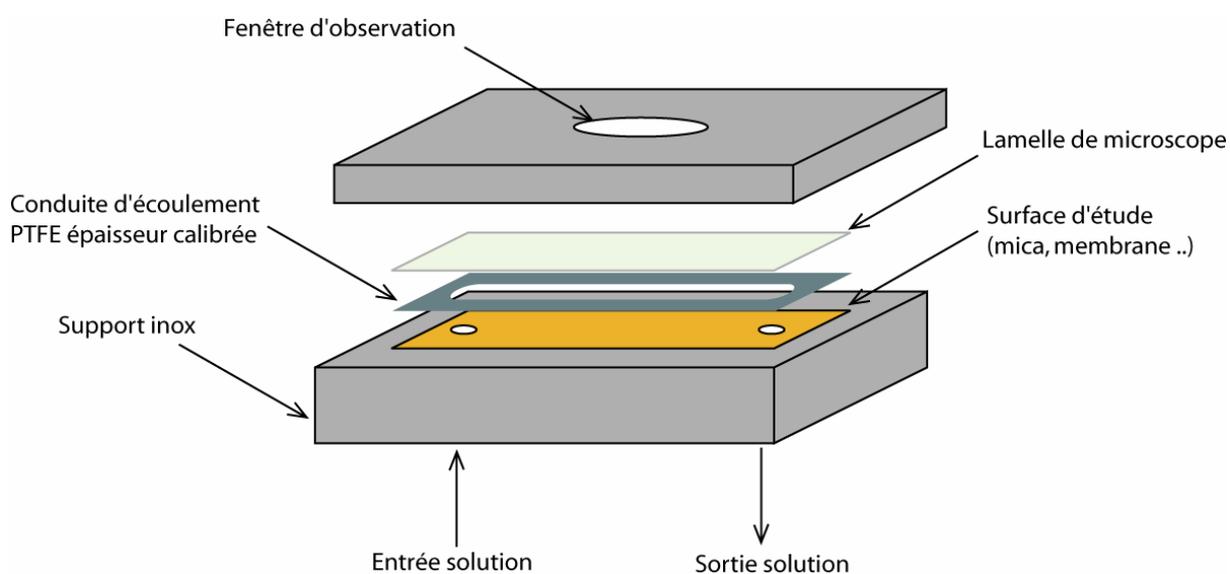


Figure 56 : Cellule d'écoulement

Pour mesurer des profils de concentration, il est nécessaire de déplacer la focalisation du faisceau en différents points correspondant à différentes profondeurs dans la solution. Il existe deux possibilités : soit motoriser l'objectif, soit motoriser la cellule. Le déplacement,

dans tous les cas, doit être suffisamment petit pour obtenir des profils bien résolus. Nous avons dû abandonner la motorisation de l'objectif car celle-ci modifie sensiblement l'alignement optique. Le déplacement de la cellule a été réalisé grâce à une platine XYZ motorisée et pilotée à partir du programme d'acquisition (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

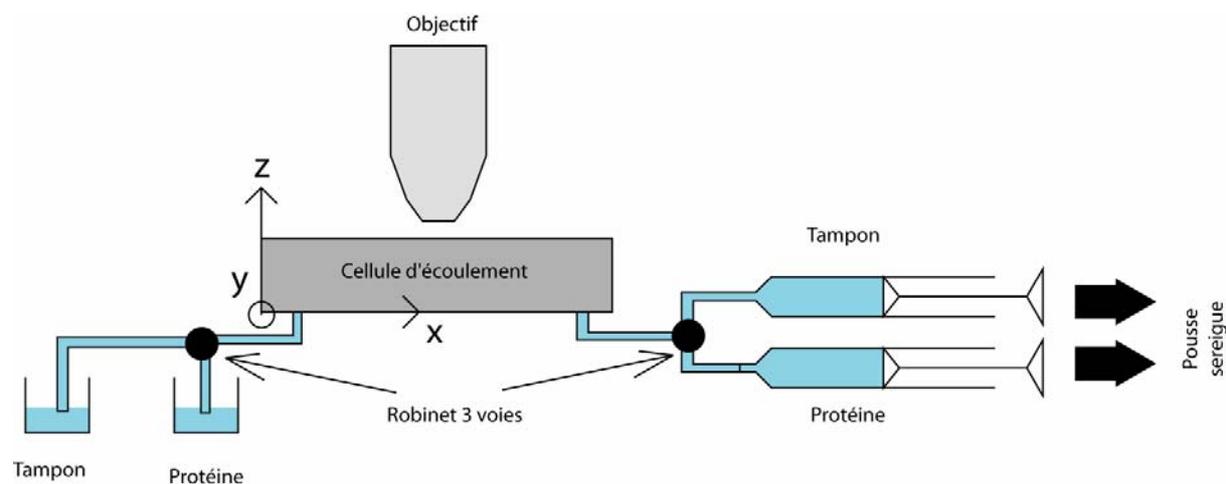


Figure 57 : Dispositif d'écoulement des solutions dans la cellule

L'écoulement dans la cellule est effectué à l'aide d'un « pousse seringue » (Harvard Pump 33) par aspiration des solutions (Figure 57). Dans le cas contraire, nous avons constaté une déformation de la lamelle de verre sous la pression appliquée. Cette déformation change la géométrie de la cellule, entraînant des modifications de volume, de flux et d'optique, ce qui rend les mesures peu fiables.

Nous avons réalisé la motorisation du déplacement de la cuve d'écoulement à l'aide de moteurs pas à pas et d'un démultiplicateur. Chaque mouvement correspond à deux demi-pas moteur, soit un déplacement par incrément de 100 nm. Nous avons vérifié la reproductibilité des déplacements en suivant la position des pics de diffusion. A chaque balayage, la distance mesurée entre les pics (face avant, face arrière) a été trouvée identique ; le léger décalage introduit au départ de chaque balayage, probablement dû au rattrapage des engrenages du multiplicateur de pas, est facilement corrigé par référence au pic de diffusion.

3. Acquisition des données

En mode dynamique, l'acquisition des déclins de fluorescence (durée de vie et polarisation) est effectuée de façon identique à la technique classique en solution décrite au chapitre II (p 71). Toutefois une petite différence existe dans l'acquisition de la fonction instrumentale. Nous avons utilisé une solution diffusante dans le mode classique et la réflexion du faisceau d'excitation sur un miroir dans le mode confocal.

En mode statique, les impulsions du photomultiplicateur correspondant aux photons détectés, sont envoyées, après passage dans un discriminateur, vers un analyseur multicanaux (MCS). Ces impulsions sont sommées, dans chaque canal, durant un incrément de temps défini; parallèlement l'échantillon est déplacé grâce au moteur pas à pas. Chaque canal correspond à une position du balayage sur l'axe z ; de cette façon, on obtient un profil de fluorescence. L'intensité de l'excitation laser est enregistrée parallèlement. Le temps d'accumulation par point, ainsi que l'amplitude des pas du déplacement, ont été ajustés selon le type d'expérience et la zone observée.

4. Caractéristiques du dispositif

Le dispositif optique final obtenu après toutes ces considérations est présenté Figure 58 & 59. Cet équipement permet d'effectuer des mesures en mode confocal de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence résolues dans le temps et d'enregistrer des profils de concentration sur une surface comme en solution. La résolution spatiale en Z du système est de l'ordre de 1 μm à 1,5 μm (suivant la source laser). Ceci correspond à un volume confocal de l'ordre du femtolitre (10^{-15} l).

Les différentes sources lumineuses ont déjà été décrites. La partie excitation, composée d'une lentille convergente F1 de focale 12 mm focalise le faisceau sur un trou de 25 μm . La lentille F2 de focale 152,4 mm permet de reformer un faisceau parallèle avec une expansion d'un facteur 12,7. Le filtre dichroïque laisse passer l'excitation. Le faisceau laser est focalisé sur l'échantillon grâce à l'objectif à immersion et à correction d'indice. La fluorescence émise par l'échantillon est collectée par l'objectif et réfléchiée par le filtre dichroïque, puis par un miroir. La lumière est ensuite focalisée par la lentille F3 (montée sur une platine X,Y,Z) de focale 76,4 mm sur le trou confocal de 15 μm de diamètre. La lentille F4 de focale 20 mm permet de reformer un faisceau pseudo parallèle en direction du

détecteur. Le dispositif de filtre placé devant le photomultiplicateur permet, suivant sa position, de collecter le maximum de fluorescence tout en coupant la diffusion, grâce à un filtre passe haut optimisé, ou de collecter la diffusion (fonction instrumentale en mode temporel, profil de diffusion en mode statique). Lors des expériences d'anisotropie de fluorescence, un polariseur motorisé est placé devant le détecteur. Selon les expériences, une photodiode prend la réflexion de l'excitation sur le miroir dichroïque pour enregistrer les fluctuations du laser, ou bien, la réflexion du filtre passe haut, derrière le trou confocal, pour suivre la position des pics de diffusion.

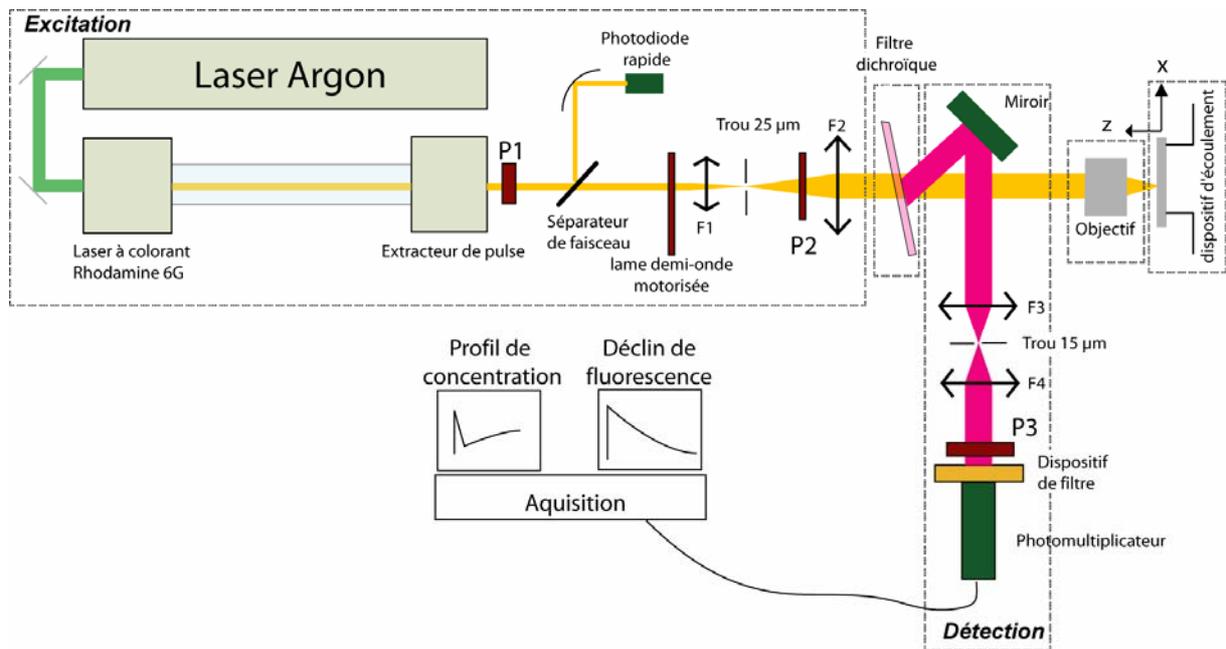


Figure 58 : Montage confocal

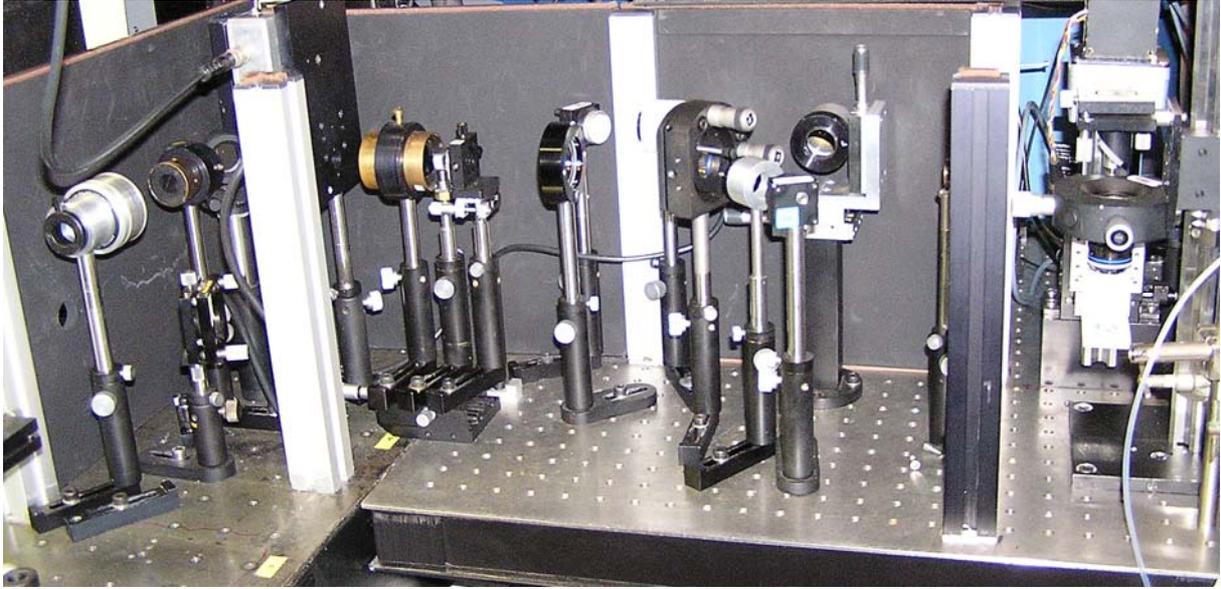


Figure 59 : Photo du dispositif optique confocal

5. Protocole expérimental pour l'étude de la cinétique d'adsorption

Une fois le dispositif mis au point, il est nécessaire de déterminer les séquences d'acquisition du protocole expérimental afin d'observer l'évolution du profil de concentration de la protéine en solution et de la concentration interfaciale en fonction du temps.

5.1. Contraintes expérimentales

Nous sommes limités par la distance de travail de l'objectif : soit 230 μm . En outre, pour une analyse simplifiée des résultats, il est préférable de ne pas avoir de déplétion au centre de la cuve. Ainsi, il est nécessaire que la demi-épaisseur de la cuve soit supérieure à 3 fois la distance de Lévêque. L'épaisseur de la cuve utilisée étant de 100 μm , nous avons ainsi déterminé par l'Équation 46 (p 56) la gamme de gradient de vitesse que nous aurons à utiliser. Etant donné que la distance à l'entrée est fixée ($x=20$ mm), nous pouvons estimer une borne inférieure du gradient de vitesse γ pour lequel dans une cellule d'épaisseur b , la condition $3\delta_{Lev} \geq b/2$ est remplie. Avec $b=100$ μm et $D=6.10^{-7}$ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, le gradient de vitesse γ minimum est de 1650 s^{-1}

Ensuite il a été nécessaire de déterminer la concentration en avidine de la solution marquée. Celle-ci a été déterminée en prenant en compte trois paramètres :

- **la quantité de protéine marquée** (A-B4al) consommée par expérience,
- **le signal de fluorescence qui doit être significatif par rapport au bruit**,
- **la durée du processus d'adsorption** ; celle-ci doit être assez longue pour que l'on puisse effectuer un nombre de balayages suffisant pour la mise en évidence de la variation du profil au cours du temps.

5.2. Mise au point de la séquence d'acquisition

La seconde étape de la mise au point du protocole expérimental est la définition de la séquence d'acquisition. Notre objectif est de pouvoir suivre à la fois l'évolution de la concentration interfaciale et l'évolution du profil de concentration en solution.

L'observation des profils de concentration lors de l'écoulement d'une solution de protéines marquées pose le problème du niveau du seuil de détection de l'expérience. L'étude de la dynamique d'adsorption est effectuée avec des concentrations très faibles de l'ordre de 2 à 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$, soit entre 30 nM et 230 nM de protéines. Ces concentrations correspondent pour un volume confocal d'un femtolitre à un nombre de molécules de l'ordre de 20 à 140. L'augmentation de l'énergie d'excitation, dans ces conditions, n'est envisageable que dans la mesure où celle-ci reste en dessous du seuil de photodégradation et de photosaturation des molécules. Si nous pouvons penser qu'en solution, en raison de la diffusion et de la convection, les protéines ne restent que peu de temps dans le volume confocal et que les mécanismes de relaxation sont très efficaces, la situation sur la surface est beaucoup moins favorable. L'échauffement de la surface sous l'effet du laser est probablement beaucoup plus important qu'en solution ; ceci risque de conduire à une destruction rapide des molécules.

Dans les conditions d'énergie d'excitation où nous avons travaillé, l'intensité de fluorescence d'une solution d'avidine marquée ne montre pas, sous écoulement, de baisse sensible provenant de phénomènes de photodégradation ou de photosaturation. En revanche, dans ces mêmes conditions, on observe sur la surface une baisse importante de l'intensité de fluorescence. Ceci est présenté dans l'expérience de la Figure 60.

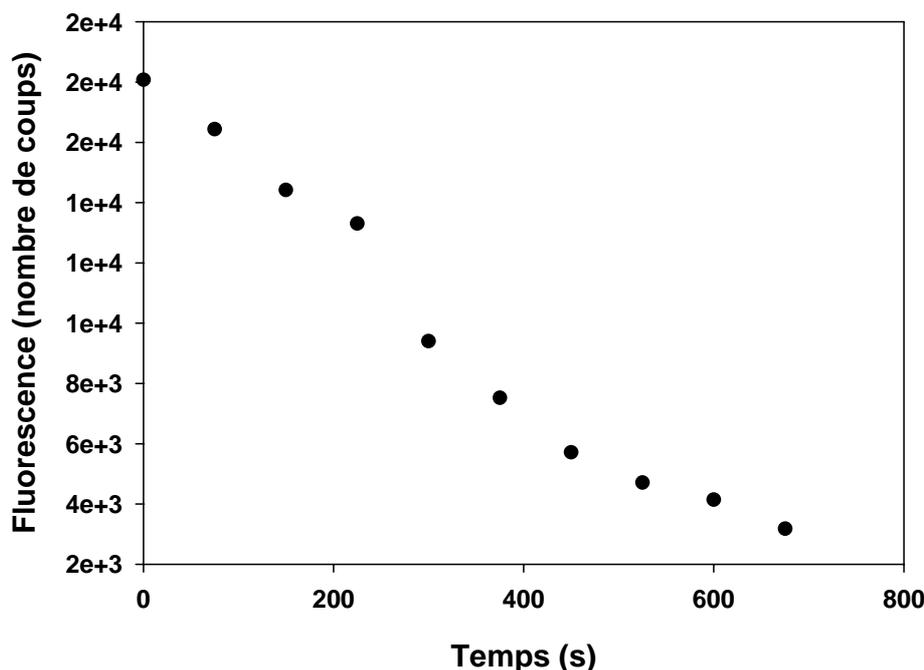


Figure 60 : Evolution de la fluorescence à la surface en fonction du temps. Expérience effectuée sous écoulement de tampon après adsorption de protéines.

Dans cette expérience, l'avidine a été adsorbée sur une surface de mica, puis, une fois le processus d'adsorption terminé, nous avons continué les balayages et mesuré l'émission de fluorescence de la surface. On observe, après chaque balayage, une baisse significative de la fluorescence ; après une période d'obscurité (entre chaque enregistrement), on n'observe pas de retour d'intensité. Cette expérience met en évidence qu'il s'agit d'un phénomène de photodégradation plutôt que de photosaturation. Sur l'interface, les protéines adsorbées ne sont plus capables d'émettre de la fluorescence, ce qui n'est pas observé dans la solution. Le processus de photodégradation est un phénomène complexe ; le chromophore peut être modifié photochimiquement et ne plus être fluorescent sans pour autant que la protéine ne soit détruite. Cette expérience ne permet pas d'apporter de réponse univoque sur le processus mis en jeu.

A partir de ces considérations, nous avons été amenés à séparer, dans la séquence de balayage, la zone concernant la surface de celle concernant la solution. Le réglage de la séquence d'acquisition a été effectué à partir de multiples expériences. L'objectif visé était d'obtenir le maximum d'informations, tout en minimisant le plus possible la durée de chaque balayage.

Sur la surface, les protéines adsorbées forment une couche d'épaisseur de quelques nanomètres. Le signal de fluorescence est proportionnel à l'excitation du laser ; son intensité va donc suivre la distribution d'énergie du faisceau, selon l'axe optique Z . L'expression mathématique de la distribution d'énergie a été établie précédemment (Équation 30, p 29). Sur la Figure 61 est représenté un profil obtenu par balayage selon l'axe Z à travers une surface de verre, sur laquelle a été préalablement adsorbée de l'avidine marquée.

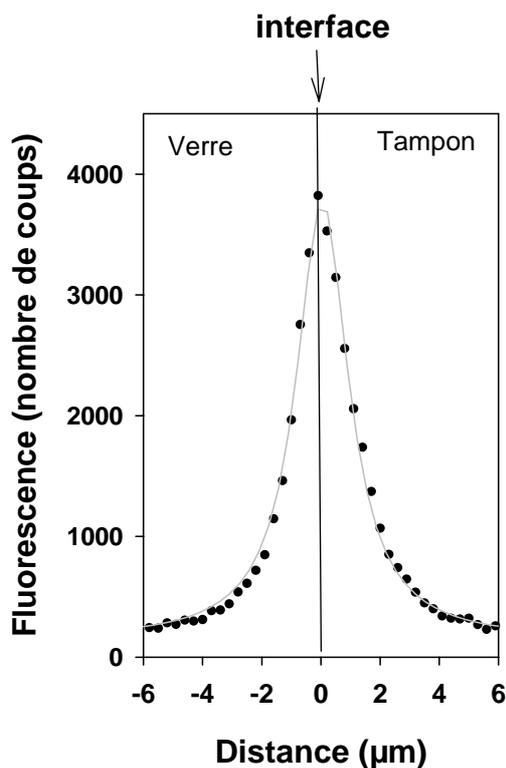


Figure 61 : Distribution de fluorescence de l'avidine marquée adsorbée sur du verre

Le profil de fluorescence de la surface observé va être utilisé pour l'analyse des données ; il est donc nécessaire de prendre suffisamment de points pour définir cette région. En revanche, afin d'éviter de détruire les protéines adsorbées, on a intérêt à ne pas rester trop longtemps sur la surface. L'intensité de fluorescence de la surface étant très importante, le taux de comptage, même sous faible illumination, est suffisant pour permettre une accumulation rapide. A partir de simulations et en fonction de la résolution spatiale en Z du système, une séquence fixée à 10 points séparés de 300 nm uniformément répartis a été optimisée. Le temps d'accumulation par point a été fixé à 500 ms, soit pour l'ensemble 5 s. L'énergie d'excitation a été réglée de façon à ne pas altérer l'échantillon ; de plus, entre chaque balayage, celui-ci est translaté latéralement de 2 µm. De cette façon le faisceau laser n'est jamais focalisé au même endroit durant l'expérience.

Dans la solution, l'émission de fluorescence est au plus égale à celle de la solution circulante ; c'est-à-dire bien inférieure à celle des molécules adsorbées sur l'interface. En ce qui concerne le balayage qui se situe dans cette région, l'énergie peut être notablement augmentée sans pour autant détruire l'échantillon. L'intensité de l'excitation laser est modifiée, au cours de l'expérience, par rotation de la lame demi-onde placée avant le filtre spatial d'excitation. L'intensité de fluorescence, de la surface à la solution, varie d'un facteur de 10 à 20. D'autre part, afin d'augmenter la sensibilité de la mesure, le temps d'accumulation par point peut être augmenté pour compenser l'effet de concentration. Afin d'améliorer la statistique de chaque point (statistique de Poisson), nous avons privilégié le temps par point plutôt que le nombre de points.

Pour définir la séquence d'acquisition des profils de concentration en solution, nous nous sommes basés sur le modèle de Lévêque. Globalement, il est possible de distinguer trois zones de variations différentes en fonction de la distance à l'interface. La première zone, au voisinage immédiat de la surface, est une zone de forte variation ; si les conditions expérimentales ont été judicieusement choisies, c'est la zone où l'on peut observer le plus le phénomène de déplétion. C'est également cette zone qui permet de tirer le maximum d'information à partir des modèles. Le déplacement dans cette partie du balayage a été choisi relativement petit, généralement de 500 nm sur 7 à 10 μm . Au-delà de cette distance, le phénomène de déplétion reste observable, mais sa variation étant beaucoup plus faible, le déplacement peut être effectué avec un incrément de pas beaucoup plus important. Nous avons utilisé typiquement des pas de 2 μm sur une distance de 10 μm . Enfin la dernière région du balayage représente une zone de variation extrêmement faible. L'intensité de fluorescence dans cette zone est importante ; elle permet de calibrer les concentrations des différentes zones en fonction du nombre de coups mesurés à la fin de l'expérience, où la concentration est celle de la solution injectée.

