



HAL
open science

Développement de nouvelles technologies pour le suivi en temps réel du comportement des chromosomes

Houssam Hajjoul

► **To cite this version:**

Houssam Hajjoul. Développement de nouvelles technologies pour le suivi en temps réel du comportement des chromosomes. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2010. Français. NNT: . tel-00566464

HAL Id: tel-00566464

<https://theses.hal.science/tel-00566464>

Submitted on 16 Feb 2011

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Discipline ou spécialité : *Conception des circuits microélectroniques et
Microsystèmes*

Présentée et soutenue par *Houssam Hajjoul*
Le 6 décembre 2010

Titre :

*Développement de nouvelles technologies pour le suivi en temps réel du
comportement des chromosomes*

JURY

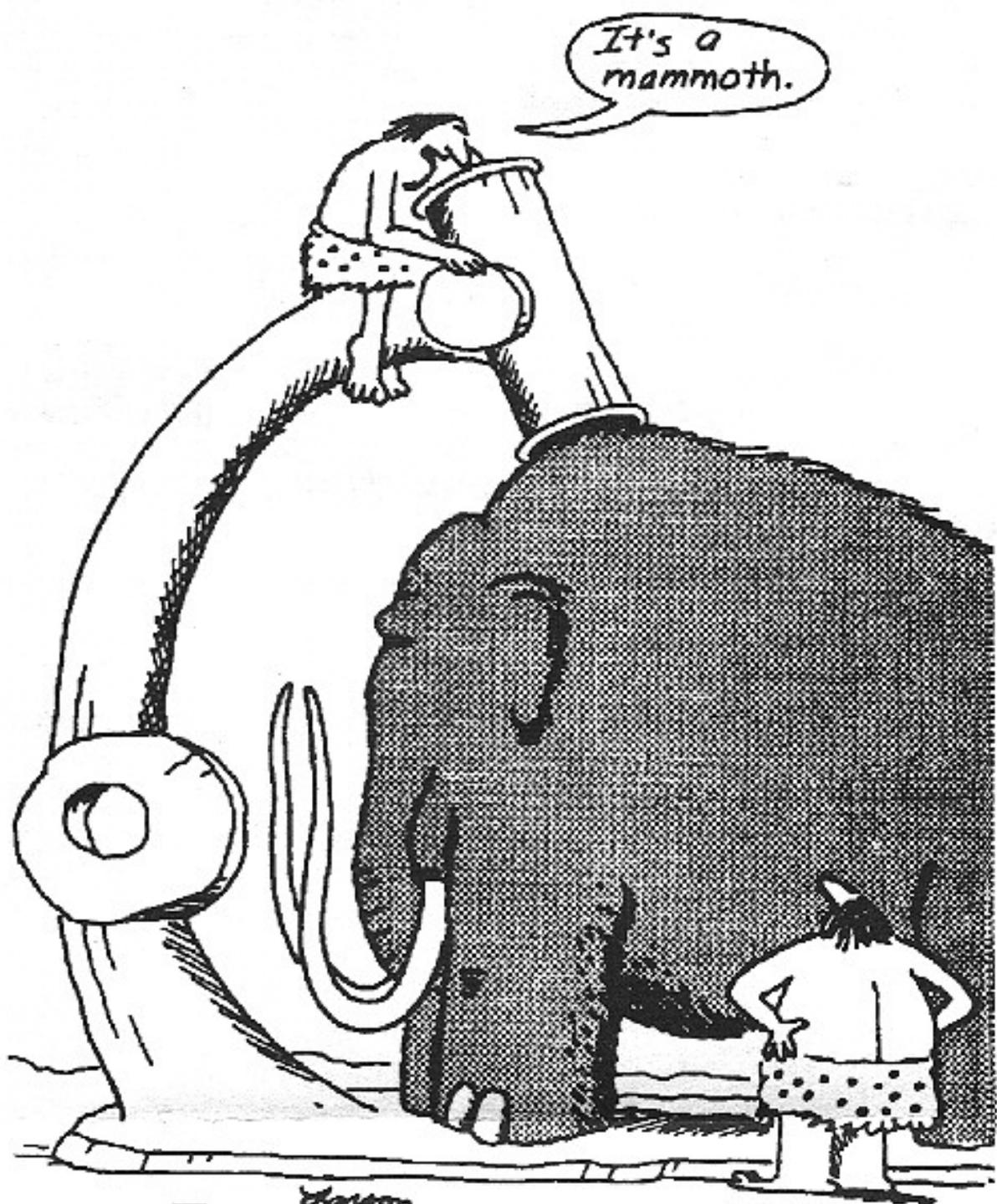
*Pr Rosaria Ferrigno,
Dr Emmanuelle Fabre,
Pr Gerard Louis,
Pr Alain Cazarré,
Dr Sébastien Huet,
Pr Kerstin Bystricy,*