Compte tenu de tout cela, les séquences que nous avons utilisées durent en moyenne entre 40 et 60 secondes, selon le débit de la solution choisie.

6. Analyse des données

Après les premiers enregistrements, il est apparu clairement que l'émission de fluorescence de la surface était tellement intense au regard de celle de la solution qu'il serait quasiment impossible d'extraire de l'information au voisinage de l'interface sans traitement

mathématique préalable. Bien que la résolution selon l'axe Z soit expérimentalement de l'ordre de 1 à 1,3 μm , l'intensité de fluorescence de la surface entache la mesure dans la solution jusqu'à des distances de près de 10 μm .

Pour soustraire la contribution de la surface, il est donc nécessaire de modéliser le système. Le profil de fluorescence de la surface résulte de la distribution d'énergie du faisceau laser selon l'axe Z . En faisant l'hypothèse que l'objectif du microscope se comporte comme une lentille simple et dans les conditions de limite de diffraction, cette distribution d'énergie peut être évaluée à partir des équations de l'optique gaussienne (Équation 22, p26). L'ajustement mathématique pour cette fonction requiert 3 paramètres : un paramètre de position Z_0 , un paramètre d'amplitude A_1 et un paramètre de largeur à mi-hauteur W_z . Le paramètre W_z correspond à la résolution spatiale selon l'axe Z du balayage, soit la résolution axiale ; il permet d'obtenir le rayon du faisceau laser w_0 au point de focalisation. A partir de w_0 , il est possible de calculer le volume confocal dans la solution ainsi que la surface excitée sur l'interface. Ces deux calculs sont essentiels pour estimer le rapport des concentrations entre la solution et la surface à partir du nombre de coups mesurés expérimentalement. Le paramètre Z_0 permet de définir avec précision la position de l'origine du pic de fluorescence de l'interface ; effectivement, au cours de la numérisation, le pas des incréments du déplacement ne donne pas accès à cette valeur. La valeur calculée de A_1 correspond au maximum de fluorescence ; cette valeur n'est pas accessible expérimentalement pour les mêmes raisons que précédemment.

Pour modéliser la solution, nous avons considéré que celle-ci se traduisait comme un créneau d'amplitude A_2 d'origine Z_0 auquel nous avons ajouté une pente pour rendre compte de la variation de la concentration au voisinage de la surface (modèle de Lévêque). L'hypothèse de la variation linéaire de la concentration en fonction de la distance à la l'interface n'est valable qu'au voisinage immédiat de la surface. Pour les ajustements, nous nous sommes limités à une distance de 5 à 10 μm de l'interface. La variation de la pente en fonction du temps traduit l'évolution de la déplétion au voisinage de la membrane ou de la surface. Le critère d'ajustement statistique est un test de χ^2 dans lequel est introduite la statistique de Poisson (Équation 61, p75).

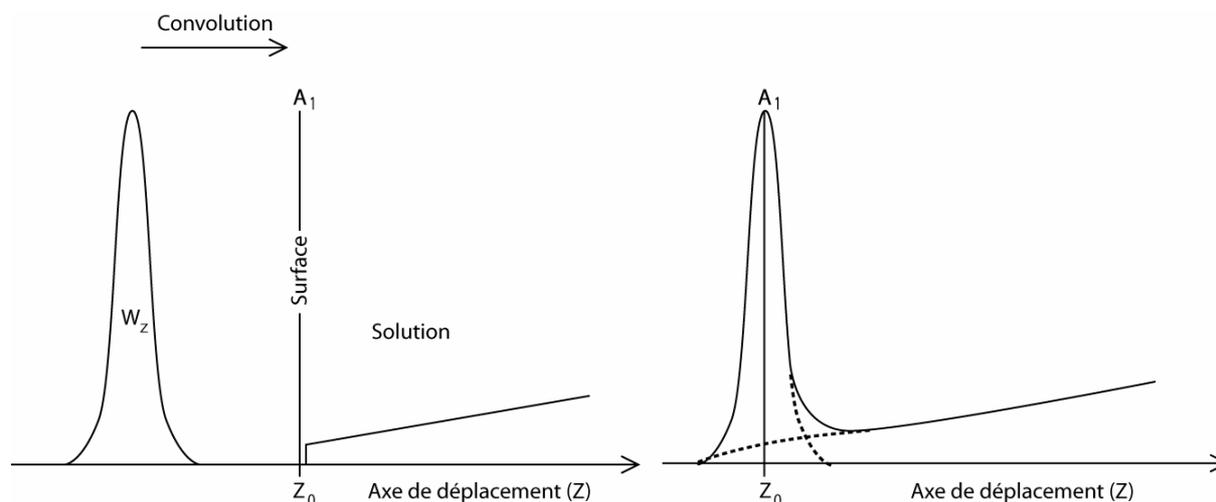


Figure 62 : Convolution de la distribution de l'énergie d'excitation avec le couple interface/solution

Ce modèle permet, compte tenu de la qualité des expériences préliminaires, une analyse assez satisfaisante des données. Toutefois il reste assez limité, notamment par l'approximation qu'il introduit sur les fronts de montée de la solution (Figure 62). Effectivement, le profil d'émission observé résulte de la convolution du profil d'excitation avec le film fluorescent qui est infiniment mince. Dans cette situation, le front de montée du créneau est également convolué avec la distribution d'énergie. L'erreur introduite si on ne tient pas compte de cet effet porte sur les premiers micromètres au voisinage de la surface ; c'est la région la plus intéressante en terme de modélisation.

Dans un premier temps nous avons essayé de déconvoluer mathématiquement les profils de fluorescences enregistrés pendant la circulation de la solution par la fonction instrumentale obtenue à partir du profil de fluorescence de la surface en présence de tampon (à la fin de la même expérience). Cette méthode présente l'avantage de ne pas supposer un modèle théorique. Malheureusement, les méthodes de déconvolution, à partir des transformés de Laplace ou des transformés de Fourier, sont extrêmement sensibles au bruit expérimental. Ainsi il nous a été impossible d'obtenir un résultat satisfaisant.

Les méthodes mathématiques de convolutions ne pose pas de problème dû au bruit, toutefois elles imposent l'utilisation d'un modèle. Un algorithme de calcul basé sur une méthode de convolution, reprenant le modèle décrit précédemment (film infiniment fin et créneau Figure 62) fait partie des objectifs immédiats. Deux possibilités de traitement se présentent : on peut soit utiliser la fonction de distribution d'énergie établie à partir de l'optique gaussienne, soit utiliser directement la distribution expérimentale, enregistrée en fin d'expérience, après rinçage de la cuve (pour éviter la contribution de la solution). La première

solution est relativement simple à mettre en œuvre ; toutefois, là encore, elle suppose que la distribution calculée soit représentative du phénomène. La seconde, bien que beaucoup plus rigoureuse, pose le problème de la reproductibilité des mesures. Pour que celle-ci soit envisageable, il est indispensable que l'optique du système soit aussi parfaite que possible.

Chapitre V. Adsorption de l'avidine sur le mica et la membrane polymère AN-69

Des études d'immobilisation de l'avidine sur des surfaces ont été entreprises sur des interfaces fonctionnalisées avec de la biotine [188-190]. Dans ces études, ce sont les propriétés de reconnaissance moléculaire qui sont mises en jeu et non les propriétés propres à l'adsorption de l'avidine. Clerc et Lukosk ont étudié l'adsorption de l'avidine sur une surface de SiO₂-TiO₂ [191]. Ils ont montré qu'en solution dans du tampon phosphate pH 7,4, le taux maximal de couverture correspondait au modèle RSA (0,54) et qu'il était indépendant de la concentration d'avidine de 2,5 à 500 µg.ml⁻¹ soit de 37 nM à 7,5 µM

L'objectif des études décrites dans ce chapitre était d'effectuer des mesures d'adsorption, avec le dispositif optique mis au point, de l'avidine sur deux types de surfaces, l'une minérale, l'autre polymère. Le mica est une surface modèle communément utilisée en AFM pour les études d'adsorption car c'est une surface très plane et bien définie ; après chaque clivage l'état de surface est parfaitement reproductible. La membrane polymère d'AN-69, portant des groupes sulfonates, est une membrane poreuse de filtration utilisée en hémodialyse.

La cinétique d'adsorption de l'avidine sur le mica a tout d'abord été étudiée par radiodétection, puis nous avons mesuré l'évolution du profil de concentration en solution par fluorescence en mode confocal. Des mesures de fluorescence et anisotropie de fluorescence résolues dans le temps ont été effectuées et comparées avec les mesures obtenues en mode classique.

Enfin nous montrerons une application de la technique à l'étude cinétique de l'adsorption de l'avidine sur la membrane AN-69.

1. Conditions expérimentales

Toutes les expériences ont été effectuées dans une solution tampon phosphate PBS B à pH 7,4. Le point isoélectrique de l'avidine étant de 10,1 cette dernière aura donc une charge globale positive à ce pH. Le gradient de vitesse à l'interface (γ) et la concentration (C_b) ont été choisis afin que le profil stationnaire soit *a priori* observable. Deux expériences préliminaires avec la technique de radiodétection ($C_b = 15$ nM soit $1 \mu\text{g ml}^{-1}$; $\gamma = 1060 \text{ s}^{-1}$ et $C_b = 225$ nM soit $15 \mu\text{g ml}^{-1}$; $\gamma = 500 \text{ s}^{-1}$) vont permettre de comparer la constante initiale d'adsorption k à celle de Lévêque k_{Lev} , et d'estimer les conditions favorables (C_b et γ) à l'observation d'un profil de concentration en solution en mode confocal.

Les expériences en mode confocal ont été effectuées avec des solutions d'avidine marquée (A-B4al) de concentration intermédiaire 75 nM ($5 \mu\text{g.ml}^{-1}$) pour deux gradients de vitesse ($\gamma = 1675 \text{ s}^{-1}$ et $\gamma = 3350 \text{ s}^{-1}$). Cette concentration semble être un bon compromis entre le fait d'avoir suffisamment de molécules dans le volume confocal pour une bonne détection et un temps d'adsorption suffisamment long pour observer la déplétion de la solution.

2. Etudes préliminaires

2.1. Adsorption de ^{125}I -avidine sur le MICA

La mesure de la constante de vitesse d'adsorption, comparée à la constante donnée par le modèle de Lévêque, nous permettra de savoir si les conditions de convection et de concentration sont réunies pour observer la déplétion. Si la constante d'adsorption est proche de celle donnée par le modèle de Lévêque, alors il y aura une déplétion à l'interface.

La Figure 63 montre l'évolution de la concentration interfaciale en fonction du temps. Pour la concentration la plus faible ($C_b = 15 \text{ nM}$ soit $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$), 10 minutes est un temps trop court pour atteindre une valeur stable de la concentration interfaciale (Figure 63 a).

La cinétique d'adsorption avec une concentration en solution 15 fois plus élevée peut être décomposée en deux phases :

- une phase rapide de 2 minutes jusqu'à une concentration interfaciale de $0,25 \mu\text{g cm}^{-2}$,
- une phase beaucoup plus lente de 20 minutes jusqu'à une concentration interfaciale de $0,37 \mu\text{g cm}^{-2}$.

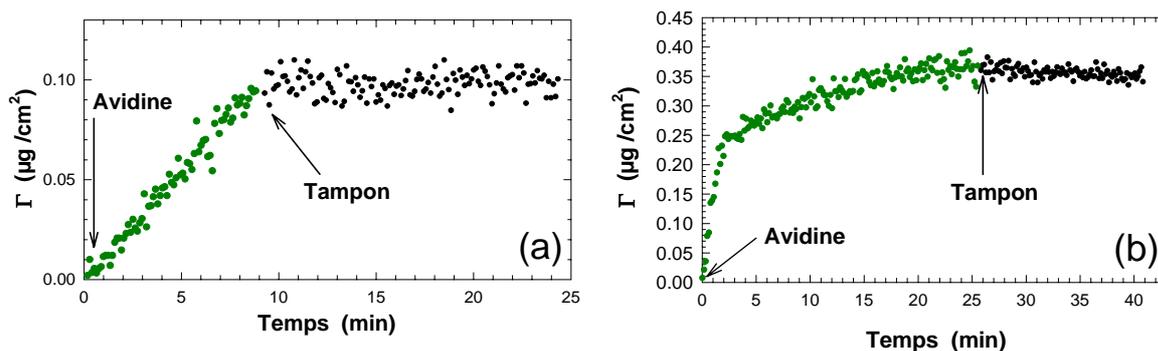


Figure 63 : Cinétique d'adsorption de l'avidine radiomarquée sur le mica. (a) $C_b=1 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $\gamma=1060 \text{ s}^{-1}$ (b) $C_b=15 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $\gamma=503 \text{ s}^{-1}$

En fin d'adsorption, nous avons fait circuler une solution tampon PBS_B . Dans les deux expériences, la concentration interfaciale d'avidine reste constante. Ainsi, en présence de PBS_B , les molécules d'avidine adsorbées ne se désorbent pas. Compte tenu du fait qu'à pH 7,4, l'avidine est globalement positive et que la surface de mica est négative, ceci suggère que les interactions électrostatiques attractives pourraient être responsables de l'absence de désorption.

A partir de la concentration interfaciale de $0,35 \mu\text{g cm}^{-2}$ obtenue à la fin de l'expérience B, on peut calculer un taux de recouvrement θ . La surface occupée par une molécule d'avidine peut être estimée par les données cristallographiques (rayon = 2.5 nm), celles-ci ne tiennent pas compte des molécules d'eau présentes à la surface de la protéine qui stabilisent sa structure, ou par l'estimation de son volume hydrodynamique (rayon = 3.15 nm) obtenue par les mesures d'anisotropie de fluorescence (chapitre III, p 99). Ces deux calculs limites donnent respectivement : $\theta = 0,63$ et $\theta = 0,99$. Ces valeurs sont compatibles avec la formation d'une monocouche d'avidine sur la surface.

Les constantes d'adsorption initiale k pour chaque gradient de vitesse à l'interface ainsi que les constantes de Lévêque sont indiquées dans le Tableau 16. Le coefficient de diffusion de l'avidine ($D=6.10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) a été estimé à partir de sa masse molaire M et du coefficient de diffusion du lysozyme ($D= 10,9.10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; $M= 12500 \text{ g.mol}^{-1}$) [192] en appliquant la relation suivante : $D \propto M^{-\frac{1}{3}}$.

	$C_b (\mu\text{g ml}^{-1})$	$\gamma (\text{s}^{-1})$	$k (\text{cm s}^{-1})$	$k_{L\text{ev}}(\text{cm s}^{-1})$
Exp (a)	15	503	$1,63.10^{-4}$	$1,94.10^{-4}$
Exp (b)	1	1060	$1,68.10^{-4}$	$2,44.10^{-4}$

Tableau 16 : Paramètres et constantes de vitesse initiale mesurés pour les études d'adsorption de l'avidine sur le mica [concentration de la solution d'avidine (C_b), gradient de vitesse (γ), constante d'adsorption mesurée (k) et constante de Lévêque ($k_{L\text{ev}}$)].

Les constantes d'adsorption sont proches de celles données par le modèle de Lévêque, nous devrions donc observer une déplétion dans ces conditions.

2.2. Mesures en mode confocal de la durée de vie et du temps de corrélation

Un de nos objectifs était de réaliser un dispositif confocal capable d'effectuer des mesures de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence résolues dans le temps. Les conditions de mesures en mode confocal ne sont pas *a priori* adaptées pour des mesures d'anisotropie de fluorescence. Effectivement l'ouverture numérique de collection $NA= 1,2$ qui correspond à un angle de collection de $\sim 129^\circ$, ainsi que le nombre d'éléments d'optique indispensables sur le trajet de collection, sont autant d'éléments susceptibles d'introduire des pertes dans l'information de polarisation. Par conséquent, il était important de comparer les mesures obtenues en mode confocal avec celles obtenues par la technique classique. Pour ce faire, nous avons effectué des mesures dans une cellule (sans écoulement) à une distance de $200 \mu\text{m}$ de l'interface afin de nous affranchir de toute perturbation due à l'adsorption de la protéine sur la surface de la cuve.

Pour l'analyse des durées de vie de fluorescence, nous avons utilisé trois entités fluorescentes : de la rhodamine, de l'alexa et A-B4al (Tableau 17). Les expériences ont été réalisées avec des taux de comptage et des durées d'acquisitions identiques. La comparaison des durées de vie de fluorescence pour les deux conditions de mesures ne montre pas de différences significatives. En revanche, on observe une augmentation substantielle du critère

statistique χ^2 . L'analyse des déclins de fluorescence nécessite l'enregistrement de la fonction instrumentale du laser. En mode classique, on utilise une solution diffusante et on observe à la longueur d'onde d'excitation. En revanche, en mode confocal, l'utilisation de la diffusion de l'échantillon est soit trop forte (surface), soit trop faible (solution) pour permettre la prise d'une fonction instrumentale. De ce fait, nous avons utilisé un miroir placé sur le trajet d'excitation et enregistré sa réflexion à la longueur d'onde d'excitation. Dans ces conditions, l'énergie est tellement élevée qu'il est indispensable d'atténuer le faisceau. Les perturbations optiques introduites par les filtres d'atténuation (réflexions multiples) sont suffisantes pour déformer significativement la fonction instrumentale. Cette déformation, si elle n'entache pas les mesures de durée de vie fluorescence, se traduit par une augmentation du χ^2 .

	τ_F (ns)	χ^2	θ_r (ns)	r_0	χ^2_{Ver}	χ^2_{Hor}
Rhodamine B	<i>4,07</i> 4,01	<i>1,02</i> 1,26				
Alexa fluor 594	<i>3,7</i> 3,7	<i>1,06</i> 1,13	<i>0,33</i> 0,3	<i>0,34</i> 0,34	<i>1,38</i> 1,18	<i>1,22</i> 1,38
A-B4al	<i>4,13</i> 3,91	<i>1,05</i> 1,31	<i>32,5</i> 29	<i>0,31</i> 0,22	<i>1,24</i> 1,34	<i>1,13</i> 1,24

Tableau 17 : Comparaison des résultats obtenus en mode confocal [durée de vie de fluorescence τ_F , temps de corrélation (θ_r) facteur de dépolarisation (r_0)] et en mode classique (*italique*) pour diverses molécules fluorescentes

Les résultats obtenus pour les temps de corrélation sont aussi en adéquation avec ceux obtenus par la méthode classique. La différence entre les temps de corrélation du complexe A-B4al obtenus par chacune des méthodes ne peut être considérée comme significative. Le facteur g , qui traduit le déséquilibre de transmission entre les polarisations verticale et horizontale de l'optique de collection (chapitre II, p 72) a été mesuré à 1. Ceci traduit le fait que la chaîne optique de collection du montage n'introduit pas de dépolarisation du signal de fluorescence.

Un des effets attendus de l'adsorption de protéines sur une interface est un changement de leur mobilité. Afin de nous convaincre que le système est sensible à des variations de temps de corrélations, nous avons entrepris des expériences dans des solutions de viscosités différentes. Ces viscosités ont été obtenues par mélange en différentes proportions de tampon phosphate (PBS_B) et d'éthylène glycol. Deux études ont été effectuées, l'une avec l'alex, l'autre avec le complexe A-B4al. Les résultats de ces études sont reportés dans le Tableau 18.

La comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes est illustrée sur la Figure 64 pour le temps de corrélation, et sur la Figure 65 pour la durée de vie de fluorescence de A-B4al.

	η (mPa.s)	τ_F (ns)	χ^2	θ_r (ns)	r_0	χ^2_{Ver}	χ^2_{Hor}
A-B4al	1,12	4,2	2,0	26	0,23	2,5	1,6
	1,79	4,13	1,4	48	0,30	1,8	1,5
	2,67	3,99	1,9	51	0,315	2,3	2,7
	4,01	4,15	1,3	72,2	0,30	1,48	1,22
	4,89	3,9	1,3	83	0,36	1,5	1,30
	7,17	3,84	1,8	97,5	0,36	1,6	2,00
Alexa	1,12	3,6	1,26	0,28	0,33	1,4	1,5
	1,79	3,65	1,3	0,53	0,33	1,6	1,5
	2,67	3,74	1,5	0,88	0,31	1,6	1,5
	4,01	3,7	1,6	1,18	0,31	1,6	1,7
	4,89	3,66	1,6	1,7	0,31	2,00	1,8
	7,17	3,65	1,5	2,39	0,31	1,8	1,9

Tableau 18 : Durée de vie τ_F (ns), temps de corrélation θ_r (ns) et facteur de dépolarisation (r_0) de l'alexa et de A-B4al en fonction de la viscosité (η) obtenus par le dispositif confocal. Pour chaque déclin analysé sont aussi notifiés les facteurs statistiques χ^2

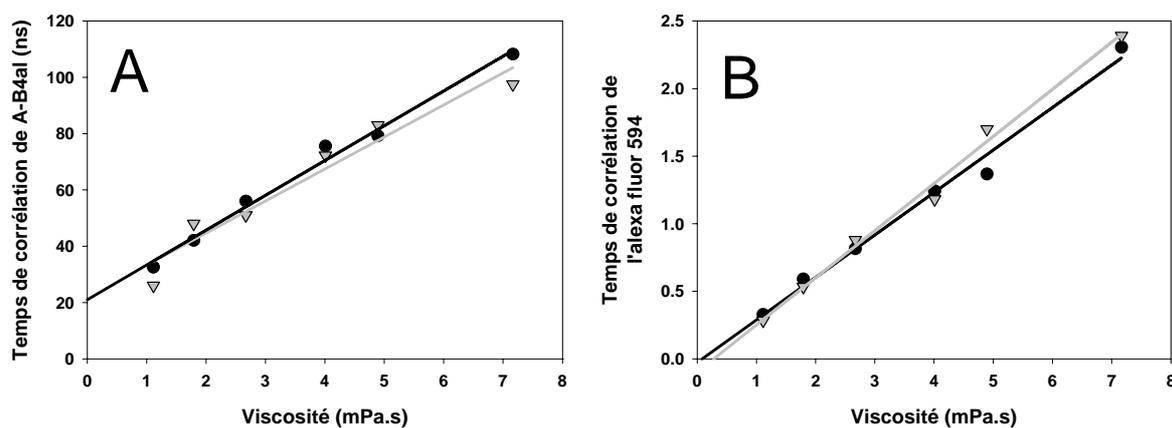


Figure 64 : Evolution des temps de corrélation de A-B4al (A) et de l'alexa (B) en fonction de la viscosité obtenus avec le dispositif « classique » (●) et le dispositif confocal (▼)

Les résultats d'anisotropie de fluorescence (θ_r) obtenus pour les deux expériences réalisées, sont identiques avec ceux obtenus en mode classique. L'évolution des durées de vie

du complexe A-B4al en fonction de la fraction d'éthylène est semblable à celle obtenue en mode classique (chapitre III, p 103).

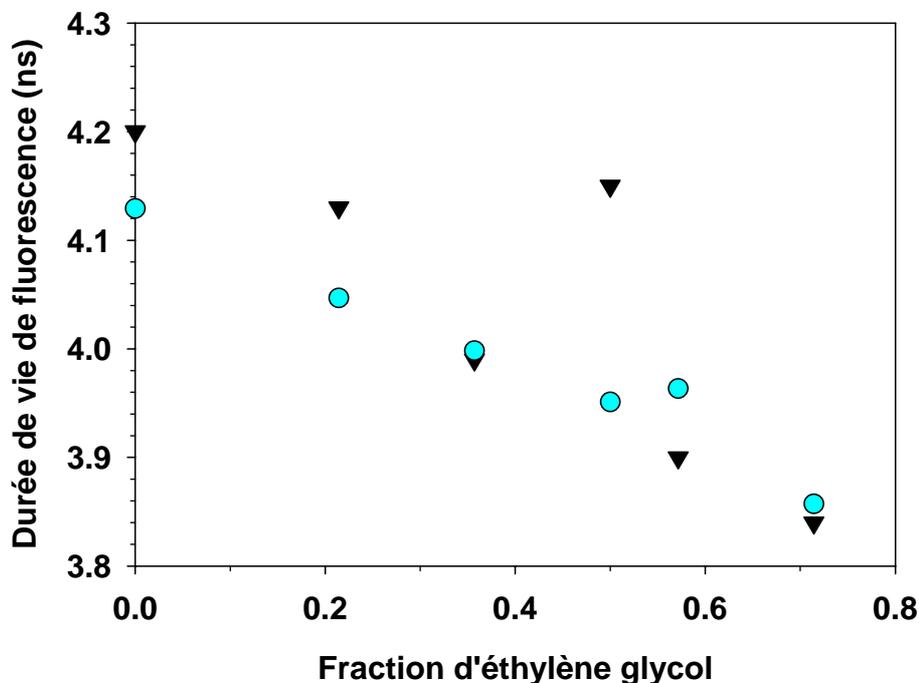


Figure 65 : Décroissance de la durée de vie de A-B4al en fonction de la fraction d'éthylène glycol mesurée avec le dispositif « classique » (●) et le dispositif confocal (▼)

L'ensemble des résultats montre que le dispositif confocal est performant en ce qui concerne les mesures de durée de vie et d'anisotropie de fluorescence. Bien que l'angle de collection soit élevé et la chaîne de collection plus complexe, les mesures d'anisotropie restent fiables ; ce dispositif pourra être utilisé pour étudier des variations de mobilité aux interfaces.

3. Adsorption de l'avidine sur le mica

Un des apports spécifiques du dispositif confocal est qu'il permet d'observer un volume localisé dans l'échantillon. Le second objectif visé lors de la réalisation du montage confocal était d'obtenir :

- la cinétique de la concentration interfaciale,
- l'évolution des profils de concentration dans la solution au cours du temps,

lors du processus d'adsorption. La mesure effectuée consiste à collecter des intensités de fluorescence à différentes distances de l'interface pour différents temps de la cinétique d'adsorption.

Nous présentons ici 4 expériences qui consistent à faire circuler une solution d'avidine 75 nM (soit 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en tampon phosphate PBS_B (pH 7,4) sur une surface de mica fraîchement clivée. Les mesures préliminaires de radiodétection montrent qu'à pH= 7,4 pour ($C_b= 15 \text{ nM}$; $\gamma= 1060 \text{ s}^{-1}$) et ($C_b= 225 \text{ nM}$; $\gamma= 500 \text{ s}^{-1}$), l'avidine s'adsorbe sur le mica avec une constante d'adsorption proche de la constante de Lévêque. Ces conditions expérimentales devraient nous permettre d'observer le profil de la déplétion. Cependant, à cause de l'épaisseur plus faible de la fente de la cellule confocale, nous avons utilisé des gradients de vitesse plus élevés, afin que la déplétion ne s'étende pas, *a priori*, jusqu'au centre de la cellule (gradient limite : 1650 s^{-1} déterminé chapitre IV, p 131). En outre, les phénomènes d'adsorption qui se produisent sur l'autre interface de la cuve ne perturbent pas la mesure. Les conditions de ces expériences sont reportées dans le Tableau 19.

	[A-B4al] : [Avidine]	Taux de marquage de A-B4al	$\gamma \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$C_b \text{ (nM)}$	δ_{Lev} (μm)
Exp. A	1 : 0	0,4	3350	75	13.2
Exp. B	1 : 0	0,4	1675	75	16.4
Exp. C	1 : 1	0,4	3350	75	13.2
Exp. D	1 : 1	0,4	1675	75	16.4

Tableau 19 : Conditions expérimentales des études d'adsorption de l'avidine sur le mica, en mode confocal

Les données expérimentales donnent à la fois la fluorescence de l'interface et de la solution en fonction du temps. Leur analyse s'effectuera en deux temps, tout d'abord la cinétique de la concentration interfaciale, ensuite l'évolution des profils de concentration au cours du temps.

3.1. Evolution de la fluorescence de surface en fonction du temps

La Figure 66 montre l'évolution du profil de fluorescence en fonction du temps, pour l'expérience B. Le rapport entre les intensités de fluorescence de l'interface et de la solution

ne permet pas de visualiser le profil de concentration en solution. Ce dernier sera présenté et discuté dans le paragraphe suivant.

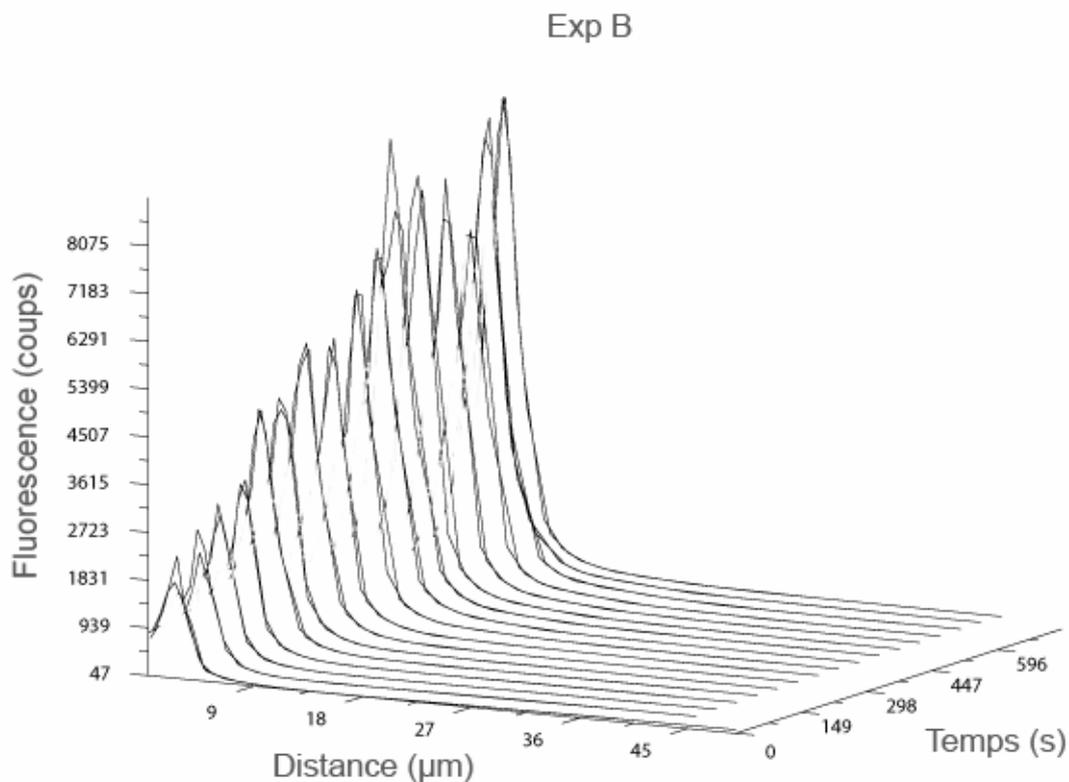


Figure 66 : Evolution du pic de fluorescence à la surface en fonction du temps pour l'expérience B

L'évolution de la fluorescence en surface F_s , mesurée au maximum du pic et normalisée par rapport à la fluorescence de la solution F_b , est représentée en fonction du temps pour les deux expériences A et B ($\gamma = 3350 \text{ s}^{-1}$ et $\gamma = 1675 \text{ s}^{-1}$) sur la Figure 67.

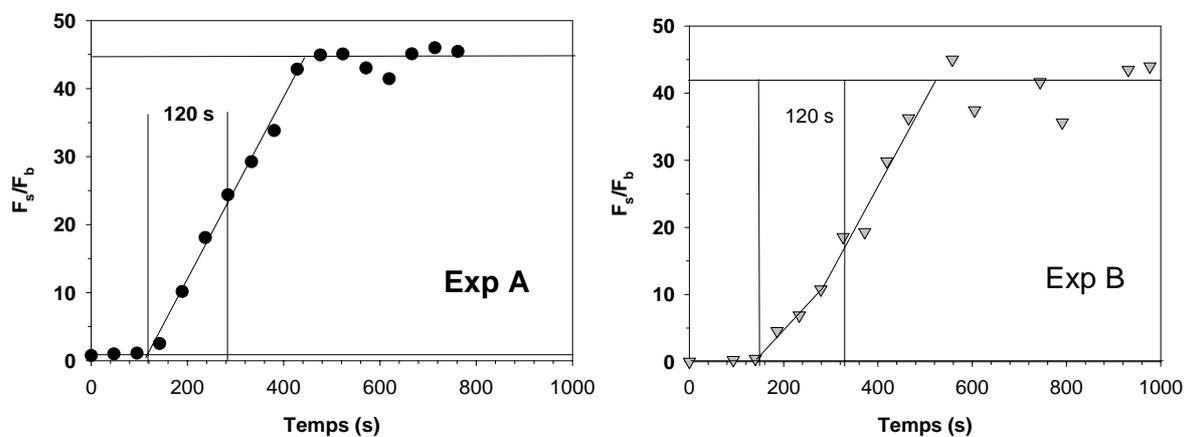


Figure 67 : Evolution de la fluorescence sur la surface de mica normalisée à celle de la solution lors du processus d'adsorption : (●) Exp A $\gamma = 3350 \text{ s}^{-1}$; (▼) Exp B $\gamma = 1675 \text{ s}^{-1}$

Pour ces deux expériences, on observe un plateau dont la valeur F_s/F_b est d'environ 45. Ceci signifie qu'en fin d'expérience, le nombre de molécules adsorbées à la surface est identique. La comparaison, à partir des deux tracés représentés Figure 67, montre que la variation du rapport F_s/F_b s'effectue pour des temps similaires ; à 1675 s^{-1} la cinétique présente deux régimes, alors qu'à 3350 s^{-1} elle ne présente qu'un seul régime. Ce point sera discuté ci-dessous lors de l'analyse des profils de concentration $C(z,t)$.

Ces résultats peuvent suggérer l'existence d'un profil stationnaire de concentration en solution. L'étude plus complète de ces profils sera abordée au paragraphe suivant.

Bien que le marquage de l'avidine par l'alexa se fasse *via* le site actif de la biotine, il est nécessaire de vérifier que les propriétés de la cinétique d'adsorption restent inchangées. Afin de vérifier cela, nous avons préparé deux solutions de même concentration en avidine ($75 \text{ nM} = 5 \mu\text{g ml}^{-1}$), l'une marquée par de l'alexa (Exp A, Tableau 19), l'autre non. Une troisième solution (Exp C, Tableau 19) est préparée à partir du mélange de celles-ci, à volume égal. La concentration en avidine obtenue pour cette solution est identique mais deux fois moins fluorescente que la première solution marquée.

Nous avons comparé les cinétiques d'adsorption pour un gradient de vitesse de 3350 s^{-1} pour les deux solutions fluorescentes (Exp A et Exp C) ; ces résultats sont reportés dans la Figure 68.

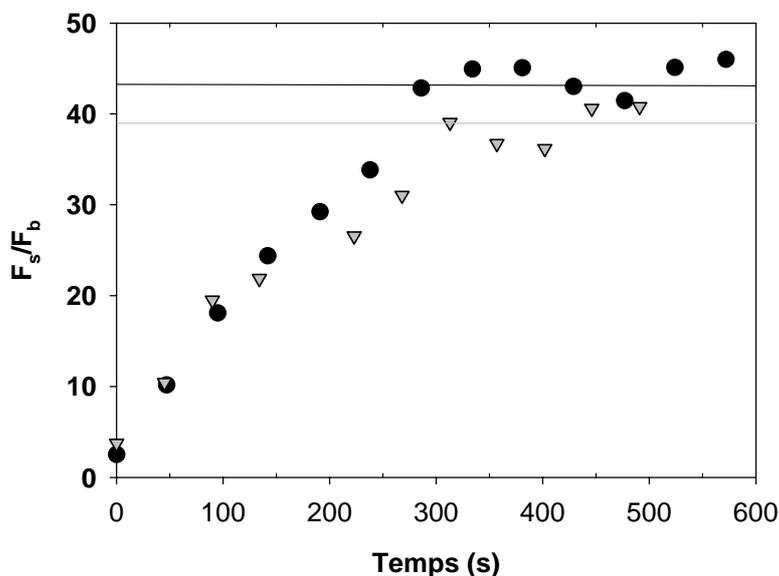


Figure 68 : Fluorescence en surface, normalisée à celle de la solution, en fonction du temps. Adsorption d'avidine sur du mica à 3350 s^{-1} : Exp A avidine marquée seule (●) et Exp C mélange avidine, avidine marquée à 50/50 (▼)

La valeur des plateaux F_s/F_b atteints en fin d'adsorption semble légèrement différente. Dans le cas de l'expérience C le taux de comptage est deux fois plus faible dans la solution que pour l'expérience A. Le rapport F_s/F_b est moins précis car les données sont plus bruitées à faible taux de comptage, ce qui pourrait expliquer cette déviation.

Les cinétiques obtenues pour les deux expériences sont similaires. Le marquage ne semble donc pas avoir d'influence notable sur la cinétique d'adsorption.

A partir de l'intensité de fluorescence F_b mesurée en solution et F_s mesurée sur la surface ainsi que de l'estimation du volume confocal V_{exc} et de la surface confocale A_{exc} , il est possible de déterminer une valeur de la concentration interfaciale Γ . Le volume et la surface d'excitation sont estimés à partir de la distribution d'énergie de la fonction instrumentale (chapitre I p 23) du profil enregistré en fin d'expérience, après rinçage de la cuve. A partir des relations $F_s \sim A_{exc} \Gamma$ et $F_b \sim V_{exc} C_b$, il est possible de calculer Γ selon l'équation :

$$\Gamma = \frac{F_s}{F_b} \frac{V_{exc}}{A_{exc}} C_b$$

Équation 69

Avec $F_s / F_b \approx 45$, $V_{exc} = 1,73 \mu\text{m}^3$, $A_{exc} = 0,414 \mu\text{m}^2$, $\Gamma = 0,084 \mu\text{g cm}^{-2}$. Cette valeur est inférieure à celle obtenue au cours des mesures effectuées en radiodétection. A partir des études de durées de vie de fluorescence (présentées dans le Tableau 20, p155) effectuées dans la solution et à la surface du mica, nous avons mis en évidence une diminution du rendement quantique de fluorescence pour les molécules adsorbées. Cette baisse, qui correspond au rapport des durées de vie entre la surface et la solution, est de 3/4. Dans ces conditions le calcul de la concentration interfaciale Γ donne. La concentration interfaciale est fortement sous-estimée. Ceci pourrait être dû à une orientation préférentielle du chromophore sur la surface plane, phénomène qui reste à approfondir.

3.2. Profil de concentration en solution en fonction du temps lors du processus d'adsorption

Si la détermination de la concentration interfaciale à partir de l'intensité de fluorescence de la surface n'est pas simple, en revanche, la calibration de la concentration $C_{(z)}$ aux différents points de la solution est directement donnée par la fluorescence de la solution injectée $F_{(b)}$; on a la relation suivante :

$$\frac{F_{(z)}}{F_b} = \frac{C_{(z)}}{C_b}$$

Équation 70

Comme nous l'avons déjà évoqué, la fluorescence provenant de l'interface ne nous permet pas d'observer correctement le profil de concentration en solution près de l'interface. Après le traitement mathématique décrit dans le chapitre IV (p 135), il est possible de retirer la contribution de fluorescence des protéines adsorbées (Figure 69). Cela rend possible la visualisation de l'évolution du profil de concentration au cours du temps. Malheureusement les approximations du modèle mathématique ne nous permettent d'obtenir des résultats fiables qu'à partir d'une distance de 5 μm de la surface.

Nous présentons dans ce paragraphe une analyse semi-quantitative des premiers résultats. Les « profils » $F(z)$ correspondent à des mesures de fluorescence effectuées lors du balayage. Le temps nécessaire pour chaque balayage est de l'ordre de 45-50 s, ces « profils » ne sont donc pas des profils instantanés $F(z,t)$ à un temps t donné. Néanmoins, dans l'analyse qui suit ce point n'apparaît pas comme essentiel.

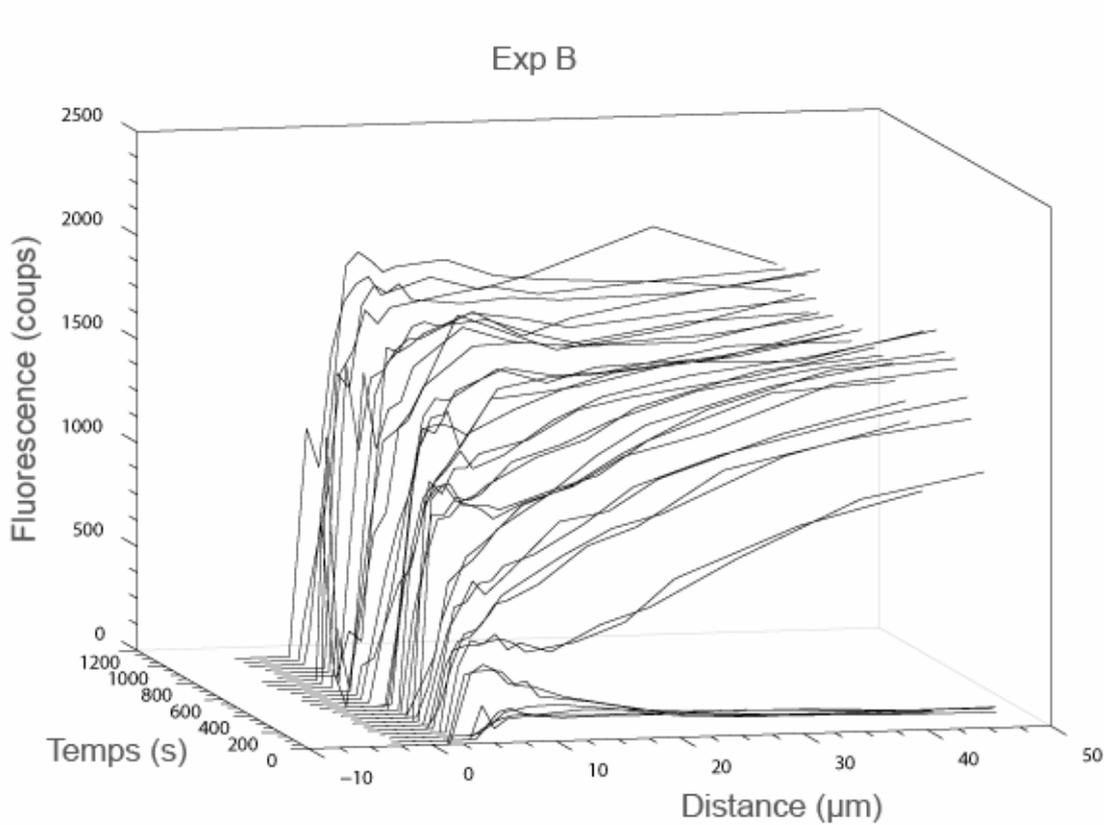


Figure 69 : Profils de concentration de l'avidine en fonction du temps pour l'expérience B corrigés de la contribution de la fluorescence en surface.

Les premiers résultats bruts permettent une analyse intéressante, même si le traitement des données ne nous permet pas pour l'heure d'obtenir des résultats quantitatifs. Ainsi, pour l'expérience B (Figure 70), l'obtention des profils de concentration en solution permet de montrer que la condition de non-déplétion au centre de la cellule n'est pas respectée. La déplétion s'étend jusqu'au centre de la cellule pendant près de cinq minutes. Cette observation est aussi faite pour l'expérience D (Figure 70) effectuée au même gradient de vitesse.

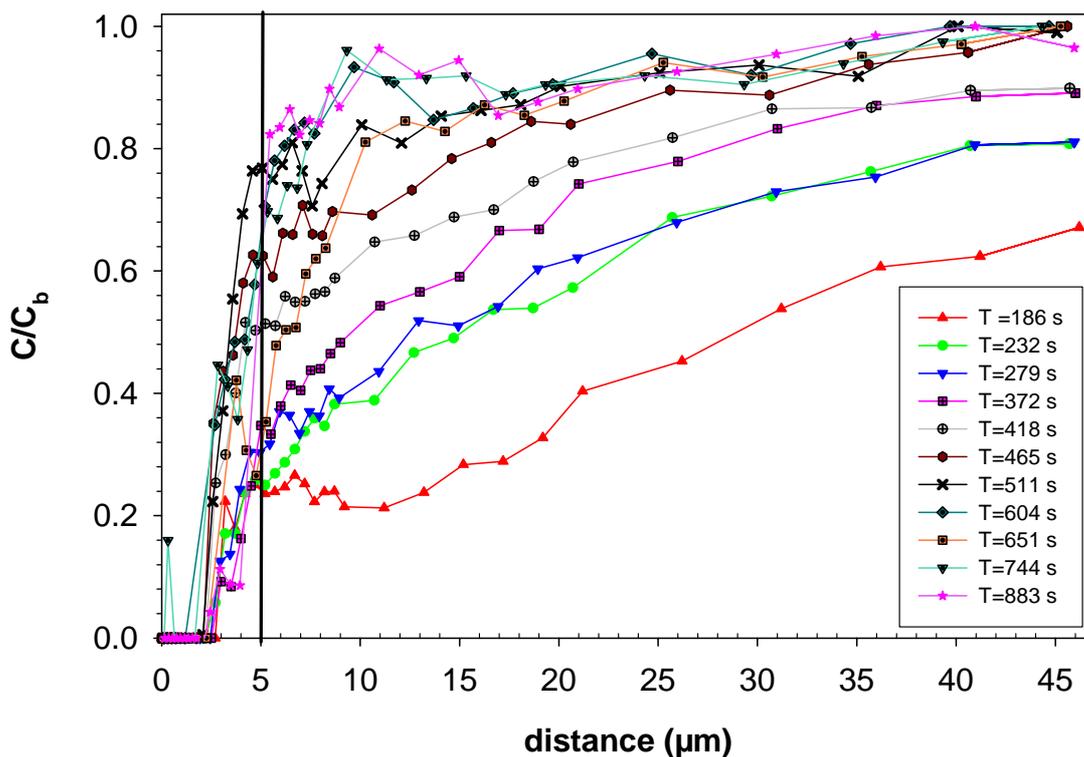


Figure 70 : Evolution du profil de concentration de la solution d'avidine lors du processus d'adsorption pour un gradient de vitesse $\gamma = 1675 \text{ s}^{-1}$.

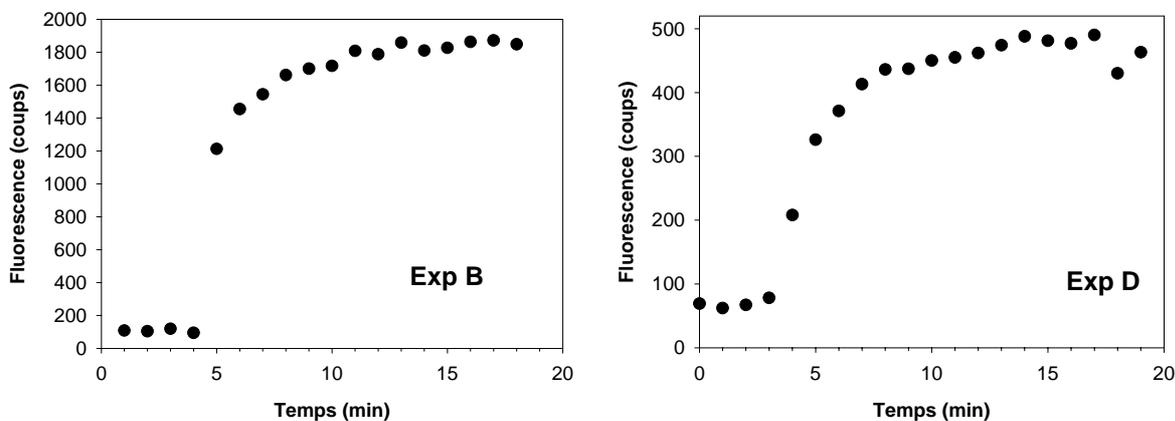


Figure 71 : Evolution de la fluorescence au milieu de la cuve en fonction du temps pour les expériences B et D ($\gamma = 1675 \text{ s}^{-1}$)

Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer cette observation : ou bien la solution a été fortement diluée avant son entrée dans la fente, ou bien le gradient de vitesse était beaucoup plus faible que celui programmé. Si la seconde hypothèse est peu probable, compte tenu de la qualité des pousse-seringues utilisés, en revanche la concentration des solutions utilisées est plus incertaine. Effectivement compte tenu du temps nécessaire au

réglage du dispositif confocal, pour des concentrations de l'ordre de 75 nM, il n'est pas exclu que l'adsorption des protéines sur la paroi du récipient ainsi que sur les tubulures de circulation ne soit négligeable et affecte le début de l'adsorption. La cinétique lente observée initialement (Figure 67 Exp B) est corrélée à un gradient de concentration faible $\left(\frac{\partial C}{\partial z}\right)_{z=0}$, qu'il est néanmoins difficile de quantifier dans l'état actuel du traitement des données.