*Rapportrice
Rapportrice
Examineur
Examineur
Examineur
Membre invitée*

Ecole doctorale : *GEET*

Unité de recherche : *LAAS-CNRS*

Directeur(s) de Thèse : *Dr Antoine Marty et Dr Aurélien Bancaud*



Jones

Early Microscope

On vous a dit aussi que la vie est obscurité, et dans votre lassitude vous répétez ce que disent les las.

Et je vous dis que la vie est en effet obscure sauf là où il y a élan,

Et tout élan est aveugle sauf là où il y a la connaissance.

Et toute connaissance est vaine sauf là où il y a le travail,

Et tout travail est futile sauf là où il y a l'amour ;

Et quand vous travaillez avec amour vous attachez votre être à votre être, et vous aux autres, et vous à Dieu.

Et que veut dire travailler avec amour ?

C'est tisser une étoffe avec un fil tiré de votre cœur, comme si votre bien-aimé devait porter cette étoffe.

C'est bâtir une maison avec affection, comme si votre bien-aimé devait résider dans cette maison.

C'est semer le grain avec tendresse, et récolter la moisson dans la joie, comme si votre bien-aimé devait en manger le fruit.

C'est insuffler dans toutes les choses que vous fabriquez l'essence de votre esprit.

Et savoir que tous les morts vénérables se tiennent près de vous et regardent.

Gibran Khalil Gibran

« Le prophète »

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du CNRS (LAAS-CNRS) à Toulouse, dans le groupe *Nano Ingénierie et Intégration des Systèmes* (N2IS). Je tiens à exprimer ma gratitude à monsieur Raja Chatila, directeur du laboratoire, et ainsi à monsieur Jean-Yves Fourniols, responsable du groupe N2IS, pour m'avoir accueilli au sein de ce prestigieux laboratoire.

Je remercie tout particulièrement Aurélien Bancaud qui a dirigé cette thèse, une personne aux qualités immenses, grâce à qui cette « grande aventure » a été des plus agréables à vivre. Il m'a aidé de faire certains choix tout au long de cette thèse et ses idées ont été pour moi de véritables atouts pour approfondir mes connaissances.

Je tiens à remercier également Kerstin Bystricky et Olivier Gadal pour m'avoir initié à la biologie moléculaire et à manipuler des levures.

Un grand merci à Antoine Marty qui a été toujours disponible pour le suivi de mon travail et pour son encouragement.

Mes sincères remerciements s'adressent au jury de ma thèse en commençant par les rapportrices Pr Rosaria Ferrigno et Dr Emmanuelle Fabre, pour la rapidité avec laquelle elles ont lu le manuscrit, ainsi aux autres membres, Pr Gerard Louis, le président du jury, et les examinateurs Pr Alain Cazarré et Dr Sébastien Huet. Leurs remarques m'ont apporté de nouvelles idées très enrichissantes.

Je souhaite maintenant remercier le service TEAM de la salle blanche du LAAS pour leurs solutions faces aux problèmes technologiques rencontrés.

Un immense merci ira à Julien avec ses analyses rapides, à Yannick et Qihao pour leur bonne humeur et les bons moments passés ensemble.