Avec un gradient de vitesse de 3350 s^{-1} (Exp C), la déplétion au centre de la cellule n'est pas observée (Figure 72). Notons que le rapport maximal des deux vitesses initiales, pour un rapport 2 des gradients de vitesse, est donné par le modèle de Lévêque selon la relation $2^{1/3} = 1.25$. Néanmoins, l'estimation, même grossière, de la tangente au profil de concentration près de l'interface donne une épaisseur de Lévêque qui est encore bien supérieure à la valeur théorique de $13.2 \mu\text{m}$ (Tableau 19). Sans être strictement dans cette limite, c'est-à-dire avec une concentration en solution près de l'interface non nulle, le modèle théorique prévoit une épaisseur très voisine de celle de Lévêque. Ceci signifie que le profil stationnaire initial n'est pas observé.

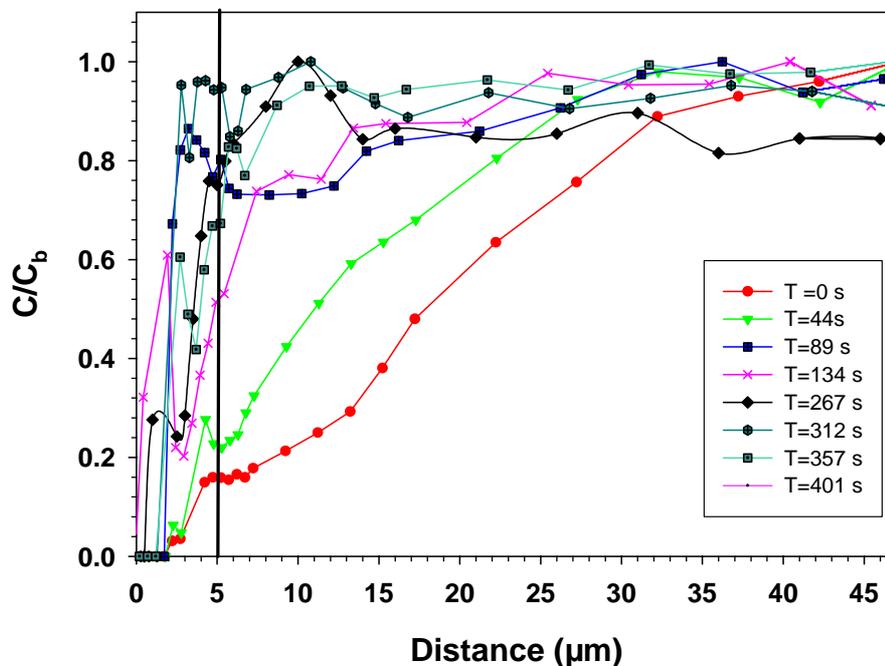


Figure 72 : Evolution du profil de concentration de la solution d'avidine lors du processus d'adsorption pour un gradient de vitesse $\gamma = 3350 \text{ s}^{-1}$.

Deux raisons sont envisageables pour expliquer cette observation :

- **Il n'a pas été possible de conserver la géométrie de la cellule** utilisée en radiodétection pour les mesures de fluorescence. Sans entrer dans les détails, disons que les conditions hydrodynamiques ne sont *a priori* pas aussi idéales dans la cellule optique.
- **Le temps de balayage du profil (~1 min)** est de l'ordre de grandeur de la durée attendue pour le régime initial d'adsorption (3~4 min).

Des améliorations dans la conception de la cuve de circulation utilisée en mode confocal et des éléments de déplacement et d'acquisition devraient permettre d'observer ces profils stationnaires.

Notons que le fait de pouvoir mesurer la pente $\frac{\partial C}{\partial z}$ près de l'interface (inférieur à 5 μm) permettrait d'estimer la concentration locale $C(x, 0, t)$. Ceci conduirait alors directement à la mesure du facteur de surface exclue ϕ , dans la mesure où l'on suppose k_a connu et constant, par la relation :

$$\boxed{\frac{\partial \Gamma}{\partial t} = k_a C(x, 0, t) \phi = D \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right)_0}$$

Équation 71

Remarquons cependant que, bien que le profil stationnaire n'ait pas été observé, la cinétique d'adsorption est linéaire, à l'incertitude expérimentale près. Un profil stationnaire implique une cinétique linéaire, mais l'inverse n'est pas vrai. En effet, lors du processus d'adsorption, la surface est couverte progressivement en amont du point examiné : ceci revient à rapprocher l'« entrée » de la fente du point examiné et contribue à augmenter la vitesse d'adsorption en ce point (diminution de l'épaisseur de Lévêque). La diminution de la vitesse due à l'occupation de la surface au point considéré est réduite par le même phénomène en amont ce qui revient à réduire la distance à l'entrée. La balance entre les deux phénomènes conduit à une vitesse qui varie peu sur des temps assez longs. Ceci plaide bien sûr pour l'utilisation de solutions très peu concentrées afin de pouvoir observer le profil stationnaire.

3.3. Fluorescence dynamique

Nous avons procédé à des mesures durées de vie de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence dans la solution et à la surface du mica à la fin du processus d'adsorption. Les résultats de ces mesures sont présentés dans le Tableau 20.

	τ_F (ns)	χ^2	θ_r (ns)	r_0	χ^2_{Ver}	χ^2_{Hor}
Solution	4,0	0,94	32	0,365	0,8	0,8
Surface	3,17	1	301	0,313	0,8	0,7

Tableau 20 : Durées de vie τ_F (ns), temps de corrélation θ_r (ns) et facteur de dépolariation (r_0) de A-B4al en solution et à la surface à la fin de processus d'adsorption.

L'analyse de ces mesures montre que le temps de corrélation de l'avidine adsorbée est beaucoup plus long que celui de l'avidine en solution. La valeur de 301 ns n'est cependant pas à prendre comme telle. En effet, nous avons vu (chapitre III p 103) que, compte tenu de la durée de vie de fluorescence de l'alexa, l'ajustement de la fonction de dépolariation ne donne pas de valeur précise du temps de corrélation au-delà d'une centaine de nanosecondes. Néanmoins, cette valeur peut être interprétée comme un ordre de grandeur de la borne inférieure du temps de corrélation ; ceci indique une très faible mobilité rotationnelle des protéines adsorbées. Les valeurs des χ^2 sont inférieures à 1 car nous avons travaillé à des faibles taux de comptage, ceci afin de ne pas dégrader l'avidine.

Ces résultats montrent, de plus, que la durée de vie du marqueur est diminuée lorsque l'avidine est adsorbée ; elle passe de 4,0 ns en solution à 3,17 ns sur l'interface. Cette diminution de la durée de vie de fluorescence est significative. Elle est révélatrice d'une modification de l'environnement du chromophore due à l'adsorption de la protéine sur le mica.

4. Adsorption du complexe A-B4al sur une membrane polymère

Les expériences présentées précédemment ont porté sur l'étude des mécanismes d'adsorption sur un matériau non poreux. Une des propriétés remarquable du système confocal est qu'il permet également d'étudier l'intérieur d'un échantillon transparent. Cette technique ouvre donc des possibilités quant à l'étude des phénomènes au sein d'une

membrane. Ainsi, elle trouve tout naturellement une application dans le cadre de l'étude des interactions entre les protéines et les membranes.

Pour illustrer cette potentialité, nous avons étudié l'adsorption d'avidine (A-B4al) en régime d'écoulement sur une membrane polymère (AN-69) transparente, couramment utilisée en hémodialyse. L'objectif de ces expériences est double : obtenir des données sur la diffusion de la protéine dans la membrane et obtenir des informations sur les propriétés dynamiques de la protéine à l'intérieur de celle-ci.

Cette membrane est chargée négativement par la présence de groupes sulfonates et devrait donc avoir des interactions électrostatiques attractives avec l'avidine à pH 7,4. La distribution de la taille des pores est très large, dans une gamme de 2-10 nm. Dans ces conditions l'avidine se trouve dans la région du seuil de coupure, ainsi elle devrait pouvoir y pénétrer. Néanmoins ses propriétés d'adsorption devraient réduire fortement ce seuil.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- **Concentration** en complexe A-B4al : 75nM $5\ \mu\text{g.ml}^{-1}$
- **Taux de marquage** : 1,3
- **Tampon** PBS_B
- **Gradient de vitesse à la surface** : $1700\ \text{s}^{-1}$
- **Temps de balayage** : 74 s

La Figure 73 montre l'évolution de la fluorescence au sein de la solution et de la membrane en fonction du temps. Nous observons deux pics de fluorescence ; ceux-ci correspondent à chacune des interfaces. La distance mesurée est de $20\ \mu\text{m}$, ce qui est en accord avec les caractéristiques communiquées par le fabricant. Les pics de diffusion dus aux interfaces obtenues par balayage sur toute la profondeur de la cuve de circulation montrent que la membrane se trouve à une distance de l'ordre de $10\ \mu\text{m}$ du fond de la cellule. Dans ces conditions lors de la circulation une partie de la solution passe sous la membrane ; la valeur du gradient de vitesse donnée ci-dessus est donc très approximative.

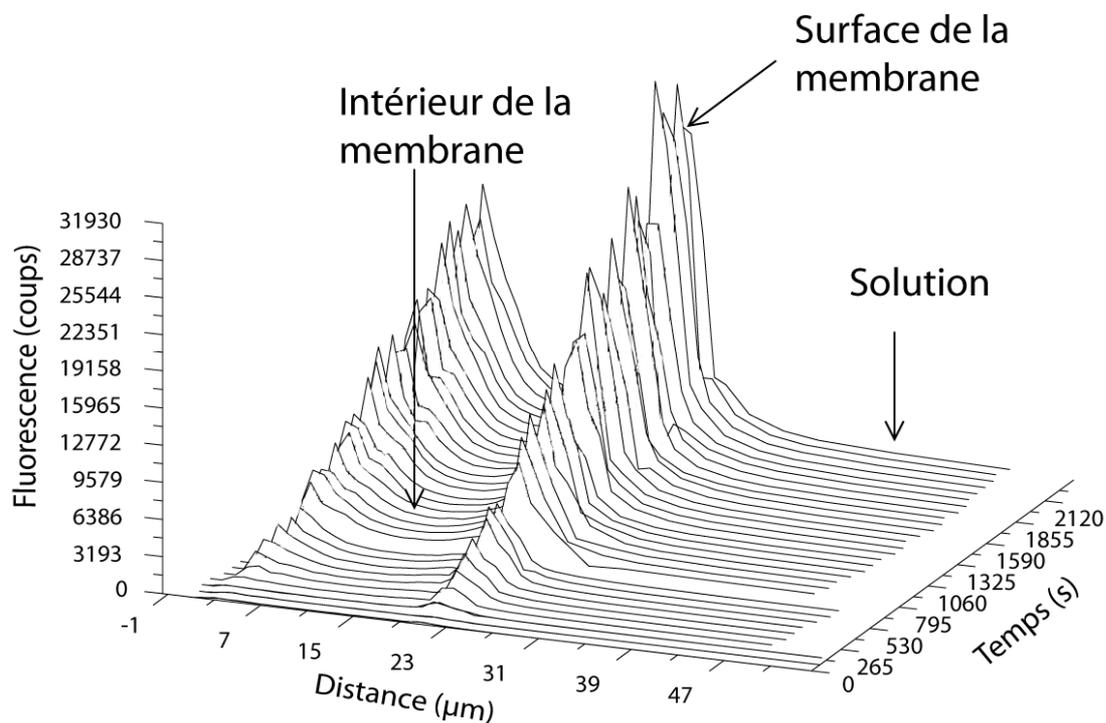


Figure 73 : Fluorescence en fonction de z et du temps lors du processus d'adsorption d'avidine ($C_b = 5 \mu\text{g ml}^{-1}$, $\gamma = 1700 \text{ s}^{-1}$ approx.) sur une membrane AN-69

Nous pouvons remarquer que l'intensité de fluorescence sur l'interface de la membrane est très importante. Au bout de 40 min, l'intensité de fluorescence continue de croître sur la surface (Figure 74). Ceci s'explique dans la mesure où la porosité de la membrane augmente considérablement la surface disponible pour l'adsorption de la protéine.

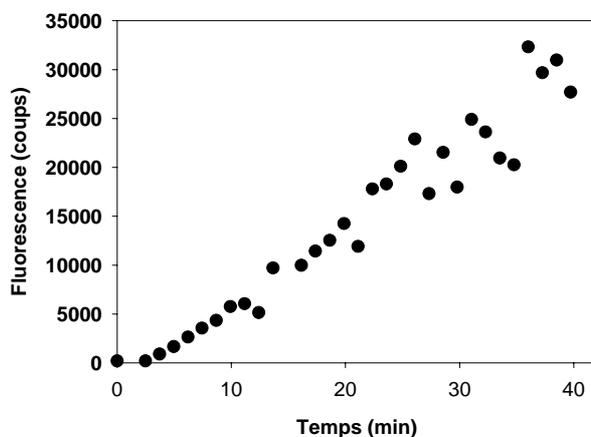


Figure 74 : Evolution de l'intensité de fluorescence sur la surface de la membrane

A l'intérieur de la membrane, nous pouvons observer une augmentation de l'intensité de fluorescence. Les résultats présentés par la Figure 75 montrent deux cinétiques de variation de fluorescence enregistrées à 13 μm de l'interface, l'une à l'intérieur de la membrane, l'autre dans la solution ; à cette distance la contribution de la surface n'est pas significative. Nous pouvons remarquer que dans la membrane, l'intensité de fluorescence après 42 min est dix fois supérieure à celle de la solution.

Ce résultat indique que la protéine diffuse dans la membrane et s'y accumule. Toutefois ce processus est beaucoup plus lent que celui sur la surface. Effectivement si la protéine diffusait librement dans la membrane sans être adsorbée, la concentration devrait être identique sur toute l'épaisseur de celle-ci.

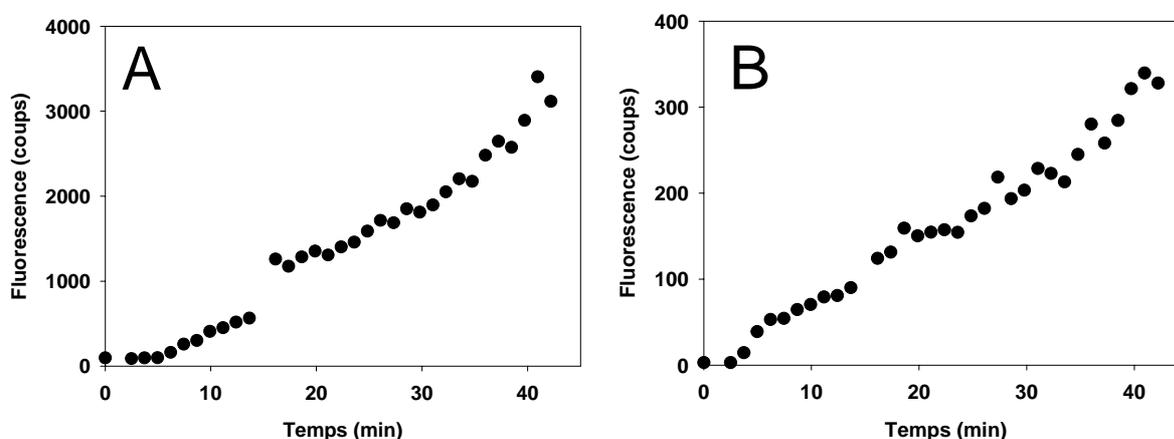


Figure 75 : Fluorescence en fonction du temps à l'intérieur de la membrane (A) et dans la solution (B) 13 μm par rapport à la surface

L'interprétation des cinétiques est extrêmement difficile du fait que l'on n'atteint jamais de plateau pour aucune des trois régions étudiées. Quoiqu'il en soit, l'accumulation de la protéine sur l'interface suggère deux interprétations limites : soit la protéine s'adsorbe sur l'interface, soit elle diffuse extrêmement lentement dans les pores de la membrane. L'étude de l'anisotropie de fluorescence résolue dans le temps sur l'interface pourrait peut être nous donner une information sur le type de processus mis en jeu.

Ainsi, nous avons effectué des mesures de durée de vie de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence sur la membrane (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** B) et dans la solution (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** A). En solution, le temps de corrélation mesuré pour le complexe A-B4al est de 29 ns et la durée de vie de fluorescence de 4,1 ns. Ces deux valeurs correspondent à celles classiquement observées pour la protéine en

solution. Sur la membrane, la durée de vie de fluorescence mesurée est de 4 ns. Le temps de corrélation n'a pas pu être calculé car la fonction d'anisotropie est horizontale. Ceci suggère une quasi-immobilité de la protéine sur la membrane.

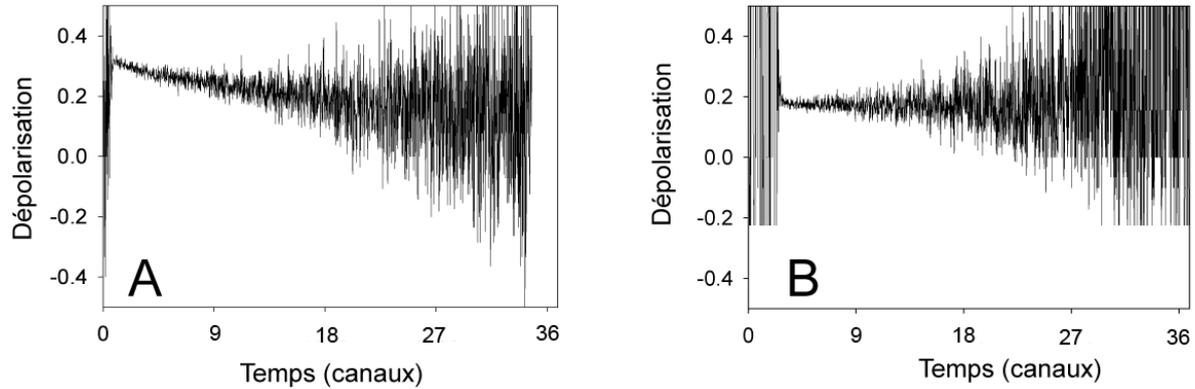


Figure 76 : fonction d'anisotropie de l'avidine en solution (A) et sur la membrane (B)

A partir de ces résultats, il semble que l'hypothèse de l'adsorption des protéines sur l'interface soit la plus crédible, toutefois, la valeur du r_0 de l'ordre de 0,2 suggère un processus plus complexe. La valeur de ce paramètre pour une molécule d'alexa est de 0,34, la décroissance rapide à une valeur de 0,2 qui semble être observée sur la fonction d'anisotropie ne peut être due à un phénomène de rotation, car celui-ci serait plus rapide que celui de l'alexa libre en solution. Soit cette mesure est erronée, soit un processus de type transfert d'énergie pourrait expliquer cette dépolarisation rapide. Cette explication est envisageable dans la mesure où les protéines adsorbées sur la surface sont probablement extrêmement proches les unes des autres. Des mesures sur des temps plus longs que 40 minutes où l'on observerait la fin du processus d'adsorption permettraient, peut être, de mettre en évidence de façon plus significative la diffusion de la protéine dans la membrane.

Le dispositif confocal pourrait s'avérer être un excellent outil pour l'étude des phénomènes de colmatage.

5. Conclusion

Nous avons déterminé des profils de concentration d'avidine en solution au-delà de 3-5 μm de l'interface, en fonction du temps, au cours de son adsorption sur du mica, pour une

concentration en solution de 75 nM ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). La définition du profil à des distances plus proches de la surface requiert encore une amélioration de l'analyse des données pour tenir compte de la contribution parasite (très importante) de l'interface. L'examen des profils montre que la cellule optique d'écoulement n'a pas les qualités suffisantes pour pouvoir comparer les résultats à des modèles théoriques simples. Ce n'était cependant pas là un point essentiel. La priorité avait été donnée dans ce travail à la résolution des contraintes de mesure liées à l'optique confocale. Une géométrie de cellule s'approchant davantage de celle utilisée dans les mesures de radioactivité devrait apporter des améliorations.

La faible mobilité rotationnelle de l'avidine sur la surface a été mise en évidence directement par la mesure en mode confocal de son temps de corrélation.

Si la calibration est aisée en solution et permet de convertir les données de fluorescence en concentration volumique, elle ne paraît pas aussi évidente en surface pour obtenir la concentration interfaciale. Néanmoins les mesures des durées de vie de fluorescence donnent accès aux modifications de rendement quantique et permettent de vérifier si l'interaction avec la surface éteint en partie la fluorescence des molécules adsorbées ; dans ce cas il est possible de corriger l'intensité de fluorescence à la surface.

L'application de la technique avec une membrane polymère chargée négativement montre l'adsorption de l'avidine et sa pénétration dans la membrane. Nous avons visualisé les profils de concentration dans la solution et dans la membrane au cours du temps.

La quasi-immobilité rotationnelle de l'avidine à l'intérieur de la membrane a été mise en évidence par la mesure en mode confocal d'un temps de corrélation impossible à déterminer précisément car beaucoup trop grand par rapport à la durée de vie de fluorescence. L'absence de contribution d'un temps de corrélation court montre qu'à la position de mesure, on peut considérer que la très grande majorité des protéines sont dans l'état adsorbé.

Conclusion Générale

La technique de fluorescence par comptage de photons permet d'effectuer des mesures de fluorescence statique et dynamique. La technique de microscopie confocale permet, quant à elle, de mesurer la fluorescence dans un volume extrêmement petit (de l'ordre du femtolitre) et parfaitement localisé d'un point de vue spatial. Dans ce travail de thèse, nous avons pour objectif de coupler ces deux techniques afin d'étudier la cinétique d'adsorption de protéines sur des surfaces soit de type minérales, soit polymères. Nous avons défini pour la réalisation de ce projet un cahier des charges lié aux contraintes qu'impose la technique confocale, ainsi que les études de fluorescence et d'adsorption. Le travail effectué se décompose en trois parties : en premier lieu la mise en œuvre d'une protéine modèle adaptée aux exigences de cette approche de fluorescence dynamique, puis la réalisation du dispositif optique et enfin des études d'adsorption sur deux surfaces modèles, l'un plane et l'autre poreuse, montrant l'intérêt d'une telle technique.

Le marquage de l'avidine, effectué en utilisant la forte affinité de cette dernière pour la biotine, nous a permis d'obtenir une protéine modèle dont le mouvement est parfaitement reproduit par celui du marqueur. L'étude assez complète des propriétés photophysiques du chromophore fluorescent qui a été effectuée ouvre des perspectives intéressantes quant à l'utilisation de ce type de marquage pour des études dynamiques de l'avidine lors de processus d'adsorption, mais également pour des études d'interaction avec d'autres protéines ou encore des membranes biologiques.

Le dispositif confocal réalisé permet d'effectuer des mesures de fluorescence en mode dynamique comme en mode statique. Tel qu'il a été conçu, et ce avec des moyens matériels limités à d'anciens équipements de spectroscopie et d'optique du laboratoire, il nous permet d'obtenir une résolution spatiale axiale de l'ordre du micromètre. Notons que cette résolution est liée aux caractéristiques propres de l'objectif utilisé, elle ne peut être améliorée. Le système de déplacement qui permet des mouvements de 100 nm est relativement précis ; toutefois, l'acquisition d'un dispositif de type piézoélectrique permettrait d'améliorer considérablement la précision des mouvements de la cuve et de réduire la durée des déplacements. Le système de détection peut quant à lui être optimisé par l'acquisition d'un détecteur de type diode à avalanche. Le rendement quantique de ce genre de détecteur est bien supérieur à celui d'un photomultiplicateur de comptage classique. Ainsi, il serait possible de travailler avec une énergie d'excitation bien plus faible et de pallier de ce fait le problème de la photodégradation observé lors des mesures de fluorescence sur une surface. Cet autre détecteur devrait, de plus, permettre de réduire les temps d'acquisition des profils de

concentration. Enfin, le programme d'analyse des profils de concentration peut être, lui aussi, sensiblement amélioré par l'utilisation de méthodes de calcul à base de convolution.

Le dispositif confocal que nous avons conçu et réalisé permet, d'une part d'effectuer des mesures précises de durées de vie et d'anisotropie de fluorescence, et d'autre part d'observer l'évolution de la concentration interfaciale. Il permet en outre d'accéder à la diffusion d'une protéine dans une membrane transparente et à l'évolution des profils de concentration en solution au voisinage d'une surface de matériau lors du processus d'adsorption. De ce fait, l'objectif principal qui était de montrer la faisabilité de la méthode a été atteint. Par ailleurs, à l'heure actuelle, seule la technique de fluorescence confocale décrite ici a pu permettre de visualiser l'évolution de profils de concentration de protéine dans ce type d'application, ce qui rend ce travail réellement innovant. Nous avons étudié l'adsorption de l'avidine. Néanmoins la technique peut être utilisée avec toutes les protéines sur lesquelles la fixation d'un fluorophore est possible.

Cette nouvelle technique doit maintenant être développée dans le sens d'une généralisation à d'autres protéines et à d'autres matériaux, dans les cas où une connaissance plus fine des processus d'adsorption est requise. C'est dans les domaines des biotechnologies, de la santé et de l'agroalimentaire, où s'expriment en particulier le besoin de développer de nouveaux matériaux et des membranes biocompatibles, que cette approche pourrait révéler tout son intérêt.

Annexes

Annexe 1 : Modèle d'écoulement d'un fluide dans une fente

Considérons deux surfaces planes séparées d'une distance b où circule un fluide. Le profil de vitesse de ce dernier est donné par l'expression :

$$v(z) = \gamma z \left(1 - \frac{z}{b} \right)$$

Équation 72

Où z représente la distance à une des plaques.

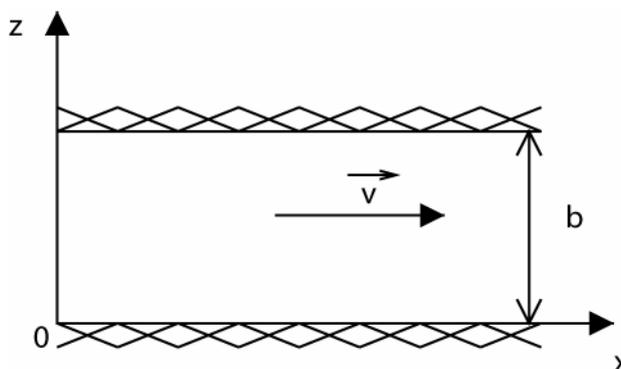


Figure 77 : Représentation schématique du système de coordonnées du champ de vitesse \vec{v} entre deux plaques planes parallèles

L'équation différentielle est alors :

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v(x) \frac{\partial C}{\partial x} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right); C = C(x, z, t)$$

Équation 73

avec les conditions aux limites suivantes :

$$\begin{aligned}
C(x, z, 0) &= 0 && \text{pour } t = 0 \text{ et } x > 0 \\
C(x, z, t) &= C_b && \forall t \text{ et } x \leq 0 \\
\frac{\partial C(x, z, t)}{\partial z} &= 0 && \text{pour } z = \frac{b}{2} \\
D \frac{\partial C(x, z, t)}{\partial z} &= \frac{\partial \Gamma(x, t)}{\partial t} && \text{pour } z = 0
\end{aligned}$$

Équation 74

Nous nous limiterons au cas plan pour la représentation de formules analytiques relatives aux cas limites.

Annexe 2 : Mode opératoire des marquages

Solutions tampons

La solution de tampon phosphate pH 7,4 (PBS_A) a été obtenue en mélangeant une solution de 100 mM de NaH₂PO₄ (sigma), 1,5 M de NaCl et une solution de 100 mM Na₂HPO₄ (sigma), 1,5 M de NaCl. Ensuite est ajouté de l'azoture de sodium afin d'obtenir une concentration de 2 mM dans la solution.

La solution de PBS_B est obtenue par dilution au 1 :10^e de la solution de PBS_A.

Marquage de l'avidine par ¹²⁵I.

Le marquage est effectué dans une boîte à gants agréée, protégeant des rayons émis par l'iode 125. 2,5 ml de solution tampon phosphate (PBS_B) contenant 25 mg d'avidine est préparée. 5 iodobeads sont conditionnés dans 0,5 ml de tampon. Les deux solutions sont introduites dans la boîte à gants. 10 µl de Na¹²⁵I sont incorporés dans la solution contenant les iodobeads. Le mélange est laissé 5 minutes sous agitation. A la fin de la réaction, la solution de protéines est ajoutée et laissée 15 minutes. En fin de réaction sont prélevés 3 fois 20µl de solution pour estimer le rendement de marquage. La solution est ensuite purifiée par dialyse sur une membrane de cellulose (Cell Sep/ Regenerated cellulose membre/ 5015-46) d'épaisseur 28 µm et de seuil de coupure 4000-6000 Da.

Marquage direct de l'avidine par la biotine

La condensation entre l'Alexa Fluor 594 et l'avidine est effectuée suivant le protocole fourni par Molecular Probes.

Synthèse de l'A-B4al

0,160 µmol de biotine éthylènediamine (sigma) sont dissoutes dans une solution de 100 µl de PBS_A et 10 µl de bicarbonate de sodium 1 M. La solution est ajoutée à 0,145 µmol d'alexa fluor 594 succinimidyl ester. Le mélange est laissé 3 heures sous agitation. Une solution d'Avidine dans du tampon phosphate PBS_A est ensuite ajoutée. Le rapport molaire entre B4al et l'avidine est de 2 marqueurs pour 1 protéine. La solution est laissée une heure sous agitation. L'avidine est séparée des autres composants du mélange sur une colonne

Biorad fournie dans le kit de marquage Molecular Probes. La solution tampon utilisée pour la séparation est du PBS_B. Le taux de marquage obtenu est de 1,2 marqueur par avidine.

Synthèse de l'A-B7al

0,160 μmol de biocytine (sigma) sont dissoutes dans une solution de 100 μl de PBS_A et 10 μl de bicarbonate de sodium 1 M. La solution est ajoutée à 0,145 μmol d'alexa fluor 594 succinimidyl ester. Le mélange est laissé 3 heures sous agitation. Une solution d'Avidine dans du tampon phosphate PBS_A est ensuite ajoutée. Le rapport molaire entre B7al et l'avidine est de 2 marqueurs pour 1 protéine. La solution est laissée une heure sous agitation. L'avidine est séparée des autres composants du mélange sur une colonne Biorad fournie dans le kit de marquage Molecular Probes. La solution tampon utilisée pour la séparation est du PBS_B. Le taux de marquage obtenu est de 1,8 marqueur par avidine.

Annexe 3 : Descriptif des appareillages commerciaux utilisés

Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Le système HPLC est composé de deux pompes (Waters 515), d'un échantillonneur (Waters 712), d'une colonne μ bondapack C18 en phase inverse (Waters) et d'un détecteur de fluorescence (Waters 474). La collection des données et l'analyse des chromatogrammes sont effectuées par le logiciel Millennium 32 (Waters). Tous les chromatogrammes ont été effectués dans un solvant eau/méthanol 1:1 sous flux 0.6 ml min^{-1} .

Spectres d'absorbance

Les spectres d'absorbance ont été effectués avec un spectromètre Kontron (Uvikon 940). Les tampons ont été préalablement filtrés sur membrane (Millex $0.1 \mu\text{m}$, Millipore).

Les coefficients d'absorption molaire utilisés dans nos travaux ont été mesurés avec ce spectromètre à partir de solutions de concentration connue et filtrées.

Spectres de Fluorescence

Les spectres de fluorescence ont été effectués avec un spectrophotomètre Spex (Fluorolog 1681). La vitesse de balayage est de 2 nm.s^{-1} . Les mesures de rendement quantique ont été obtenues en utilisant une solution référence de rhodamine B de rendement quantique 0,49 [10].

Annexe 4 : Protocole de préparation des cellules d'écoulement utilisée en mode confocal

Les études d'adsorption nécessitent l'utilisation de surfaces parfaitement propres. Pour effectuer nos expériences, nous avons toujours utilisé le même protocole de préparation des cellules.

Les lamelles de microscope sont immergées durant 30 min dans une solution d'acide sulfochromique, puis rincées abondamment à l'eau milliQ. Ensuite elle sont laissés durant minimum 3 heures dans de l'eau milliQ afin de laisser la surface dégorger. Enfin avant d'être montés dans la cellule, les lamelles sont rincées une nouvelle fois à l'eau milliQ.

Les surfaces de mica propres sont obtenues par clivage de plaque de mica. La surface découverte est directement montée dans la cellule.

Avant toute expérience d'écoulement, nous avons équilibré les surfaces en faisant s'écouler 60 ml de solution tampon.

Annexe 5 : Détermination des caractéristiques des lasers utilisés

Nous avons déterminé les caractéristiques des trois lasers utilisés durant ce travail à l'aide de la relation asymptotique illustrée Figure 78.

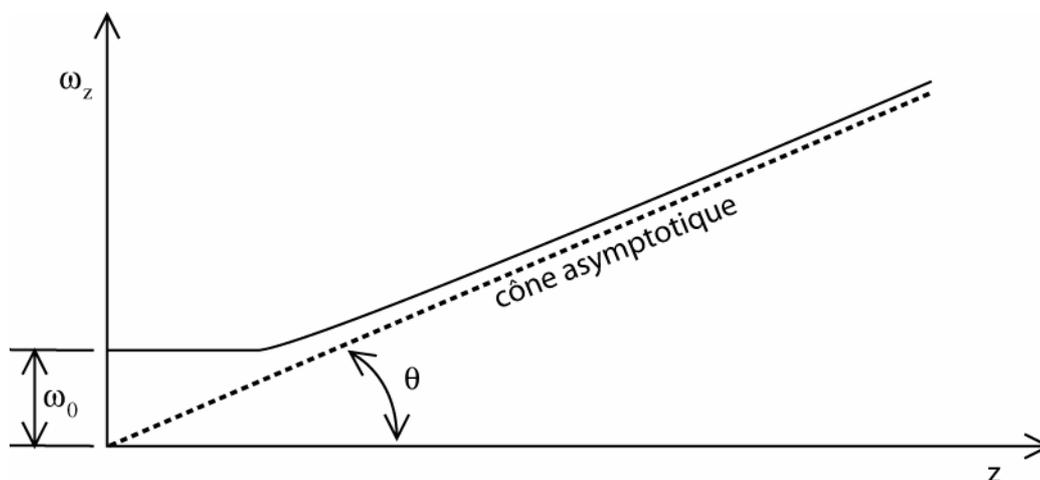


Figure 78 : représentation de la relation asymptotique pour déterminer le *beam waist* d'un laser

$$\omega(z) \equiv \frac{\lambda z}{\pi \omega_0}$$

Équation 75

Avec :

- z la distance par rapport au centre du faisceau gaussien,
- ω_0 le *beam waist* du laser.

Pour déterminer expérimentalement ω_0 , le faisceau laser a été focalisé grâce à un objectif de microscope ou une lentille. A l'aide d'une photodiode déplacée de façon transversale par rapport au faisceau, on enregistre l'évolution de l'énergie à différentes distances du point focal. Les profils ainsi obtenus sont ajustés par une fonction gaussienne afin d'obtenir la valeur de $\omega(z)$. En comparant les courbes entre elles, on peut déterminer ω_0 par l'équation suivante :

$$\omega_0 \equiv \frac{\lambda \Delta z}{\pi \Delta \omega(z)}$$

Équation 76

Connaissant la focale f de la lentille, il est possible de calculer le diamètre du faisceau sur celle-ci, grâce à la relation :

$$\omega_{(\text{sur lentille})} = \frac{\lambda f}{\pi \omega_0}$$

Équation 77

avec f la focale de la lentille.

A partir de cette valeur en utilisant l'Équation 75, il est possible d'obtenir le diamètre du faisceau à la sortie du laser.

Annexe 6 : Mesure de la résolution spatiale du dispositif optique confocal

La résolution axiale est généralement obtenue grâce à la réflexion du faisceau d'excitation par un miroir placé devant l'optique de collection. Elle est donnée par la largeur à mi-hauteur de la distribution obtenue au cours du déplacement de ce miroir [193]. A priori, cette méthode n'est pas totalement satisfaisante car les photons d'excitation sont réfléchis suivant une direction privilégiée et ne proviennent pas de tout l'espace comme dans le cas des photons de fluorescence. La solution, pour se rapprocher le plus de la réalité expérimentale, est d'utiliser un film fluorescent infiniment fin. Dans ce but, nous avons traité une lame de verre afin d'y fixer, par liaison chimique, un colorant fluorescent. La comparaison des résultats, entre les mesures faites par réflexion et celles faites sur le film fluorescent, ne montre pas de différence essentielle. Ainsi, pour des raisons de commodité, nous avons souvent utilisé la réflexion pour mesurer la résolution spatiale de notre dispositif au cours des réglages.

Durant les expériences, la résolution est calculée pour chaque profil. La mesure est effectuée à partir de la réflexion sur la surface à étudier. Deux paramètres introduits par la cuve d'écoulement peuvent avoir une influence sur la résolution spatiale. Le premier est son inclinaison. Lorsque l'on démonte et remonte le dispositif de cuve il est possible de perdre son orientation. Le second est lié à la variation de l'épaisseur de la lamelle de verre et donc à la correction de l'objectif.

Annexe 7 : Fonction instrumentale des déclin de fluorescence

Le signal détecté lors de la prise de donnée des déclin de fluorescence intègre d'une part l'information relative au déclin de fluorescence et, d'autre part, l'information relative à la fonction instrumentale, réponse électronique de notre système. Pour effectuer l'analyse complète des déclin de fluorescence, il est nécessaire d'enregistrer cette fonction instrumentale.

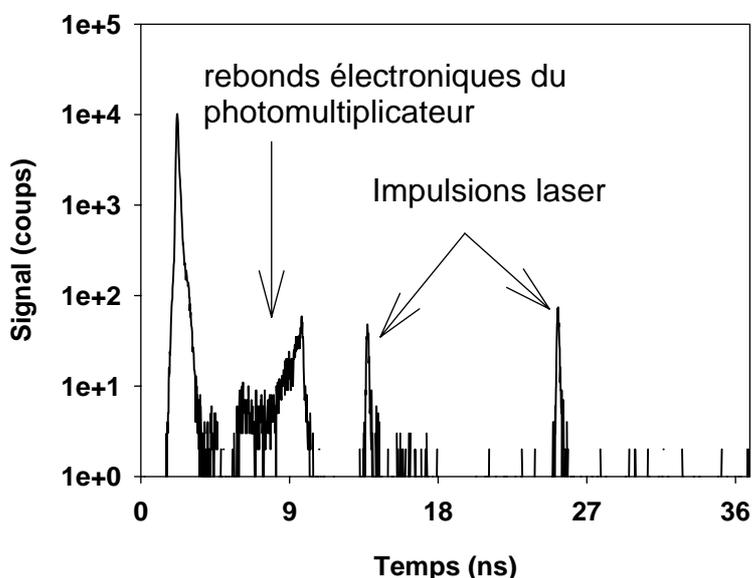


Figure 79 : Fonction instrumentale

La fonction instrumentale obtenue à partir de notre système est représentée Figure 79. Le signal enregistré résulte, d'une part de la structure temporelle de la lumière collectée, et d'autre part de la réponse électronique du photomultiplicateur. Lorsqu'il n'est pas parfaitement ajusté, l'extracteur d'impulsion laser (système acousto-optique) peut laisser passer des impulsions de faibles énergies dont le taux de répétition est celui de la fréquence d'oscillation du laser (82 MHz). Ces impulsions vont provoquer la re-excitation des molécules fluorescentes. Dans la mesure où ces impulsions sont parfaitement définies d'un point de vue temporel, elles n'entachent pas la mesure expérimentale. La réponse électrique du photomultiplicateur, notamment sa rapidité, va modifier l'aspect temporel de l'impulsion laser

mesurée ; de plus, on observe pour la majeure partie des photomultiplicateurs un phénomène de rebonds qui se traduit expérimentalement par des structures fantômes après le pic d'excitation.

Cette déformation du signal est systématique ; elle ne dépend pas de l'énergie du photon collectée, elle est donc présente à la fois sur la fonction instrumentale et sur le déclin de fluorescence. Mathématiquement, l'opération de transformation du signal électrique par la réponse intrinsèque du photomultiplicateur peut être modélisée par un produit de convolution. S'il est possible d'obtenir la fonction de déformation du signal, il est alors possible par calcul de remonter à la structure du signal d'origine. Dans le cas des déclins de fluorescence, la fonction instrumentale est obtenue par la mesure du signal d'une solution diffusante; la déformation due à cette fonction est introduite par convolution du déclin théorique avec la fonction enregistrée.

Index et références

Index des figures

Figure 1 : Synoptique des contraintes et des réalisations effectuées au cours du projet de thèse	8
Figure 2 : Diagramme de Jablonski.....	13
Figure 3 : Relation entre les niveaux électroniques et les spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence.	15
Figure 4 : Effet de la diffusion rotationnelle sur la polarisation de la lumière.....	18
Figure 5 : Irradiance transverse d'un faisceau gaussien.....	24
Figure 6 : Représentation du profil de distribution de l'énergie selon l'axe Z et le plan XY ..	28
Figure 7 : Profil de fluorescence de protéines adsorbées sur une surface de verre. Ajustement par régression non linéaire à partir de l'expression 30.....	29
Figure 8 : Courbes d'iso-énergie selon l'axe z, calculées pour un objectif de $NA=1.2$ utilisé à la limite de diffraction (équation 22), à 532 nm, $w_0 = 0,270$, à 590 nm, $w_0 = 0,300$ et 632.8 nm, $w_0 = 0,322$	30
Figure 9 : Comparaison entre le microscope optique et le microscope à épifluorescence.....	32
Figure 10 : Le microscope confocal.....	33
Figure 11 : Résolution latérale XY (ligne) et axiale Z (pointillé) en fonction de l'ouverture numérique pour $\lambda_0 = 532$ (vert), 584 (orange) et 633 (rouge).....	35
Figure 12 : Schéma de la liaison peptidique	38
Figure 13 : Structure du lysozyme et répartitions en 3D du potentiel électrostatique (en rouge les charges négatives et en bleu les charges positives).	43
Figure 14 : Formule et spectre d'absorption et d'émission de fluorescence des acides aminés aromatique [55]	45
Figure 15 : Domaine spectral d'absorption et de fluorescence de 28 fluorophores couramment utilisés par ordre d'importance [79]	48
Figure 16 : Schéma du marquage direct d'une protéine par une sonde fluorescence.....	50
Figure 17 : Représentation schématique d'une protéine interagissant avec une surface d'après J.D. Andrade[93].....	51
Figure 18 : Profil de concentration théorique dans le cas d'une adsorption contrôlée par le transport avec convection.....	55

Figure 19 : Histogramme des retards de photons uniques comptés	67
Figure 20 : Dispositif optique d'analyse de fluorescence en solution	68
Figure 21: Schéma de la détection	71
Figure 22 : Déclin de fluorescence et fonction d'anisotropie de la rhodamine 6G	73
Figure 23 : Comparaison des résultats obtenus entre deux déclins de rhodamine. En rose la fonction le déclin expérimentale, en noir la fonction instrumentale et en bleu la fonction ajustée.....	76
Figure 24 : Mécanisme réactionnel de l'iodation de la tyrosine.....	78
Figure 25 : Dispositif expérimental pour les mesures de concentration de surface.....	78
Figure 26 : Cellule d'écoulement utilisée pour les expériences d'écoulement en radiodétection	79
Figure 27: Cinétique d'adsorption. A : Courbe obtenue pour une expérience type. B : courbe d'adsorption théorique	80
Figure 28 : Schéma de fente d'adsorption	80
Figure 29 : Spectre d'absorbance et d'émission de fluorescence de l'avidine et du complexe avidine-biotine. En gris (trait continu), le spectre d'excitation de fluorescence de l'avidine. En ligne noire continue, le spectre d'émission de fluorescence de l'avidine. En pointillé noir, le spectre d'émission de fluorescence du complexe avidine-biotine.....	85
Figure 30 : Structure tridimensionnelle d'un dimère d'avidine contenant de la biotine [163]. En bleu marine, la chaîne polypeptidique, en bleu clair la chaîne N-acetyl-D-glucosamine (partie glycosylée).....	86
Figure 31 : Interaction hydrophobe (A) et hydrophile (B) entre la biotine et les acides aminés de l'avidine constitutifs du site de reconnaissance de la biotine [164]	87
Figure 32 : Déclin de fluorescence de l'avidine et de l'avidine-biotine pris à l'angle magique (sans contribution d'anisotropie). En gris : le déclin de fluorescence expérimental (point) et la courbe ajustée (ligne) de l'avidine-biotine. En noir le déclin de fluorescence expérimental (point) et la courbe ajustée (ligne) de l'avidine seul.	88
Figure 33 : Modèle proposé par Gruber et al. de l'interaction entre l'avidine et la biotine fluorescéine conjuguée. A : ligant long (14 atomes) B, ligand court (4 atomes).....	91
Figure 34 : Spectres d'absorbance des fluorophores de la Série des Alexa Fluor commercialisés par Molecular Probes [79].....	91
Figure 35 : (A) spectre d'absorbance et (B) spectre d'excitation (rouge) et d'émission (violet) de fluorescence de l'alexa fluor 594	92
Figure 36 : Spectres de l'alexa fluor 594. A : Déclin de fluorescence à l'angle magique et fonction d'ajustement monoexponentiel. B : fonction d'anisotropie de fluorescence.....	92

Figure 37 : Evolution de l'intensité d'émission de fluorescence de l'alexa fluor 594 en fonction de sa concentration	93
Figure 38 : Formule chimique de l'alexa, et des dérivés de biotine	94
Figure 39 : Les différents marquages de l'avidine A : marquage direct - B : marquage via la biotine.....	95
Figure 40 : Schéma réactionnel de la biotinylation de l'alexa fluor 594	96
Figure 41 : Chromatogramme obtenu par séparation HPLC. En ligne noire, le produit final de réaction. En pointillé long gris, l'alexa fluor succinimidyl ester à t=0. En pointillé court gris l'alexa fluor succinimidyl ester après hydrolyse de la fonction succinimidyl ester. 97	97
Figure 42 : Schéma réactionnel entre la biocytine et l'alexa fluor 594	98
Figure 43 : Spectre d'absorbance (A) et d'émission de fluorescence (B) de l'alexa (gris clair), B4al (gris foncé) et de A-B4al (noir)	99
Figure 44 : Déclin de fluorescence à l'angle magique de A-B4al (noir) et de l'alexa fluor 594 (gris). En pointillée les déclins expérimentaux et en ligne les déclins calculés.....	100
Figure 45 : Fonction d'anisotropie de l'alexa fluor 594 (gris) et de A-B4al (noir)	102
Figure 46 : Evolution des temps de corrélation de l'alexa et de A-B4al (●), de l'alexa fluor 594 (▼) et de A-al (■) en fonction de la viscosité.....	106
Figure 47 : Evolution de la durée de vie de fluorescence de A-B4al (●) et de l'alexa fluor 594 (▼) en fonction de la fraction d'éthylène glycol dans la solution	107
Figure 48 : Schéma général du montage confocal	114
Figure 49 : Décalage du point focal provoqué par le changement d'indice optique	116
Figure 50 : Dispersion du point focal induit par le changement d'indice.....	117
Figure 51 : Spectre de fluorescence et de diffusion d'une cuve contenant de l'alexa pris avec un objectif à sec olympus 100X NA = 0,8	118
Figure 52 : Description de l'objectif utilisé	119
Figure 53 : Spectre de fluorescence et diffusion d'une cuve contenant de l'alexa effectués avec l'objectif OLYMPUS 100X.....	120
Figure 54 : Séparation des faisceaux d'excitation et émission par un filtre dichroïque	124
Figure 55 : Transmittance du filtre dichroïque et spectre d'absorbance et d'émission de l'alexa fluor 594	124
Figure 56 : Cellule d'écoulement.....	127
Figure 57 : Dispositif d'écoulement des solutions dans la cellule.....	128

Figure 58 : Montage confocal	130
Figure 59 : Photo du dispositif optique confocal	131
Figure 60 : Evolution de la fluorescence à la surface en fonction du temps. Expérience effectuée sous écoulement de tampon après adsorption de protéines.	133
Figure 61 : Distribution de fluorescence de l'avidine marquée adsorbée sur du verre	134
Figure 62 : Convolution de la distribution de l'énergie d'excitation avec le couple interface/solution.....	137
Figure 63 : Cinétique d'adsorption de l'avidine radiomarquée sur le mica. (a) $C_b=1 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $\gamma=1060 \text{ s}^{-1}$ (b) $C_b=15 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $\gamma= 503 \text{ s}^{-1}$	141
Figure 64 : Evolution des temps de corrélation de A-B4al (A) et de l'alexa (B) en fonction de la viscosité obtenus avec le dispositif « classique » (●) et le dispositif confocal (▼) 144	
Figure 65 : Décroissance de la durée de vie de A-B4al en fonction de la fraction d'éthylène glycol mesurée avec le dispositif « classique » (●) et le dispositif confocal (▼).....	145
Figure 66 : Evolution du pic de fluorescence à la surface en fonction du temps pour l'expérience B	147
Figure 67 : Evolution de la fluorescence sur la surface de mica normalisée à celle de la solution lors du processus d'adsorption : (●) Exp A $\gamma=3350 \text{ s}^{-1}$; (▼) Exp B $\gamma=1675 \text{ s}^{-1}$	147
Figure 68 : Fluorescence en surface, normalisée à celle de la solution, en fonction du temps. Adsorption d'avidine sur du mica à 3350 s^{-1} : Exp A avidine marquée seule (●) et Exp C mélange avidine, avidine marquée à 50/50 (▼).....	148
Figure 69 : Profils de concentration de l'avidine en fonction du temps pour l'expérience B corrigés de la contribution de la fluorescence en surface.....	151
Figure 70 : Evolution du profil de concentration de la solution d'avidine lors du processus d'adsorption pour un gradient de vitesse $\gamma = 1675 \text{ s}^{-1}$	152
Figure 71 : Evolution de la fluorescence au milieu de la cuve en fonction du temps pour les expériences B et D ($\gamma= 1675 \text{ s}^{-1}$)	152
Figure 72 : Evolution du profil de concentration de la solution d'avidine lors du processus d'adsorption pour un gradient de vitesse $\gamma = 3350 \text{ s}^{-1}$	153
Figure 73 : Fluorescence en fonction de z et du temps lors du processus d'adsorption d'avidine ($C_b= 5\mu\text{g ml}^{-1}$, $\gamma = 1700 \text{ s}^{-1}$ approx.) sur une membrane AN-69	157
Figure 74 : Evolution de l'intensité de fluorescence sur la surface de la membrane.....	157
Figure 75 : Fluorescence en fonction du temps à l'intérieur de la membrane (A) et dans la solution (B) $13 \mu\text{m}$ par rapport à la surface	158
Figure 76 : fonction d'anisotropie de l'avidine en solution (A) et sur la membrane (B).....	159