Une pensée vers tout le groupe microfluidique (Pierre, Alaa, Vincent...), et pour les nouveaux qui prennent le relais (Sébastien, Hubert, Ayse, Ana...). Egalement des pensées à Jean-Marie, à mes anciens et nouveaux collègues du bureau (Stéphane, Guillaume...) et à mes amis.

Je n'oublie pas de remercier toutes les personnes qui m'ont aidé au LBME (Isabelle Imen, Silvia, Benjamin, Christophe...). Au quotidien, je dois remercier Carmen pour son encouragement et ses ondes positives qui m'ont aidé à aboutir ce travail.

Il m'est bien sùre impossible de terminer ces remerciements sans avoir une pensée à ma famille qui n'a pas été concrètement avec moi mais qui n'a jamais été absente. Merci à vous mes parents pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui et à toi mon frère Hassan d'avoir été à côté de moi à ma soutenance.

أهلي وعائلي إني فخور بكم ، من القلب أشكركم.

Enfin à tous les gens qui m'ont aidé et à ma Twingo, je leur dis merci.

Dédicace

A ma famille.

A tous ceux qui me sont chers.

إهداء خاص الى أهلي الأعزاء.

Résumé :

L'organisation à grande échelle des chromosomes à l'intérieur du noyau des cellules est complexe et reste encore mal comprise. Durant ma thèse, nous avons exploité les ressources technologiques du LAAS pour développer et optimiser une nouvelle méthode de visualisation en 3D rapide - à l'échelle de la dizaine de millisecondes - avec une résolution spatiale de ~20 nanomètres. Cette méthode est fondée sur la fabrication de micromiroirs en forme de V par gravure humide du silicium, et sur l'analyse d'images avec les techniques de stéréovision qui permettent de recombinaison des vues collectées sous différents angles dans un environnement 3D. Ces micromiroirs ont ensuite été intégrés dans un laboratoire sur puce, et plusieurs versions de la technologie ont été proposées afin d'améliorer leurs propriétés. Nous avons démontré que cette technologie est adaptée pour le suivi des mouvements des chromosomes dans les cellules vivantes, que nous avons pu retracer avec les meilleures cadences de la littérature. Ces résultats nous ont ensuite permis d'explorer les mécanismes physiques à l'origine des fluctuations spatiales des chromosomes, et de montrer que les modèles de physique des polymères génériques peuvent être utilisés pour extraire des informations quantitatives décrivant l'organisation et la dynamique spatiale du génome.

Mots clés :

Micromiroirs, laboratoire sur puce, levure, dynamique de la chromatine, polymère.

Table des matières

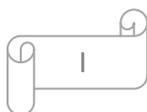
Tables des matières	I
Avant propos	1

Chapitre I: Introduction

I.1. Quelques éléments sur les laboratoires sur puce	4
I.1.1. De 1950 à 1990, la naissance du concept	4
I.1.2. Intérêts des laboratoires sur puce	6
I.1.3. Application des laboratoires sur puce	6
I.1.4. Nouvelles applications pour le cancer	8
I.1.5. Technologies de laboratoire sur puce déjà commercialisées.....	9
I.2. Systèmes optiques de visualisation en 3D pour la biologie.....	11
I.2.1. Positionnement de notre projet : le laboratoire dédié à la microscopie en 3D....	11
I.2.2. La microscopie confocale.....	12
I.2.3. Techniques innovantes en 3D.....	14
I.3. Quelques mots sur nos performances	17

Chapitre II: Laboratoire sur puce pour la visualisation 3D

II.1. Introduction.....	20
II.2. Microfabrication sur silicium.....	21
II.2.1. Photolithographie	21
II.2.2. Gravure	22
II.2.3. Évaporation de métaux.....	24
II.2.4. Lithographie douce avec le PDMS	25
II.3. Technologie du laboratoire sur puce	27
II.3.1. Etapes de fabrication	28
II.4. Principe de la reconstruction 3D.....	32
II.4.1. Introduction	32
II.4.2. Stéréovision dans notre laboratoire sur puce	33
II.5. Validation du principe d'imagerie 3D.....	37
II.6. Application du laboratoire sur puce à la biologie	38
II.6.1. Observation du noyau de cellules eucaryotes.....	38
II.7. Optimisation des performances optiques du système	39
II.7.1. Introduction	39
II.7.2. Substrat en silicium.....	39
II.7.3. Choix du métal	41
II.7.4. Choix de l'ouverture numérique de l'objectif.....	43
II.8. Limitations des miroirs en V.....	46
II.8.1. Introduction	46
II.8.2. Protocole de fabrication des micro-miroirs à une facette	47
II.8.3. Précision de pointé	51



II.8.4. Comparaison avec les miroirs en V	52
II.9. Conclusion	55

Chapitre III: Optimisations des conditions d'imagerie

III.1. Introduction.....	67
III.2. La microscopie de fluorescence	68
III.2.1. Historique.....	68
III.3. Notions sur la physique de la fluorescence	69
III.4. Composants du microscope à fluorescence.....	70
III.4.1. Principe des cubes dichroïques.....	70
III.5. Microscopes optiques à fluorescence.....	71
III.6. Optimisation des conditions d'imagerie pour le suivi de particules.....	72
III.6.1. Limite de résolution pour une particule unique.....	74
III.6.1.a. Approche de Thompson	74
III.6.1.b. Approche d'Ober	74
III.6.2. Source de lumière	75
III.6.3. Obturateur mécanique	76
III.6.4. Filtres.....	76
III.6.5. Ouverture numérique et le grossissement.....	77
III.6.6. Caméra EMCCD	78
III.6.7. "Binning"	79
III.6.8. Taille du pixel	81
III.6.9. Logiciel Andor.....	81
III.7. Evaluation des performances en imagerie 2D	81
III.8. Conclusion	82

Chapitre IV: Dynamique de la chromatine

IV.1. Introduction	85
IV.2. Quelques rappels sur la chromatine	86
IV.2.1. Introduction	86
IV.2.2. Le nucléosome, premier niveau d'organisation de la chromatine.....	87
IV.2.3. Fibre de 30 nm (niveau d'organisation supérieur)	89
IV.2.4. Fibre de 30 nm in vivo.....	91
IV.3. Organisation nucléaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
IV.3.1. Existence des compartiments hétéro- et eu-chromatiniens	92
IV.3.2. Organisation des chromosomes	93
IV.4. Description de notre méthode expérimentale	95
IV.4.1. La culture cellulaire	95
IV.4.2. Marquage d'un site chromosomique	95
IV.4.3. Déplacement quadratique moyen.....	97
IV.4.4. Méthodes de fixation des levures.....	100
IV.4.5. 2D versus 3D	105
IV.5. Dynamique de la chromatine.....	107
IV.6. Etat de l'art concernant la diffusion des chromosomes.....	108
IV.6.1. Résultats indiquant une diffusion libre confinée.....	108



IV.7. Enjeu de notre travail.....	111
IV.7.1. Sites chromosomiques étudiés.....	111
IV.7.2. Etude basée sur la dynamique des polymères.....	113
IV.7.3. Interprétation des résultats.....	114
IV.7.4. Chromosome XIV (longueur 785 kb).....	114
IV.7.5. Chromosome VI (longueur 270 kb).....	116
IV.7.6. Chromosome IV (longueur 1531 kb).....	116
IV.7.7. Chromosome III (longueur 315 kb).....	114
IV.8. Premiers éléments quantitatifs	119
IV.9. Conclusion.....	122

Conclusion générale et perspective

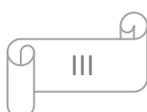
Conclusion générale et perspective	125
--	-----