Figure 77 : Représentation schématique du système de coordonnées du champs de vitesse \vec{v} entre deux plaques planes parallèles	165
Figure 78 : représentation de la relation asymptotique pour déterminer le <i>beam waist</i> d'un laser	171
Figure 79 : Fonction instrumentale	174

Index des tableaux

Tableau 1 : Représentation chimique des différents types interactions	41
Tableau 2 : pKa des fonctions acido-basique des acides aminés	43
Tableau 3 : Données spectrales des acides aminées aromatiques [6]	45
Tableau 4: Processus intervenant dans l'adsorption des protéines [94].....	52
Tableau 5 : caractéristiques luminescentes de l'avidine [46].....	85
Tableau 6 : Durées de vie et facteurs pré-exponentiels pour l'avidine et l'avidine-biotine.....	88
Tableau 7 : Maximum d'absorbance et d'émission de fluorescence des différents marquages	99
Tableau 8 : Résultats de fluorescence dynamique, durée de vie de fluorescence τ_F (ns) et χ^2 le facteur statistique ainsi que Q le rendement quantique de l'alexa fluor 594, l'alexa biotine éthylène diamine, A-al, A-B7al et A-B4al.....	100
Tableau 9 : Evolution des paramètres de relaxation : la durée de vie radiative τ_0 (ns), et les constantes de vitesse de relaxation par voie radiative k_f et non radiative Σk_i de l'alexa fluor 594, de B4al et de A-B4al	101
Tableau 10 : Résultats en polarisation de fluorescence temps de corrélation θ_r (ns) , facteur de dépolarisation r_0 et les tests de statistique pour les déclins verticaux χ^2_{Ver} et horizontaux χ^2_{Hor} pour l'alexa fluor 594, A-al, A-B7al et A-B4al.....	102
Tableau 11 : Durées de vie τ_F (ns), temps de corrélation θ_r (ns) et facteur de dépolarisation (r_0) de l'alexa, de A-al et de A-B4al en fonction de la viscosité (η). Pour chaque déclin analysé sont aussi notifiés les facteurs statistiques χ^2	105
Tableau 12 : Propriétés de fluorescence : longueur d'onde des maximum d'absorbance (λ_{max} absorbance) et d'émission de fluorescence (λ_{max} émission), les durées de vie (τ_{F1} et τ_{F2}) de fluorescence et leur poids relatif (a_1 et a_2) de A-B4al après traitement par 1% en masse de SDS (SDS1) et après passage aux ultrasons (SDS2).....	108
Tableau 13: Propriétés de polarisation de fluorescence, temps de corrélation (θ_{r1} et θ_{r2}) et facteur de dépolarisation par composante de temps de corrélation ($r_{0,1}$ et $r_{B0,2}$), facteur de dépolarisation globale ($r_{0,t}$) de A-B4al après traitement par 1% en masse de SDS	109
Tableau 14 : Propriétés de fluorescence longueur d'onde des maximum d'absorbance λ_{max} absorbance et d'émission de fluorescence λ_{max} émission, les composantes de durée de vie (τ_{F1} et τ_{F2}) de fluorescence et leur poids relatif (a_1 et a_2) de A-B4al en présence d'agent dénaturant.....	110

- Tableau 15 : Propriétés de polarisation de fluorescence, temps de corrélation ($\theta_{r,1}$, $\theta_{r,2}$ et $\theta_{r,3}$) et facteur de dépolarisation par composante de temps de corrélation ($r_{0,1}$, $r_{0,2}$ et $r_{0,3}$), facteur de dépolarisation globale ($r_{0,t}$) de A-B4al après traitement par des agents dénaturants. 110
- Tableau 16 : Paramètres et constantes de vitesse initiale mesurés pour les études d'adsorption de l'avidine sur le mica [concentration de la solution d'avidine (C_b), gradient de vitesse (γ), constante d'adsorption mesurée (k) et constante de Lévêque (k_{Lev})]. 142
- Tableau 17 : Comparaison des résultats obtenus en mode confocal [durée de vie de fluorescence τ_F , temps de corrélation (θ_r) facteur de dépolarisation (r_0)] et en mode classique (*italique*) pour diverses molécules fluorescentes..... 143
- Tableau 18 : Durée de vie τ_F (ns), temps de corrélation θ_r (ns) et facteur de dépolarisation (r_0) de l'alexa et de A-B4al en fonction de la viscosité (η) obtenus par le dispositif confocal. Pour chaque déclin analysé sont aussi notifiés les facteurs statistiques χ^2 144
- Tableau 19 : Conditions expérimentales des études d'adsorption de l'avidine sur le mica, en mode confocal 146
- Tableau 20 : Durées de vie τ_F (ns), temps de corrélation θ_r (ns) et facteur de dépolarisation (r_0) de A-B4al en solution et à la surface à la fin de processus d'adsorption..... 155

Références bibliographiques (par numéros)

1. Cantor, C.R. and T. Tao (1971). Procedures in Nucleic Acid Research. New York, Harper & Row.
2. Stokes, G.G. (1852). "On the change of refrangibility of light." Phil. Trans. R. Soc. London **142**: 463-562.
3. Einstein, A. (1906). "Zur Theorie der Brownschen Bewegung." Annalen der Physik **19**: 371.
4. Dong, W.J., et al. (1997). "Conformation of the N-terminal segment of a monocysteine mutant of troponin I from cardiac muscle." Biochemistry **36**(22): 6745-6753.
5. Bilsel, O., et al. (1999). "Time-resolved fluorescence anisotropy study of the refolding reaction of the alpha-subunit of tryptophan synthase reveals nonmonotonic behavior of the rotational correlation time." Biochemistry **38**(13): 4177-4187.
6. Cantor, C.R. and P.R. Schimmel (1980). Techniques for study of biological structure and function. San Francisco, W. H. Freeman and Company.
7. Wahl, p. (1979). "Analysis of fluorescence anisotropy decays by a least squares methods." Biophysical Chemistry **10**: 91-104.
8. Feinstein, E., et al. (2003). "Constrained Analysis of Fluorescence Anisotropy Decay: Application to Experimental Protein Dynamics." Biophysical Journal **84**(1): 599-611.
9. Rusinova, E., et al. (2002). "Alexa and Oregon Green dyes as fluorescence anisotropy probes for measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions." Analytical Biochemistry **308**(1): 18-25.
10. Casey, K.G. and E.L. Quitevis (1988). "Effect of solvent polarity on nonradiative processes in xanthene dyes: Rhodamine B in normal alcohols." Journal of Physical Chemistry **92**(23): 6590 - 6594.
11. Valeur, B. (1993). Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters. Molecular Luminescence Spectroscopy. J.W. Sons. **77**: 25-84.
12. Moog, R.S., et al. (1982). "Viscosity dependence of the rotational reorientation of rhodamine B in mono and polyalcohols. Picosecond transient grating experiments." Journal of Physical Chemistry **86**: 4694-4700.
13. Diaspro, A. and M. Robello (2000). "Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **55**(1): 1-8.
14. Klonis, N., et al. (2002). "Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics." European Biophysics Journal **31**(1): 36-51.

15. Fushimi, K. and A. Verkman (1991). "Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry." Journal of Cellular Biology **112**(4): 719-725.
16. Gavilan, E., et al. (2005). "One-pot synthesis of fluorescent porous aluminosilicate nanoparticles." Comptes Rendus Chimie **8** (in press).
17. Alacala, J.R., E. Gratton, and F.G. Prendergast (1987). "Fluorescence lifetime distributions in proteins." Biophysical Journal **51**: 597-604.
18. Hovius, R., et al. (2000). "Fluorescence techniques: shedding light on ligand-receptor interactions." Trends in Pharmacological Sciences **21**(7): 266-273.
19. Lakowicz, J.R. (1983). quenching of Fluorescence. Principle of Fluorescence. P.P. New-York.
20. Hübner, C.G., et al. (2001). "Direct observation of the triplet lifetime quenching of single dye molecules by molecular oxygen." Journal of Chemical Physics **115**(21): 9619-9622.
21. Vaiana, A.C., et al. (2003). "Fluorescence Quenching of Dyes by Tryptophan: Interactions at Atomic Detail from Combination of Experiment and Computer Simulation." Journal of the American Chemical Society **125**(47): 14564-14572.
22. Marmé, N., et al. (2003). "Inter- and Intramolecular Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan." Bioconjugate Chemistry **14**(6): 1133 -1139.
23. Amos, W.B. and J.G. White (2003). "How the confocal laser scanning microscope entered biological research." Biology of the Cell **95**: 335-342.
24. Bastiaens, P.I.H. and R. Pepperkok (2000). "Observing proteins in their natural habitat: the living cell." Trends In Biochemical Sciences **25**(12): 631-637.
25. Minsky, M., *microscopy appartus*. 1957: US patent.
26. Minsky, M. (1988). "Memoir on inventing the confocal scanning microscope." scanning **10**: 128-138.
27. Brakenhoff, G., P. Blom, and P. Barends (1979). "Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lens." Journal of Microscopy **117**: 219-232.
28. Brakenhoff, G., et al. (1985). "Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy." Nature **317**: 748-749.
29. White, J.G. and W.B. Amos (1987). "Confocal microscopy comes of age." Nature **328**: 183-184.
30. Stephens, D.J. and V.J. Allan (2003). "Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging." Science **300**: 82-86.

31. Ljunglöf, A. and J. Thommes (1998). "Visualising intraparticle protein transport in porous adsorbents by confocal microscopy." Journal of Chromatography A **813**: 387-395.
32. Linden, T., et al. (1999). "Visualizing two-component protein diffusion in porous adsorbents by confocal scanning laser microscopy." Biotechnology and Bioengineering **65**(6): 622 - 630.
33. Ljunglöf, A. and Hjorth (1996). "Confocal microscopy as a tool for studying protein adsorption to chromatographic matrices." Journal of Chromatography A **743**: 75-83.
34. Hausteijn, E. and P. Schwillie (2004). "Single-molecule spectroscopic methods." Current Opinion in Structural Biology **14**(5): 531-540.
35. Krichevsky, O. and g. Bonnet (2002). "Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications." Reports on Progress in Physics **65**: 251.
36. Rusksthuhl, T. and S. Seeger (2004). "Attoliter detection volumes by confocal total-internal-reflection fluorescence microscopy." Optics Letters **29**(6): 569-571.
37. Hu, D. and H.P. Lu (2003). "Single-Molecule Nanosecond Anisotropy Dynamics of Tethered Protein Motions." Journal of Physical Chemistry B **107**(2): 618 -626.
38. Tan, X., et al. (2004). "Probing nanosecond protein motions of calmodulin by single-molecule fluorescence anisotropy." Applied Physics Letters **85**(12): 2420–2422.
39. Huang, Z., D. Ji, and A. Xia (2005). "Fluorescence intensity and lifetime fluctuations of single Cy5 molecules immobilized on the glass surface." Colloids and Surfaces A **257-258**: 203-209.
40. Horton, R.H., et al. (1994). Principes de Biochimie. Deboeck université.
41. Linderstrom-Lang (1952). Proteins and Enzymes. Standfort university, California: Press Standfort.
42. Bernal, J.D. (1958). "Discuss." Faraday Soc. **25**: 7.
43. Linderstrom-Lang, K.U. (1924). "C.R." Trav. Lab. Calsberg **15**: 70.
44. Pauling, L. (1960). The Nature of the Chemical Bond. NY.
45. Green, M. (1963). "Reaction between avidin and biotin." Biochemical Journal **89**: 599-609.
46. Savage, M.D., et al. (1992). Avidin-Biotin chemistry: a Handbook.
47. Wilcheck, M. and E.A. Bayer (1990). Avidin-Biotin technology. Academic press.
48. Green, M. and E.J. Toms (1972). "The dissociation of avidin-biotin Complexes by guanidinium chloride." Biochemical Journal **130**: 707-711.

49. Laitinen, O.H., et al. (2001). "Biotin Induces Tetramerization of a Recombinant Monomeric Avidin. A model for protein-protein interactions." Journal of Biological Chemistry **276**(11): 8219-8224.
50. Marttila, A.T., et al. (2003). "Mutation of the important Tyr-33 residue of chicken avidin: functional and structural consequences." biochemical journal **369**: 249-254.
51. Mei, G., et al. (1994). "Biotin and Biotin Analogues Specifically Modify the Fluorescence Decay of Avidin." Journal of Molecular Biology **242**(4): 559-565.
52. Tandford, C. and J. Wiley (1961). Physical chemistry of macromolecules. New York, John Wiley and sons.
53. Nordlund, H.R., et al. (2003). "Introduction of histidine residues into avidin subunit interfaces allows pH-dependent regulation of quaternary structure and biotin binding." FEBS Letters **555**(3): 449-454.
54. Hofmeister, F. (1888). "Zur Lehre von der Wirkung der Salze." Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. **24**: 247-260.
55. Du, H., et al. (1998). "PhotochemCAD: A Computer-Aided Design and Research Tool in Photochemistry." Photochemistry and Photobiology **68**(2): 141-142.
56. Callis, P.R. and J.T. Vivian (2003). "Understanding the variable fluorescence quantum yield of tryptophan in proteins using QM-MM simulations. Quenching by charge transfer to the peptide backbone." Chemical Physics Letters **369**(3-4): 409-414.
57. Szabo, A.G. and D.M. Rayner (1980). "Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution." Journal of the American Chemical Society **102**: 554-563.
58. Beechem, J.M. and L. Brand (1985). "Time-Resolved Fluorescence Of Proteins." Annual Review Of Biochemistry **54**: 43-71.
59. Cundall, R.B. and R.E. Dale (1983). Time-resolved fluorescence spectroscopy in biochemistry and biology. New-York, Plenum press.
60. Yamamoto, Y. and J. Tanaka (1972). "Polarized Absorption-Spectra Of Crystals Of Indole And Its Related Compounds." Bulletin Of The Chemical Society Of Japan **45**(5): 1362-&.
61. Valeur, B. and G. Weber (1977). "Resolution Of Fluorescence Excitation Spectrum Of Indole Into 11a And 11h Excitation Bands." Photochemistry And Photobiology **25**(5): 441-444.
62. Szabo, A. (1984). "Theory Of Fluorescence Depolarization In Macromolecules And Membranes." Journal Of Chemical Physics **81**(1): 150-167.
63. Cross, A.J., D.H. Waldeck, and G.R. Fleming (1983). "Time Resolved Polarization Spectroscopy - Level Kinetics And Rotational Diffusion." Journal Of Chemical Physics **78**(11): 6455-6467.

64. Konev, S.V. (1967). Fluorescence and phosphorescence of proteins and nucleic acids. New York, S. Udenfriend Plenum Press.
65. Ross, J.B.A., K.W. Rousslang, and L. Brand (1981). "Time-Resolved Fluorescence And Anisotropy Decay Of The Tryptophan In Adrenocorticotropin-(1-24)." Biochemistry **20**(15): 4361-4369.
66. Petrich, J.W., et al. (1983). "On The Origin Of Non-Exponential Fluorescence Decay In Tryptophan And Its Derivatives." Journal Of The American Chemical Society **105**(12): 3824-3832.
67. Ludescher, R.D., et al. (1985). "Complex Photophysics Of The Single Tryptophan Of Porcine Pancreatic Phospholipase-A-2, Its Zymogen, And An Enzyme Micelle Complex." Biochemistry **24**(25): 7240-7249.
68. Hazan, G., E. Haas, and I.Z. Steinberg (1976). "Fluorescence Decay Of Human-Serum Albumin And Its Subfractions." Biochimica Et Biophysica Acta **434**(1): 144-153.
69. Gudgin, E., R. Lopezdelgado, and W.R. Ware (1981). "The Tryptophan Fluorescence Lifetime Puzzle - A Study Of Decay Times In Aqueous-Solution As A Function Of Ph And Buffer Composition." Canadian Journal Of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie **59**(7): 1037-1044.
70. Grinvald, A. and I.Z. Steinberg (1976). "Fluorescence Decay Of Tryptophan Residues In Native And Denatured Proteins." Biochimica Et Biophysica Acta **427**(2): 663-678.
71. Cockle, S.A. and A.G. Szabo (1981). "Time-Resolved Fluorescence-Spectra Of Tryptophan In Monomeric Glucagon." Photochemistry And Photobiology **34**(1): 23-27.
72. Millar, D.P. (1996). "Time-resolved fluorescence spectroscopy." Biophysical Methods: 637-642.
73. Tsien, R.Y. (1998). "The green fluorescent protein." Annual Review Biochemistry **67**: 509-544.
74. Baird, G.S., D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien (2000). "Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral." PNAS **97**(22): 11984-11989.
75. Gross, L.A., et al. (2000). "The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral." PNAS **97**(22): 11990-11995.
76. Heikal, A.A., S.T. Hess, and W.W. Webb (2001). "Multiphoton molecular spectroscopy and excited-state dynamics of enhanced green fluorescent protein (EGFP): acid-base specificity." Chemical Physics **274**(1): 37-55.
77. Heikal, A.A., et al. (2000). "Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: Coral red (dsRed) and yellow (Citrine)." PNAS **97**(22): 11996-12001.

78. Lippincott-Schwartz, J. and G.H. Patterson (2003). "Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells." Science **300**: 87-91.
79. Haugland, R.P. (2002). Handbook of fluorescent probes and research products. Molecular probes.
80. Powe, A.M., et al. (2004). "Molecular fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectroscopy." Analytica Chemistry **76**: 4614-4634.
81. Watt, R.M. and E.W. Voss (1977). "Mechanism of quenching of fluorescein by anti-fluorescein IgG antibodies." Immunochemistry **14**: 533-541.
82. Kada, G., et al. (1999). "Rapid estimation of avidin and streptavidin by fluorescence quenching or fluorescence polarization." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1427**(1): 44-48.
83. Buschmann, V., K.D. Weston, and M. Sauer (2003). "Spectroscopic Study and Evaluation of Red-Absorbing Fluorescent Dyes." Bioconjugate Chemistry **14**(1): 195-204.
84. Gray, J.J. (2004). "The interaction of proteins with solid surfaces." Current Opinion in Structural Biology **14**: 110-115.
85. Hornett, T.A. and J.L. Brash (1995). Proteins at interface, II. Fundamentals and Applications. Wachington D.C.
86. Valette, P., M. Thomas, and P. Déjardin (1999). "Adsorption of low molecular weight proteins to hemodialysis membrane: experimental results and simulation." Biomaterials **20**: 1621-1634.
87. Malmsten, M., et al. (1996). "Effects of Hydrophilization and Immobilization on the Interfacial Behavior of Immunoglobulins." Journal of Colloid and Interface Science **177**(1): 70-78.
88. Netz, R.R. and D. Andelman (2003). "Neutral and charged polymers at interfaces." Physics Reports **380**(1-2): 1-95.
89. Tie, Y., C. Calonder, and P.R. Van Tassel (2003). "Protein adsorption: Kinetics and history dependence." Journal of Colloid and Interface Science **268**: 1-11.
90. Claesson, P.M., et al. (1995). "Protein interactions at solid surfaces." Advances in Colloid and Interface Science **57**: 161-227.
91. Mészáros, R., et al. (2002). "Adsorption and Electrokinetic Properties of Polyethylenimine on Silica Surfaces." Langmuir **18**(16): 6164 -6169.
92. Claesson, P.M., et al. (2005). "Polyelectrolyte-mediated surface interactions." Advances in Colloid and Interface Science **in press**.
93. Andrade, J.D. (1985). Principles of protein adsorption. Surface and interfacial aspect of biomedical polymers. Plenum. **Volume 2: Protein Adsorption**: 1-80.

94. Haynes, C.A. and W. Norde (1994). "Globular proteins at solid/liquid interfaces." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **2**(6): 517-566.
95. von Smoluchowski, M. (1917). "Z. physik." Chemie **92**: 129.
96. Crank, J. (1975). The mathematics of diffusion. New York, Oxford university press.
97. Lévêque, M. (1928). Les lois de transmission de la chaleur par convection. Paris, Faculté des sciences.
98. Bowen, B.D., S. Levine, and N. Epstein (1976). "Fine particle deposition in laminar flow through parallel-plate and cylindrical channels." Journal of Colloid and Interface Science **54**(3): 375-390.
99. Déjardin, P., et al. (1994). "Adsorption rate in the convection-diffusion model." Langmuir **10**: 3898-3901.
100. Dejardin, P. and E.N. Vasina (2004). "An accurate simplified data treatment for the initial adsorption kinetics in conditions of laminar convection in a slit: application to protein adsorption." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **33**(2): 121-127.
101. Talbot, J., et al. (1994). "New equation for multicomponents adsorption kinetics." Langmuir **10**: 1663-1666.
102. Wojtaskczyk, P. (1995). "Propriétés statistiques d'ensemble de particules adsorbées sur une surface solide."
103. Schaaf, P. and J. Talbot (1989). "Surface exclusion effects in adsorption processes." Journal of Chemical physics **91**(7): 4401.
104. Hinrichsen, E.L., J. Feder, and T. Jossang (1986). "Geometry of random sequential adsorption." J. Stat.Phys. **44**(793).
105. Lundström, I. and H. Elwing (1990). "Simple kinetic models for proteins adsorbed on polymer surface." Journal of colloid and Interface Science **136**(1): 68-84.
106. Beissinger, R.L. and E.F. Leonard (1982). "Sorption kinetics of binary protein solutions: general approach to multicomponent systems." Journal of Colloid and Interface Science **85**(2): 521-533.
107. Soderquist, M.E. and A.G. Walton (1980). "Structural changes in protein adsorbed on polymer surfaces." Journal of Colloid and Interface Science **75**(2): 386-397.
108. Sebastianov, V.I., Z.M. Belomestniai, and N.K. Zimin (1983). "In vivo assessment of the hemocompatible properties of polymers." Artificial Organs **7**(1): 126-133.
109. Liedberg, B., et al. (1986). "On the adsorption of [beta]-lactoglobulin on hydrophilic gold surfaces: Studies by infrared reflection-absorption spectroscopy and ellipsometry." Journal of Colloid and Interface Science **114**(2): 386.

110. Feng, L. and J.D. Andrade (1994). "Protein adsorption on low-temperature isotropic carbon: I. Protein conformational change probed by differential scanning calorimetry." J. Biomed. Mater. Res.: 735-743.
111. Heitz, F. and N. Van Mau (2002). "Protein structural changes induced by their uptake at interfaces." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology **1597**(1): 1-11.
112. Donghao, R.L. and K. Park (1991). "Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen." Journal of Colloid and Interface Science **144**(1): 271-281.
113. Buijs, J., W. Norde, and J.W.T. Lichtenbelt (1996). "Changes in the secondary structure of adsorbed IgG and F(ab') studied by FTIR spectroscopy." Langmuir **12**: 1605-1613.
114. van Oss, C.J. (1993). Forces interfaciales en milieux aqueux. Paris, masson.
115. Quiquampoix, H., et al. (1993). "Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **75**: 85-93.
116. Wu, H., et al. (1993). "Introduction of changes in the secondary structure of globular proteins by a hydrophobic surface." European biophysics journal **22**: 201-205.
117. Larsericsdotter, H., S. Oscarsson, and J. Buijs (2001). "Thermodynamic analysis of proteins adsorbed on silica particle: electrostatic effect." Journal of Colloid and Interface Science **237**(1): 98-103.
118. Norde, W. and J. Lyklema (1979). "Thermodynamics of protein adsorption. Theory with special reference to the adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at polystyrene surfaces." Journal of Colloid and Interface Science **71**: 350.
119. Vasina, E. and P. Déjardin (2004). "Adsorption of α -Chymotrypsin onto mica in laminar flow condition. Adsorption kinetics constant as a function of Tris Buffer concentration at pH 8,6." Langmuir **20**: 8699-8706.
120. Malmsten, M. (1998). "Formation of Adsorbed Protein Layers." Journal of Colloid and Interface Science **207**(2): 186.
121. Hlady, V. and J. Buijs (1996). "Protein adsorption on solid surfaces." Current Opinion in Biotechnology **7**(1): 72.
122. Nakanishi, K., T. Sakiyama, and K. Imamura (2001). "On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon." Journal of Bioscience and Bioengineering **91**(3): 233-244.
123. Chan, R. and V. Chen (2004). "Characterization of protein fouling on membranes: opportunities and challenges." Journal of Membrane Science **242**(1-2): 169-188.