Annexe

Annexe A	130
Annexe B.....	132

Références

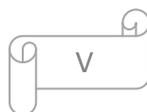
Références	139
------------------	-----



Liste des abréviations

2D	Deux Dimensions
3C	"Chromatin Conformation Capture"
4C	"Circular 3C"
3D	Trois Dimensions
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomique
APS	persulfate d'ammonium
CCD	"Charge-Coupled Device"
EMCCD	"Electron Multiplying Charge-Coupled Devices"
Cent	Centromère
Chr	Chromosome
CMOS	"Complementary Metal Oxide Semiconductor"
ConA	"Concanavalin A"
CVD	"Chemical Vapor Deposition"
LPCVD	"Low Pressure Chemical Vapor Deposition"
D	coefficient de diffusion
PECVD	"Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition"
EDI	eau désionisée
FCS	"Fluorescence Correlation Spectroscopy"
FRAP	"Fluorescence Recovery After Bleaching"
GFP	"Green Fluorescent Protein"
EGFP	"Enhanced GFP"
LacI	"Lactose Repressor"

LacO	"Lactose Operator"
Lp	"Persistence Length"
MEMS	"Micro-Electro-Mechanical Systems"
MPC	"Microfluidic Purification Chip"
MSD	Distance quadratique moyenne
NA	Ouverture numérique
NE	Enveloppe Nucléaire
PALM	"Photo-Activated Localization Microscopy"
PCR	réaction en chaîne par polymérisation
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEI	Polyétylènimine
PMMA	Poly Methyl Methacrylate
PSF	tâche de diffraction
RFP	"Red Fluorescent Protein"
RIE	"Reactive Ion Etching"
Si ₃ N ₄	Nitride du Silicium
SiO ₂	Oxyde de Silicium
SNR	rapport signal/bruit
SPB	"Spindle Pole Body"
SPT	"Single particle tracking"
STORM	"Stochastic optical reconstruction microscopy"
Tel	Téломère
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TetO	"Tetracycline Operator "



TetR	"Tetracycline Repressor"
YNB	"Yeast Nitrogen Base"
YPAD	"Yeast Peptone Adenine Dextrose"
α	exposant de diffusion anormale
λ	longueur d'onde

Avant propos

Ce mémoire est le résultat de trois années de recherche dans des domaines multidisciplinaires qui m'ont permis de me familiariser avec la technologie de fabrication des microsystèmes, la microscopie, l'analyse d'images et la biophysique de la chromatine. Ce travail est le fruit de nombreuses collaborations aussi enrichissantes les unes que les autres.

Au cours de cette thèse, nous avons développé et optimisé une nouvelle technologie pour la microscopie en 3D, que nous avons validée avec des particules fluorescentes puis avec des cellules vivantes, en particulier la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons constaté pendant notre travail que les questions concernant les mouvements des chromosomes dans la levure étaient encore mal comprises, et nous avons tenté d'exploiter nos technologies pour apporter des éclairages à ces problèmes de biologie. Notre travail est rédigé selon quatre chapitres à la fois indépendants et très complémentaires, qui illustrent la multi-disciplinarité de notre approche.

Le chapitre I présente une introduction générale sur les laboratoires sur puces qui permettent de diagnostiquer et de surveiller les maladies. Ils sont promis à un avenir certain, car ils sont peu coûteux à fabriquer, et semblent atteindre une grande sensibilité en des temps rapides. Ils sont utilisés pour détecter les bactéries, les virus, pour analyser les échantillons de sang, mimer les fonctions de certains organes, et détecter la contamination des aliments et/ou de l'eau. Ces systèmes peuvent devenir omniprésents et conduire à une médecine personnalisée domiciliée (test de grossesse, test de glucose...). A la suite de ce constat, nous présenterons comment nous nous sommes inspirés de ces technologies pour concevoir un microdispositif d'observation 3D.

Le chapitre II est divisé en deux sous parties. Nous donnons d'abord une introduction générale sur certaines techniques de microfabrication du silicium. Nous montrons ensuite comment nous avons exploité ces technologies pour la réalisation de notre laboratoire sur puce fondé sur des micromiroirs. Dans un deuxième temps, nous nous consacrons à l'optimisation du dispositif afin d'atteindre de bonnes performances en microscopie 3D.