124. Ethève, J. and P. Déjardin (2002). "Adsorption kinetics of lysozyme on silica at pH 7.4: correlation between streaming potential and absorbed amount." Langmuir **18**(5): 1777-1785.
125. Su, T.J., et al. (1998). "Application of Small Angle Neutron Scattering to the in Situ Study of Protein Fouling on Ceramic Membranes." Langmuir **14**(19): 5517 -5520.
126. Kim, D.T., H.W. Blanch, and C.J. Radke (2002). "Direct imaging of lysozyme adsorption onto mica by atomic force microscopy." Langmuir **18**: 5841-5850.
127. Johnson, C.A., Y. Yuan, and A.M. Lenhoff (2000). "Adsorbed layer of ferritin at solid and fluid interface studied by atomic force microscopy." Journal of Colloid and Interface Science **233**: 260-272.
128. Kondo, A., et al. (1993). "Conformational changes in protein molecules upon adsorption on ultrafine particles." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **1**(3): 197.
129. Maste, M.C.L., W. Norde, and A.J.W.G. Visser (1997). "Adsorption-Induced Conformational Changes in the Serine Proteinase Savinase: A Tryptophan Fluorescence and Circular Dichroism Study." Journal of Colloid and Interface Science **196**(2): 224.
130. Lu, D.R. and K. Park (1991). "Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen." Journal of Colloid and Interface Science **144**(1): 271.
131. Maruyama, T., et al. (2001). "FT-IR analysis of BSA fouled on ultrafiltration and microfiltration membranes." Journal of Membrane Science **192**(1-2): 201.
132. Wiedenmann, J., et al. (2004). "EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion." PNAS **101**(45): 15905-15910.
133. Anikin, K., et al. (2005). "Polyelectrolyte-Mediated Protein Adsorption: Fluorescent Protein Binding to Individual Polyelectrolyte Nanospheres." Journal of Physical Chemistry B **109**(12): 5418 -5420.
134. Malmsten, M., et al. (1996). "Adsorption of complement protein C3 at polymer surfaces." Journal Of Colloid And Interface Science **179**(1): 163-172.
135. Buijs, J. and V. Hlady (1997). "Adsorption kinetics, conformation, and mobility of the growth hormone and lysozyme on solid surfaces, studied with TIRF." Journal Of Colloid And Interface Science **190**(1): 171-181.
136. Wertz, C.F. and M.M. Santore (2002). "Adsorption and reorientation kinetics of lysozyme on hydrophobic surfaces." Langmuir **18**(4): 1190-1199.
137. Cha, W.N. and R.L. Beissinger (1996). "Macromolecular mass transport to a surface: Effects of shear rate, pH, and ionic strength." Journal Of Colloid And Interface Science **177**(2): 666-674.

138. Lensum, L., T.A. Smith, and M.L. Gee (2002). "Partial denaturation of silica-absorbed bovine serum Albumine determined by time resolved evanescent wave-induced fluorescence spectroscopy." Langmuir **18**(25): 9924-9931.
139. Govindjee, et al. (1990). "Chlorophyll a fluorescence lifetime distributions in open and closed photosystem II reaction center preparations." Biochimica Biophysica Acta **1015**(2): 173-179.
140. O'connors, D.V. and D. Phillips (1984). Time correlated single photon counting. New-york.
141. Eaton, D.F. (1990). "Recommended methods for fluorescence decay analysis." Pure & Applied Chemistry **62**(8): 1631-1648.
142. Oriel-Corporation (1994). Getting light into Monochromator. Oriel. USA. **2**: 2-10.
143. Ervin, J., J. Sabelko, and M. Gruebele (2000). "Submicrosecond real-time fluorescence sampling: application to protein folding." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **54**(1): 1-15.
144. Rachofsky, E.L., et al. (1999). "A General Method for Constrained Analysis of Fluorescence Anisotropy Decay: Application of the Steady-State Anisotropy." Journal of Fluorescence **9**(4): 379-390.
145. Löfroth, J.-E. (1985). "Deconvolution of single photon counting data with a reference method and global analysis." European Biophysics Journal **13**: 45-58.
146. Flom, S. and J. Flendler (1988). "Global analysis of fluorescence depolarization experiments." Journal of Physical Chemistry **92**: 5908-5913.
147. Bajzer, Z.e., et al. (1991). "Maximum likelihood method for the analysis of time-resolved fluorescence decay curves." European Biophysics Journal **20**: 247-262.
148. Livesey, A.K. and J. Brochon (1987). "Analysing the distribution of decay constants in pulse-fluorimetry using the maximum entropy method." Biophysical Journal **52**: 693-706.
149. Marquardt, D.W. (1963). "An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters." J. Soc.Ind. Appl. Math **11**: 431.
150. Janot, J.M., et al. (1991). "The time resolved fluorescence and anisotropy of subtilisins BPN' and Carlsberg." Biophysical Chemistry **41**: 277-287.
151. Grinvald, A. and I. Steinberg (1974). "On the analysis of fluorescence decay kinetics vy the method of least-squares." Analytical Biochemistry **59**: 583-598.
152. Durbin, J. and G.S. Watson (1950). "Testing for serial correction in least squares regression." Biometrika **37**: 409.
153. Brochon, J. (1994). Maximum entropy method of data analysis in time-resolved spectroscopy. Methods enzymology. **240**: 262-311.

154. Boumza, F., et al. (1992). "Fibrinogen adsorption on pyrex glass tubes: a continuous kinetic study." Biophysical Chemistry **42**(1): 87-92.
155. Green, N.M. and M.D. Melamed (1963). "Avidin.2. purification and composition." Biochemical Journal **89**: 591-599.
156. De Lange, R.J. and T.S. Huang (1971). "Egg white avidin III. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit." Journal of Biological Chemistry **246**(3): 698-709.
157. Rosano, C., P. Arosio, and M. Bolognesi (1999). "The X-ray three-dimensional structure of avidin." Biomolecular Engineering **16**(1-4): 5-12.
158. Wolley, D.W. and L.G. Longworth (1942). "Isolation of an antibiotin factor from egg white." Journal of Biological Chemistry **142**: 285-290.
159. Burstein, E.A., N.S. Vendenkina, and M.N. Ivkona (1973). "Fluorescence and localisation of tryptophan residues in protein molecules." Photochemistry and Photobiology **18**: 263-279.
160. Green, M. (1963). "Stability at extremes of pH and dissociation into sub-units by guanidine hypochloride." Biochemical Journal **89**: 609-620.
161. Donovan, J.W. and K.D. Ross (1973). "Increase in the stability of avidin produced by binding of biotin." Biochemistry **12**(3): 512-517.
162. Gonzalez, M., C.E. Argarana, and G.D. Fidelio (1999). "Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding." Biomolecular Engineering **16**(1-4): 67-72.
163. Pugliese, L., et al., *Three-dimensional structure of tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution*, 1AVD, Editor, RCSB PDB (protein data bank).
164. Livnah, O., et al. (1993). "Three-Dimensional Structures of Avidin and the Avidinbiotin Complex." PNAS **90**(11): 5076-5080.
165. Pugliese, L., et al. (1993). "Three-dimensional Structure of the Tetragonal Crystal Form of Egg-white Avidin in its functional Complex with Biotin at 2.7 Å Resolution." Journal of Molecular Biology **231**(3): 698-710.
166. Kurzban, G.P., et al. (1989). "Shielding of tryptophan residues of avidin by the binding of biotin." Biochemistry **28**: 8537-8542.
167. Qureshi, M.H. and S.-L. Wong (2002). "Design, production, and characterization of a monomeric streptavidin and its application for affinity purification of biotinylated proteins." Protein Expression and Purification **25**(3): 409-415.
168. Schray, K.J., P.G. Artz, and R.C. Hevey (1988). "Determination of avidin and biotin by fluorescence polarisation." Analytica Chemistry **60**: 853-855.

169. Chu, Y.-H., et al. (1994). "Using affinity capillary electrophoresis to determine binding stoichiometries of protein-ligand interaction." Biochemistry **33**(35): 10616-10621.
170. Song, X. and B.I. Swanson (2001). "Rapid assay for avidin and biotin based on fluorescence quenching." Analytica Chimica Acta **442**(1): 79-87.
171. Gruber, H.J., et al. (1998). "Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophore conjugates in complex, colored biofluids." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1381**(2): 203-212.
172. Gruber, H.J., et al. (2000). "Anomalous Fluorescence Enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus Anomalous Fluorescence Loss of Cy5 and Cy7 upon Covalent Linking to IgG and Noncovalent Binding to Avidin." Bioconjugate Chemistry **11**(5): 696 -704.
173. Gruber, H.J., et al. (1997). "Biotin-Fluorophore Conjugates with Poly(ethylene glycol) Spacers Retain Intense Fluorescence after Binding to Avidin and Streptavidin." Bioconjugate Chemistry **8**(4): 552 -559.
174. Marek, M., K. Kaiser, and H.J. Gruber (1997). "Biotin-Pyrene Conjugates with Poly(ethylene glycol) Spacers Are Convenient Fluorescent Probes for Avidin and Streptavidin." Bioconjugate Chemistry **8**(4): 560 -56.
175. Slim, M. and H.F. Sleiman (2004). "Ruthenium(II)-Phenanthroline-Biotin Complexes: Synthesis and Luminescence Enhancement upon Binding to Avidin." Bioconjugate Chemistry **15**(5): 949 - 953.
176. Kada, G., H. Falk, and H.J. Gruber (1999). "Accurate measurement of avidin and streptavidin in crude biofluids with a new, optimized biotin-fluorescein conjugate." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1427**(1): 33-43.
177. Panchuk-Voloshina, N., et al. (1999). "Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates." The Journal of Histochemistry & Cytochemistry **47**(9): 1179–1188.
178. Wilbur, D.S., et al. (2000). "Evaluation of Biotin-Dye Conjugates for Use in an HPLC Assay To Assess Relative Binding of Biotin Derivatives with Avidin and Streptavidin." Bioconjugate Chemistry **11**(4): 584-598.
179. Ross, S.E., S.D. Carson, and L.M. Fink (1986). "Effects of detergents on avidin-biotin interaction." Biotechniques **4**(4): 350_354.
180. Lee, H.G. and E. Fritsche (2003). "Determination of biotin on a protein by quantitative sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of monomeric avidin." Journal of Chromatography A **994**(1-2): 213-219.
181. Bayer, E.A., S. EhrlichRogozinski, and M. Wilchek (1996). "Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic method for assessing the quaternary state and comparative thermostability of avidin and streptavidin." Electrophoresis **17**(8): 1319-1324.

182. Fraenkel-Conrat, H., N.S. Snell, and E.D. Ducay (1952). "Avidin, I. Isolation and characterization of the protein and nucleic acid." Arch. Biochem. Biophys. **92**: 80-96.
183. Bodanszky, A. and M. Bodanszky (1970). "Sephacrose-avidin column for the binding of biotin or biotin containing peptides." Experientia **26**: 327.
184. Hell, S.W. and E.H. Stelzer (1995). Lens aberrations in confocal fluorescence microscopy. Handbook of biological confocal microscopy. J.B. Pawley. Plenum. 347-354.
185. Alexrod, D. (1979). "Carcyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization." Biophysical Journal **26**: 557-574.
186. Alexrod, D. (1989). "Fluorescence polarization microscopy." Methods Cell. Biol. **30**(333-352): 333-352.
187. Gratton, E. and M.J. VandeVen (1995). Laser sources for confocal microscopy. Handbook of biological confocal microscopy. J.B. Pawley. Plenum. 69-90.
188. Spaeth, K., A. Brecht, and G. Gauglitz (1997). "Studies on the Biotin Avidin Multilayer Adsorption by Spectroscopic Ellipsometry." Journal of Colloid and Interface Science **196**(2): 128-135.
189. Yoon, H.C., M.-Y. Hong, and H.-S. Kim (2001). "Reversible Association/Dissociation Reaction of Avidin on the Dendrimer Monolayer Functionalized with a Biotin Analogue for a Regenerable Affinity-Sensing Surface." Langmuir **17**(4): 1234 -1239.
190. Vermette, P., et al. (2003). "Immobilization and surface characterization of NeutrAvidin biotin-binding protein on different hydrogel interlayers." Journal of Colloid and Interface Science **259**(1): 13-26.
191. Clerc, D. and W. Lukosz (1997). "Real-time analysis of avidin adsorption with an integrated-optical output grating coupler: Adsorption kinetics and optical anisotropy of adsorbed monomolecular layers." Biosensors & Bioelectronics **12**(3): 185-194.
192. Chang, D.-K., S.-F. Cheng, and V.D. Trivendi (1999). "Biophysical characterization of the structure of the amino-terminal region of gp41 of HIV-1." Journal of Biological Chemistry **274**(9): 5299-5309.
193. Cogswell, C.J., et al. (1990). "A method for evaluating microscope objectives to optimized performance of confocal systems." Journal of Microscopy **158**: 177-186.

Références bibliographiques (par auteurs)

A

- Alacala, J. R., E. Gratton, et al. (1987). "Fluorescence lifetime distributions in proteins." Biophysical Journal **51**: 597-604.
- Alexrod, D. (1979). "Carcyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization." Biophysical Journal **26**: 557-574.
- Alexrod, D. (1989). "Fluorescence polarization microscopy." Methods Cell. Biol. **30**(333-352): 333-352.
- Amos, W. B. and J. G. White (2003). "How the confocal laser scanning microscope entered biological research." Biology of the Cell **95**: 335-342.
- Andrade, J. D. (1985). Principles of protein adsorption. Surface and interfacial aspect of biomedical polymers. Plenum. **Volume 2: Protein Adsorption**: 1-80.
- Anikin, K., C. Röcker, et al. (2005). "Polyelectrolyte-Mediated Protein Adsorption: Fluorescent Protein Binding to Individual Polyelectrolyte Nanospheres." Journal of Physical Chemistry B **109**(12): 5418 -5420.

B

- Baird, G. S., D. A. Zacharias, et al. (2000). "Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral." PNAS **97**(22): 11984-11989.
- Bajzer, Z. e., T. M. Therneau, et al. (1991). "Maximum likelihood method for the analysis of time-resolved fluorescence decay curves." European Biophysics Journal **20**: 247-262.
- Bastiaens, P. I. H. and R. Pepperkok (2000). "Observing proteins in their natural habitat: the living cell." Trends In Biochemical Sciences **25**(12): 631-637.
- Bayer, E. A., S. EhrlichRogozinski, et al. (1996). "Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic method for assessing the quaternary state and comparative thermostability of avidin and streptavidin." Electrophoresis **17**(8): 1319-1324.
- Beechem, J. M. and L. Brand (1985). "Time-Resolved Fluorescence Of Proteins." Annual Review Of Biochemistry **54**: 43-71.
- Beissinger, R. L. and E. F. Leonard (1982). "Sorption kinetics of binary protein solutions: general approach to multicomponent systems." Journal of Colloid and Interface Science **85**(2): 521-533.
- Bernal, J. D. (1958). "Discuss." Faraday Soc. **25**: 7.

- Bilsel, O., L. Yang, et al. (1999). "Time-resolved fluorescence anisotropy study of the refolding reaction of the alpha-subunit of tryptophan synthase reveals nonmonotonic behavior of the rotational correlation time." Biochemistry **38**(13): 4177-4187.
- Bodanszky, A. and M. Bodanszky (1970). "Sepharose-avidin column for the binding of biotin or biotin containing peptides." Experientia **26**: 327.
- Boumza, F., P. Déjardin, et al. (1992). "Fibrinogen adsorption on pyrex glass tubes: a continuous kinetic study." Biophysical Chemistry **42**(1): 87-92.
- Bowen, B. D., S. Levine, et al. (1976). "Fine particle deposition in laminar flow through parallel-plate and cylindrical channels." Journal of Colloid and Interface Science **54**(3): 375-390.
- Brakenhoff, G., P. Blom, et al. (1979). "Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lens." Journal of Microscopy **117**: 219-232.
- Brakenhoff, G., H. T. M. van der Voort, et al. (1985). "Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy." Nature **317**: 748-749.
- Brochon, J. (1994). Maximum entropy method of data analysis in time-resolved spectroscopy. Methods enzymology. **240**: 262-311.
- Buijs, J. and V. Hlady (1997). "Adsorption kinetics, conformation, and mobility of the growth hormone and lysozyme on solid surfaces, studied with TIRF." Journal Of Colloid And Interface Science **190**(1): 171-181.
- Buijs, J., W. Norde, et al. (1996). "Changes in the secondary structure of adsorbed IgG and F(ab') studied by FTIR spectroscopy." Langmuir **12**: 1605-1613.
- Burstein, E. A., N. S. Vendenkina, et al. (1973). "Fluorescence and localisation of tryptophan residues in protein molecules." Photochemistry and Photobiology **18**: 263-279.
- Buschmann, V., K. D. Weston, et al. (2003). "Spectroscopic Study and Evaluation of Red-Absorbing Fluorescent Dyes." Bioconjugate Chemistry **14**(1): 195-204.

C

- Callis, P. R. and J. T. Vivian (2003). "Understanding the variable fluorescence quantum yield of tryptophan in proteins using QM-MM simulations. Quenching by charge transfer to the peptide backbone." Chemical Physics Letters **369**(3-4): 409-414.
- Cantor, C. R. and P. R. Schimmel (1980). Techniques for study of biological structure and function. San Francisco, W. H. Freeman and Company.
- Cantor, C. R. and T. Tao (1971). Procedures in Nucleic Acid Research. New York, Harper & Row.
- Casey, K. G. and E. L. Quitevis (1988). "Effect of solvent polarity on nonradiative processes in xanthene dyes: Rhodamine B in normal alcohols." Journal of Physical Chemistry **92**(23): 6590 - 6594.

- Cha, W. N. and R. L. Beissinger (1996). "Macromolecular mass transport to a surface: Effects of shear rate, pH, and ionic strength." Journal Of Colloid And Interface Science **177**(2): 666-674.
- Chan, R. and V. Chen (2004). "Characterization of protein fouling on membranes: opportunities and challenges." Journal of Membrane Science **242**(1-2): 169-188.
- Chang, D.-K., S.-F. Cheng, et al. (1999). "Biophysical characterization of the structure of the amino-terminal region of gp41 of HIV-1." Journal of Biological Chemistry **274**(9): 5299-5309.
- Chu, Y.-H., W. J. Lees, et al. (1994). "Using affinity capillary electrophoresis to determine binding stoichiometries of protein-ligand interaction." Biochemistry **33**(35): 10616-10621.
- Claesson, P. M., E. Blomberg, et al. (1995). "Protein interactions at solid surfaces." Advances in Colloid and Interface Science **57**: 161-227.
- Claesson, P. M., E. Poptoshev, et al. (2005). "Polyelectrolyte-mediated surface interactions." Advances in Colloid and Interface Science **in press**.
- Clerc, D. and W. Lukosz (1997). "Real-time analysis of avidin adsorption with an integrated-optical output grating coupler: Adsorption kinetics and optical anisotropy of adsorbed monomolecular layers." Biosensors & Bioelectronics **12**(3): 185-194.
- Cockle, S. A. and A. G. Szabo (1981). "Time-Resolved Fluorescence-Spectra Of Tryptophan In Monomeric Glucagon." Photochemistry And Photobiology **34**(1): 23-27.
- Cogswell, C. J., C. J. R. Shepard, et al. (1990). "A method for evaluating microscope objectives to optimized performance of confocal systems." Journal of Microscopy **158**: 177-186.
- Crank, J. (1975). The mathematics of diffusion. New York, Oxford university press.
- Cross, A. J., D. H. Waldeck, et al. (1983). "Time Resolved Polarization Spectroscopy - Level Kinetics And Rotational Diffusion." Journal Of Chemical Physics **78**(11): 6455-6467.
- Cundall, R. B. and R. E. Dale (1983). Time-resolved fluorescence spectroscopy in biochemistry and biology. New-York, Plenum press.

D

- De Lange, R. J. and T. S. Huang (1971). "Egg white avidin III. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit." Journal of Biological Chemistry **246**(3): 698-709.
- Déjardin, P., M. T. Le, et al. (1994). "Adsorption rate in the convection-diffusion model." Langmuir **10**: 3898-3901.
- Dejardin, P. and E. N. Vasina (2004). "An accurate simplified data treatment for the initial adsorption kinetics in conditions of laminar convection in a slit: application to protein adsorption." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **33**(2): 121-127.

- Diaspro, A. and M. Robello (2000). "Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **55**(1): 1-8.
- Dong, W. J., M. Chandra, et al. (1997). "Conformation of the N-terminal segment of a monocysteine mutant of troponin I from cardiac muscle." Biochemistry **36**(22): 6745-6753.
- Donghao, R. L. and K. Park (1991). "Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen." Journal of Colloid and Interface Science **144**(1): 271-281.
- Donovan, J. W. and K. D. Ross (1973). "Increase in the stability of avidin produced by binding of biotin." Biochemistry **12**(3): 512-517.
- Du, H., R.-C. A. Fuh, et al. (1998). "PhotochemCAD: A Computer-Aided Design and Research Tool in Photochemistry." Photochemistry and Photobiology **68**(2): 141-142.
- Durbin, J. and G. S. Watson (1950). "Testing for serial correction in least squares regression." Biometrika **37**: 409.

E

- Eaton, D. F. (1990). "Recommended methods for fluorescence decay analysis." Pure & Applied Chemistry **62**(8): 1631-1648.
- Einstein, A. (1906). "Zur Theorie der Brownschen Bewegung." Annalen der Physik **19**: 371.
- Ervin, J., J. Sabelko, et al. (2000). "Submicrosecond real-time fluorescence sampling: application to protein folding." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **54**(1): 1-15.
- Ethève, J. and P. Déjardin (2002). "Adsorption kinetics of lysozyme on silica at pH 7.4: correlation between streaming potential and absorbed amount." Langmuir **18**(5): 1777-1785.

F

- Feinstein, E., G. Deikus, et al. (2003). "Constrained Analysis of Fluorescence Anisotropy Decay: Application to Experimental Protein Dynamics." Biophysical Journal **84**(1): 599-611.
- Feng, L. and J. D. Andrade (1994). "Protein adsorption on low-temperature isotropic carbon: I. Protein conformational change probed by differential scanning calorimetry." J. Biomed. Mater. Res.: 735-743.
- Flom, S. and J. Flendler (1988). "Global analysis of fluorescence depolarization experiments." Journal of Physical Chemistry **92**: 5908-5913.
- Fraenkel-Conrat, H., N. S. Snell, et al. (1952). "Avidin, I. Isolation and characterization of the protein and nucleic acid." Arch. Biochem. Biophys. **92**: 80-96.

Fushimi, K. and A. Verkman (1991). "Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry." Journal of Cellular Biology **112**(4): 719-725.

G

Gavilan, E., T. Doussineau, et al. (2005). "One-pot synthesis of fluorescent porous aluminosilicate nanoparticles." Comptes Rendus Chimie **8** (in press).

Gonzalez, M., C. E. Argarana, et al. (1999). "Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding." Biomolecular Engineering **16**(1-4): 67-72.

Govindjee, M. van de Ven, et al. (1990). "Chlorophyll a fluorescence lifetime distributions in open and closed photosystem II reaction center preparations." Biochimica Biophysica Acta **1015**(2): 173-179.

Gratton, E. and M. J. VandeVen (1995). Laser sources for confocal microscopy. Handbook of biological confocal microscopy. J. B. Pawley, Plenum: 69-90.

Gray, J. J. (2004). "The interaction of proteins with solid surfaces." Current Opinion in Structural Biology **14**: 110-115.

Green, M. (1963). "Reaction between avidin and biotin." Biochemical Journal **89**: 599-609.

Green, M. (1963). "Stability at extremes of pH and dissociation into sub-units by guanidine hypochloride." Biochemical Journal **89**: 609-620.

Green, M. and E. J. Toms (1972). "The dissociation of avidin-biotin Complexes by guanidinium chloride." Biochemical Journal **130**: 707-711.

Green, N. M. and M. D. Melamed (1963). "Avidin.2. purification and composition." Biochemical Journal **89**: 591-599.

Grinvald, A. and I. Steinberg (1974). "On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares." Analytical Biochemistry **59**: 583-598.

Grinvald, A. and I. Z. Steinberg (1976). "Fluorescence Decay Of Tryptophan Residues In Native And Denatured Proteins." Biochimica Et Biophysica Acta **427**(2): 663-678.

Gross, L. A., G. S. Baird, et al. (2000). "The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral." PNAS **97**(22): 11990-11995.

Gruber, H. J., C. D. Hahn, et al. (2000). "Anomalous Fluorescence Enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus Anomalous Fluorescence Loss of Cy5 and Cy7 upon Covalent Linking to IgG and Noncovalent Binding to Avidin." Bioconjugate Chemistry **11**(5): 696 -704.

Gruber, H. J., G. Kada, et al. (1998). "Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophore conjugates in complex, colored biofluids." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1381**(2): 203-212.

Gruber, H. J., M. Marek, et al. (1997). "Biotin-Fluorophore Conjugates with Poly(ethylene glycol) Spacers Retain Intense Fluorescence after Binding to Avidin and Streptavidin." Bioconjugate Chemistry **8**(4): 552 -559.

Gudgin, E., R. Lopezdelgado, et al. (1981). "The Tryptophan Fluorescence Lifetime Puzzle - A Study Of Decay Times In Aqueous-Solution As A Function Of Ph And Buffer Composition." Canadian Journal Of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie **59**(7): 1037-1044.

H

Haugland, R. P. (2002). Handbook of fluorescent probes and research products, Molecular probes.

Haustein, E. and P. Schwille (2004). "Single-molecule spectroscopic methods." Current Opinion in Structural Biology **14**(5): 531-540.

Haynes, C. A. and W. Norde (1994). "Globular proteins at solid/liquid interfaces." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **2**(6): 517-566.

Hazan, G., E. Haas, et al. (1976). "Fluorescence Decay Of Human-Serum Albumin And Its Subfractions." Biochimica Et Biophysica Acta **434**(1): 144-153.

Heikal, A. A., S. T. Hess, et al. (2000). "Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: Coral red (dsRed) and yellow (Citrine)." PNAS **97**(22): 11996-12001.

Heikal, A. A., S. T. Hess, et al. (2001). "Multiphoton molecular spectroscopy and excited-state dynamics of enhanced green fluorescent protein (EGFP): acid-base specificity." Chemical Physics **274**(1): 37-55.

Heitz, F. and N. Van Mau (2002). "Protein structural changes induced by their uptake at interfaces." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology **1597**(1): 1-11.

Hell, S. W. and E. H. Stelzer (1995). Lens aberrations in confocal fluorescence microscopy. Handbook of biological confocal microscopy. J. B. Pawley, Plenum: 347-354.

Hinrichsen, E. L., J. Feder, et al. (1986). "Geometry of random sequential adsorption." J. Stat.Phys. **44**(793).

Hlady, V. and J. Buijs (1996). "Protein adsorption on solid surfaces." Current Opinion in Biotechnology **7**(1): 72.

Hofmeister, F. (1888). "Zur Lehre von der Wirkung der Salze." Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. **24**: 247-260.

Hornett, T. A. and J. L. Brash (1995). Proteins at interface, II. Fundamentals and Applications. Washington D.C.

Horton, R. H., L. A. Moran, et al. (1994). Principes de Biochimie, Deboeck université.

- Hovius, R., P. Vallotton, et al. (2000). "Fluorescence techniques: shedding light on ligand-receptor interactions." Trends in Pharmacological Sciences **21**(7): 266-273.
- Hu, D. and H. P. Lu (2003). "Single-Molecule Nanosecond Anisotropy Dynamics of Tethered Protein Motions." Journal of Physical Chemistry B **107**(2): 618 -626.
- Huang, Z., D. Ji, et al. (2005). "Fluorescence intensity and lifetime fluctuations of single Cy5 molecules immobilized on the glass surface." Colloids and Surfaces A **257-258**: 203-209.
- Hübner, C. G., A. Renn, et al. (2001). "Direct observation of the triplet lifetime quenching of single dye molecules by molecular oxygen." Journal of Chemical Physics **115**(21): 9619-9622.

J

- Janot, J. M., A. Beeby, et al. (1991). "The time resolved fluorescence and anisotropy of subtilisins BPN' and Carlsberg." Biophysical Chemistry **41**: 277-287.
- Johnson, C. A., Y. Yuan, et al. (2000). "Adsorbed layer of ferritin at solid and fluid interface studied by atomic force microscopy." Journal of Colloid and Interface Science **233**: 260-272.

K

- Kada, G., H. Falk, et al. (1999). "Accurate measurement of avidin and streptavidin in crude biofluids with a new, optimized biotin-fluorescein conjugate." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1427**(1): 33-43.
- Kada, G., K. Kaiser, et al. (1999). "Rapid estimation of avidin and streptavidin by fluorescence quenching or fluorescence polarization." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1427**(1): 44-48.
- Kim, D. T., H. W. Blanch, et al. (2002). "Direct imaging of lysozyme adsorption onto mica by atomic force microscopy." Langmuir **18**: 5841-5850.
- Klonis, N., M. Rug, et al. (2002). "Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics." European Biophysics Journal **31**(1): 36-51.
- Kondo, A., S. Oku, et al. (1993). "Conformational changes in protein molecules upon adsorption on ultrafine particles." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **1**(3): 197.
- Konev, S. V. (1967). Fluorescence and phosphorescence of proteins and nucleic acids. New York, S. Udenfriend Plenum Press.
- Krichevsky, O. and g. Bonnet (2002). "Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications." Reports on Progress in Physics **65**: 251.
- Kurzban, G. P., G. Giltin, et al. (1989). "Shielding of tryptophan residues of avidin by the binding of biotin." Biochemistry **28**: 8537-8542.

L

- Laitinen, O. H., A. T. Marttila, et al. (2001). "Biotin Induces Tetramerization of a Recombinant Monomeric Avidin. A model for protein-protein interactions." Journal of Biological Chemistry **276**(11): 8219-8224.
- Lakowicz, J. R. (1983). quenching of Fluorescence. Principe of Fluorescence. P. P. New-York.
- Larsericdotter, H., S. Oscarsson, et al. (2001). "Thermodynamic analysis of proteins adsorbed on silica particle: electrostatic effect." Journal of Colloid and Interface Science **237**(1): 98-103.
- Lee, H. G. and E. Fritsche (2003). "Determination of biotin on a protein by quantitative sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of monomeric avidin." Journal of Chromatography A **994**(1-2): 213-219.
- Lensum, L., T. A. Smith, et al. (2002). "Partial denaturation of silica-absorbed bovine serum Albumine determined by time resolved evanescent wave-induced fluorescence spectroscopy." Langmuir **18**(25): 9924-9931.
- Lévêque, M. (1928). Les lois de transmission de la chaleur par convection. Paris, Faculté des sciences.
- Liedberg, B., B. Ivarsson, et al. (1986). "On the adsorption of [beta]-lactoglobulin on hydrophilic gold surfaces: Studies by infrared reflection-absorption spectroscopy and ellipsometry." Journal of Colloid and Interface Science **114**(2): 386.
- Linden, T., A. Ljunglöf, et al. (1999). "Visualizing two-component protein diffusion in porous adsorbents by confocal scanning laser microscopy." Biotechnology and Bioengineering **65**(6): 622 - 630.
- Linderstrom-Lang (1952). Proteins and Enzymes. Standfort university, California: Press Standfort.
- Linderstrom-Lang, K. U. (1924). "C.R." Trav. Lab. Calsberg **15**: 70.
- Lippincott-Schwartz, J. and G. H. Patterson (2003). "Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells." Science **300**: 87-91.
- Livesey, A. K. and J. Brochon (1987). "Analysing the distribution of decay constants in pulse-fluorimetry using the maximum entropy method." Biophysical Journal **52**: 693-706.
- Livnah, O., E. Bayer, et al. (1993). "Three-Dimensional Structures of Avidin and the Avidinbiotin Complex." PNAS **90**(11): 5076-5080.
- Ljunglöf, A. and Hjorth (1996). "Confocal microscopy as a tool for studying protein adsorption to chromatographic matrices." Journal of Chromatography A **743**: 75-83.
- Ljunglöf, A. and J. Thommes (1998). "Visualising intraparticle protein transport in porous adsorbents by confocal microscopy." Journal of Chromatography A **813**: 387-395.

- Löfroth, J.-E. (1985). "Deconvolution of single photon counting data with a reference method and global analysis." European Biophysics Journal **13**: 45-58.
- Lu, D. R. and K. Park (1991). "Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen." Journal of Colloid and Interface Science **144**(1): 271.
- Ludescher, R. D., J. J. Volwerk, et al. (1985). "Complex Photophysics Of The Single Tryptophan Of Porcine Pancreatic Phospholipase-A-2, Its Zymogen, And An Enzyme Micelle Complex." Biochemistry **24**(25): 7240-7249.
- Lundström, I. and H. Elwing (1990). "Simple kinetic models for proteins adsorbed on polymer surface." Journal of colloid and Interface Science **136**(1): 68-84.

M

- Malmsten, M. (1998). "Formation of Adsorbed Protein Layers." Journal of Colloid and Interface Science **207**(2): 186.
- Malmsten, M., B. Lassen, et al. (1996). "Effects of Hydrophilization and Immobilization on the Interfacial Behavior of Immunoglobulins." Journal of Colloid and Interface Science **177**(1): 70-78.
- Malmsten, M., B. Lassen, et al. (1996). "Adsorption of complement protein C3 at polymer surfaces." Journal Of Colloid And Interface Science **179**(1): 163-172.
- Marek, M., K. Kaiser, et al. (1997). "Biotin-Pyrene Conjugates with Poly(ethylene glycol) Spacers Are Convenient Fluorescent Probes for Avidin and Streptavidin." Bioconjugate Chemistry **8**(4): 560 -56.
- Marmé, N., J.-P. Knemeyer, et al. (2003). "Inter- and Intramolecular Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan." Bioconjugate Chemistry **14**(6): 1133 -1139.
- Marquardt, D. W. (1963). "An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters." J. Soc.Ind. Appl. Math **11**: 431.
- Marttila, A. T., V. P. Hytönen, et al. (2003). "Mutation of the important Tyr-33 residue of chicken avidin: functional and structural consequences." biochemical journal **369**: 249-254.
- Maruyama, T., S. Katoh, et al. (2001). "FT-IR analysis of BSA fouled on ultrafiltration and microfiltration membranes." Journal of Membrane Science **192**(1-2): 201.
- Maste, M. C. L., W. Norde, et al. (1997). "Adsorption-Induced Conformational Changes in the Serine Proteinase Savinase: A Tryptophan Fluorescence and Circular Dichroism Study." Journal of Colloid and Interface Science **196**(2): 224.
- Mei, G., L. Pugliese, et al. (1994). "Biotin and Biotin Analogues Specifically Modify the Fluorescence Decay of Avidin." Journal of Molecular Biology **242**(4): 559-565.
- Mészáros, R., L. Thompson, et al. (2002). "Adsorption and Electrokinetic Properties of Polyethylenimine on Silica Surfaces." Langmuir **18**(16): 6164 -6169.

- Millar, D. P. (1996). "Time-resolved fluorescence spectroscopy." Biophysical Methods: 637-642.
- Minsky, M. (1957). microscopy apparatus. US patent. **3013467**.
- Minsky, M. (1988). "Memoir on inventing the confocal scanning microscope." scanning **10**: 128-138.
- Moog, R. S., M. D. Ediger, et al. (1982). "Viscosity dependence of the rotational reorientation of rhodamine B in mono and polyalcohols. Picosecond transient grating experiments." Journal of Physical Chemistry **86**: 4694-4700.

N

- Nakanishi, K., T. Sakiyama, et al. (2001). "On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon." Journal of Bioscience and Bioengineering **91**(3): 233-244.
- Netz, R. R. and D. Andelman (2003). "Neutral and charged polymers at interfaces." Physics Reports **380**(1-2): 1-95.
- Norde, W. and J. Lyklema (1979). "Thermodynamics of protein adsorption. Theory with special reference to the adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at polystyrene surfaces." Journal of Colloid and Interface Science **71**: 350.
- Nordlund, H. R., V. P. Hytönen, et al. (2003). "Introduction of histidine residues into avidin subunit interfaces allows pH-dependent regulation of quaternary structure and biotin binding." FEBS Letters **555**(3): 449-454.

O

- O'connors, D. V. and D. Phillips (1984). Time correlated single photon counting. New-york.
- Oriel-Corporation (1994). Getting light into Monochromator. Oriel. USA. **2**: 2-10.

P

- Panchuk-Voloshina, N., R. P. Haugland, et al. (1999). "Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates." The Journal of Histochemistry & Cytochemistry **47**(9): 1179-1188.
- Pauling, L. (1960). The Nature of the Chemical Bond. NY.
- Petrich, J. W., M. C. Chang, et al. (1983). "On The Origin Of Non-Exponential Fluorescence Decay In Tryptophan And Its Derivatives." Journal Of The American Chemical Society **105**(12): 3824-3832.
- Powe, A. M., K. A. Fletcher, et al. (2004). "Molecular fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectroscopy." Analytica Chemistry **76**: 4614-4634.

Pugliese, L., A. Coda, et al. Three-dimensional structure of tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution. 1AVD, RCSB PDB (protein data bank).

Pugliese, L., A. Coda, et al. (1993). "Three-dimensional Structure of the Tetragonal Crystal Form of Egg-white Avidin in its functional Complex with Biotin at 2.7 Å Resolution." Journal of Molecular Biology **231**(3): 698-710.

Q

Quiquampoix, H., S. Staunton, et al. (1993). "Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **75**: 85-93.

Qureshi, M. H. and S.-L. Wong (2002). "Design, production, and characterization of a monomeric streptavidin and its application for affinity purification of biotinylated proteins." Protein Expression and Purification **25**(3): 409-415.

R

Rachofsky, E. L., B. Wolf, et al. (1999). "A General Method for Constrained Analysis of Fluorescence Anisotropy Decay: Application of the Steady-State Anisotropy." Journal of Fluorescence **9**(4): 379-390.

Rosano, C., P. Arosio, et al. (1999). "The X-ray three-dimensional structure of avidin." Biomolecular Engineering **16**(1-4): 5-12.

Ross, J. B. A., K. W. Rousslang, et al. (1981). "Time-Resolved Fluorescence And Anisotropy Decay Of The Tryptophan In Adrenocorticotropin-(1-24)." Biochemistry **20**(15): 4361-4369.

Ross, S. E., S. D. Carson, et al. (1986). "Effects of detergents on avidin-biotin interaction." Biotechniques **4**(4): 350_354.

Rusinova, E., V. Tretyachenko-Ladokhina, et al. (2002). "Alexa and Oregon Green dyes as fluorescence anisotropy probes for measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions." Analytical Biochemistry **308**(1): 18-25.

Ruskstuhhl, T. and S. Seeger (2004). "Attoliter detection volumes by confocal total-internal-reflection fluorescence microscopy." Optics Letters **29**(6): 569-571.

S

Savage, M. D., G. Mattson, et al. (1992). Avidin-Biotin chemistry: a Handbook.

Schaaf, P. and J. Talbot (1989). "Surface exclusion effects in adsorption processes." Journal of Chemical physics **91**(7): 4401.

- Schray, K. J., P. G. Artz, et al. (1988). "Determination of avidin and biotin by fluorescence polarisation." Analytica Chemistry **60**: 853-855.
- Sebastianov, V. I., Z. M. Belomestniai, et al. (1983). "In vivo assessment of the hemocompatible properties of polymers." Artificial Organs **7**(1): 126-133.
- Slim, M. and H. F. Sleiman (2004). "Ruthenium(II)-Phenanthroline-Biotin Complexes: Synthesis and Luminescence Enhancement upon Binding to Avidin." Bioconjugate Chemistry **15**(5): 949 - 953.
- Soderquist, M. E. and A. G. Walton (1980). "Structural changes in protein adsorbed on polymer surfaces." Journal of Colloid and Interface Science **75**(2): 386-397.
- Song, X. and B. I. Swanson (2001). "Rapid assay for avidin and biotin based on fluorescence quenching." Analytica Chimica Acta **442**(1): 79-87.
- Spaeth, K., A. Brecht, et al. (1997). "Studies on the Biotin Avidin Multilayer Adsorption by Spectroscopic Ellipsometry." Journal of Colloid and Interface Science **196**(2): 128-135.
- Stephens, D. J. and V. J. Allan (2003). "Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging." Science **300**: 82-86.
- Stokes, G. G. (1852). "On the change of refrangibility of light." Phil. Trans. R. Soc. London **142**: 463-562.
- Su, T. J., J. R. Lu, et al. (1998). "Application of Small Angle Neutron Scattering to the in Situ Study of Protein Fouling on Ceramic Membranes." Langmuir **14**(19): 5517 -5520.
- Szabo, A. (1984). "Theory Of Fluorescence Depolarization In Macromolecules And Membranes." Journal Of Chemical Physics **81**(1): 150-167.
- Szabo, A. G. and D. M. Rayner (1980). "Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution." Journal of the American Chemical Society **102**: 554-563.

T

- Talbot, J., X. Jin, et al. (1994). "New equation for multicomponents adsorption kinetics." Langmuir **10**: 1663-1666.
- Tan, X., D. Hu, et al. (2004). "Probing nanosecond protein motions of calmodulin by single-molecule fluorescence anisotropy." Applied Physics Letters **85**(12): 2420-2422.
- Tandford, C. and J. Wiley (1961). Physical chemistry of macromolecules. New York, John Wiley and sons.
- Tie, Y., C. Calonder, et al. (2003). "Protein adsorption: Kinetics and history dependence." Journal of Colloid and Interface Science **268**: 1-11.
- Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." Annual Review Biochemistry **67**: 509-544.

V

- Vaiana, A. C., H. Neuweiler, et al. (2003). "Fluorescence Quenching of Dyes by Tryptophan: Interactions at Atomic Detail from Combination of Experiment and Computer Simulation." Journal of the American Chemical Society **125**(47): 14564-14572.
- Valette, P., M. Thomas, et al. (1999). "Adsorption of low molecular weight proteins to hemodialysis membrane: experimental results and simulation." Biomaterials **20**: 1621-1634.
- Valeur, B. (1993). Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters. Molecular Luminescence Spectroscopy. J. W. Sons. **77**: 25-84.
- Valeur, B. and G. Weber (1977). "Resolution Of Fluorescence Excitation Spectrum Of Indole Into 1la And 1lh Excitation Bands." Photochemistry And Photobiology **25**(5): 441-444.
- van Oss, C. J. (1993). Forces interfaciales en milieux aqueux. Paris, masson.
- Vasina, E. and P. Déjardin (2004). "Adsorption of α -Chymotrypsin onto mica in laminar flow condition. Adsorption kinetics constant as a function of Tris Buffer concentration at pH 8,6." Langmuir **20**: 8699-8706.
- Vermette, P., T. Gengenbacha, et al. (2003). "Immobilization and surface characterization of NeutrAvidin biotin-binding protein on different hydrogel interlayers." Journal of Colloid and Interface Science **259**(1): 13-26.
- von Smoluchowski, M. (1917). "Z. physik." Chemie **92**: 129.

W

- Wahl, p. (1979). "Analysis of fluorescence anisotropy decays by a least squares methods." Biophysical Chemistry **10**: 91-104.
- Watt, R. M. and E. W. Voss (1977). "Mechanism of quenching of fluorescein by anti-fluorescein IgG antibodies." Immunochemistry **14**: 533-541.
- Wertz, C. F. and M. M. Santore (2002). "Adsorption and reorientation kinetics of lysozyme on hydrophobic surfaces." Langmuir **18**(4): 1190-1199.
- White, J. G. and W. B. Amos (1987). "Confocal microscopy comes of age." Nature **328**: 183-184.
- Wiedenmann, J., S. Ivanchenko, et al. (2004). "EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion." PNAS **101**(45): 15905-15910.
- Wilbur, D. S., P. M. Pathare, et al. (2000). "Evaluation of Biotin-Dye Conjugates for Use in an HPLC Assay To Assess Relative Binding of Biotin Derivatives with Avidin and Streptavidin." Bioconjugate Chemistry **11**(4): 584-598.
- Wilcheck, M. and E. A. Bayer (1990). Avidin-Biotin technology, Academic press.

Wojtaskczyk, P. (1995). "Propriétés statistiques d'ensemble de particules adsorbées sur une surface solide."

Wolley, D. W. and L. G. Longworth (1942). "Isolation of an antibiotin factor from egg white." Journal of Biological Chemistry **142**: 285-290.

Wu, H., Y. Fan, et al. (1993). "Introduction of changes in the secondary structure of globular proteins by a hydrophobic surface." European biophysics journal **22**: 201-205.

Y

Yamamoto, Y. and J. Tanaka (1972). "Polarized Absorption-Spectra Of Crystals Of Indole And Its Related Compounds." Bulletin Of The Chemical Society Of Japan **45**(5): 1362-&.

Yoon, H. C., M.-Y. Hong, et al. (2001). "Reversible Association/Dissociation Reaction of Avidin on the Dendrimer Monolayer Functionalized with a Biotin Analogue for a Regenerable Affinity-Sensing Surface." Langmuir **17**(4): 1234 -1239.

RESUME

La compréhension des phénomènes d'adsorption des protéines aux interfaces solides liquides est un élément clé dans la conception et l'utilisation de membranes artificielles et de matériaux biocompatibles. Devant la complexité des phénomènes, les études fondamentales et leurs modélisations revêtent une importance stratégique. Les techniques de fluorescence et de polarisation de fluorescence résolues dans le temps permettent à de très faible concentration d'obtenir des informations tant sur l'environnement direct que sur le mouvement d'une molécule émettrice. Par ailleurs, les techniques de fluorescence confocales rendent possibles quant à elles la visualisation d'un volume parfaitement localisé de l'ordre du femtolitre.

La fluorescence intrinsèque des protéines ou le marquage direct par un chromophore ne rendent pas toujours compte simplement du mouvements des protéines. De ce fait, Nous avons synthétisé une sonde fluorescente composée de biotine éthylènediamine et d'alexa fluor 594. Ce marquage permet d'obtenir un temps de corrélation unique τ de 32 ns, compatible à celui attendu pour une protéine de géométrie sphérique de masse molaire de 66 KDa. Durant ce travail de thèse, nous avons développé un dispositif optique innovant permettant d'effectuer des études d'adsorption sous flux par des mesures de fluorescence et de polarisation de fluorescence résolues dans le temps en mode confocal. Le dispositif mise au point permet d'obtenir une résolution spatiale de 1,2 μm soit un volume de l'ordre du femtolitre qu'il est possible de déplacer dans une cuve d'épaisseur de 230 μm . En fluorescence dynamique, les valeurs de temps de corrélation et de durée de vie de fluorescence obtenue sont similaires avec ceux obtenus en mesure de fluorescence classique.

Enfin, nous avons suivi la cinétique d'adsorption et l'évolution des profils de concentration de l'avidine lors du processus d'adsorption sur une surface modèle (mica) et sur une membrane d'hémodialyse (AN-69).

TITLE : confocal fluorescence dynamic spectroscopy : realization of optical device and application to studies of the proteins adsorption to the liquid-solid interfaces

ABSTRACT

The comprehension of the phenomena of adsorption of proteins to the solid-liquid interfaces is a key element in the design and the use of artificial membranes and biocompatible materials. In front of the complexity of the phenomena, the fundamental studies and their modelization have a strategic importance. The techniques of time resolved fluorescence and polarization of fluorescence permit at weak concentration to obtain information both the direct environment and the movement of a fluorescent molecule. In addition, the confocal fluorescence techniques make possible as for them the visualization of a volume of the order of the femtolitre and perfectly localised.

We developed an innovating optical device allowing to carry out studies of adsorption under flow by measurements of time resolved fluorescence and polarization of fluorescence in confocal mode.

The intrinsic fluorescence of proteins or direct labeling by fluorophore was not a simple system to study the movements of proteins. The solution was to carry out a marking of the avidine by using its strong affinity for the biotin. We synthesized a fluorescent probe composed of biotin ethylenediamine and alexa fluorine 594. This probe forms a very stable complex with the avidin.

Finally, we observed the evolution of the profile of concentration during the phenomenon of adsorption. We observed the kinetics of adsorption and the impact over the fluorescence lifetime and the correlation time of the avidine adsorbed on a model surface (mica) and on a hemodialysis membrane (AN-69).

DISCIPLINE : Chimie-Physique

MOTS-CLES

Fluorescence résolue dans le temps, spectroscopie confocale, avidine, biotine, adsorption, interfaces solide/liquide

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Institut Européen des Membranes

Université Montpellier 2, place E. Bataillon cc 047 34090 Montpellier