Le chapitre III décrit des outils et des méthodes d'instrumentation optique, sur lesquels nous avons réalisé un travail d'optimisation afin d'augmenter la cadence d'acquisition en microscopie à fluorescence tout en gardant un très bon rapport signal/bruit pour l'imagerie de la levure.

Le chapitre IV est une réalisation concrète de biophysique, car nous avons tiré parti de tous nos développements pour nous attaquer à l'étude de mouvements de la chromatine dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Après une introduction sur les problèmes de biologie et sur les méthodologies de marquage des chromosomes, nous nous sommes intéressés à la dynamique d'une dizaine de sites marqués en fluorescence sur une large gamme temporelle allant de 20 ms à 20 s pour analyser les paramètres physiques de la chromatine *in vivo*. Ce travail, qui est encore en cours, est analysé avec des modèles de physique, ce qui nous permet de boucler de manière cohérente notre travail à la frontière entre technologie-biologie-physique.

Chapitre I



Introduction

I.1. Quelques éléments sur les laboratoires sur puce

I.1.1. De 1950 à 1990, la naissance du concept

Le départ de la révolution technologique fondée sur les systèmes issus de la microélectronique est souvent situé au cours des années 1950, et marqué par l'invention de la technologie planaire [1]. Depuis, les techniques de microfabrication n'ont jamais cessé de s'améliorer pour donner naissance à des composants électroniques de plus en plus performants et de plus en plus miniaturisés, comme en atteste très clairement la loi de Moore, qui prédit un doublement des capacités de calculs des ordinateurs tous les 18 mois. Cet effort de miniaturisation s'est appuyé sur un matériau central, le silicium [2-3], qui demeure incontournable pour ses propriétés semiconductrices et l'excellente qualité de son oxyde. Les technologies de la microélectronique permettent la fabrication de milliers d'objets miniaturisés par des procédés parallélisés (autrement dit collectifs), qui rendent les coûts de fabrication minimaux. Ainsi, l'activité humaine économique du monde occidental s'appuie sur les efforts d'une recherche de 50 ans sur la miniaturisation et l'intégration de composants sur silicium, qui a permis d'obtenir tous les outils de calculs et de communications de notre quotidien (Figure I.1).

De la microélectronique a découlé le concept de microsystèmes dans les années 1980 à l'Université de Berkeley [4]. Un microsystème intègre différentes fonctions de type capteur et/ou actionneur sur une puce unique, et s'est vu baptisé MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems) en anglais. Ces MEMS sont aujourd'hui embarqués dans les appareils de notre vie courante, et le plus grand succès industriel est certainement l'accéléromètre ADXL50, commercialisé en 1993 par Analog Devices, qui consistait en un capteur capacitif accompagné de son électronique de contrôle intégrés de manière monolithique sur un substrat de 10 mm^2 [5]. En effet, les accéléromètres sont présents dans les voitures modernes (actionneurs d'airbag) [6-7], les chaussures Nike (pédometre intégrée), les jeux consoles Sony Playstation (mesure de l'inclinaison du joystick), dans les systèmes GPS [8-9], les têtes d'imprimantes [10-11], et les micromiroirs des projecteurs vidéo [12]. De nombreux secteurs sont aujourd'hui

concernés, comme les optiques et radios haute fréquence pour télécommunications (interrupteurs, capacités variables et inductances) [13].



Figure I. 1: Le concept de laboratoire sur puce est apparu en parallèle avec l'évolution vers une forte miniaturisation des systèmes informatiques.

Pour un fonctionnement abouti, un laboratoire sur puce doit comprendre de nombreuses fonctions telles que des pompes, vannes, mélangeurs pour le volet d'actionnement des fluides biologiques, et des capteurs avec leur électronique de lecture associée. Par conséquent, il peut être considéré comme un microsystème complexe dont les composants sont mécaniques, électroniques, chimiques et un réseau microfluidique des microcanaux. L'objectif est ensuite d'automatiser ces fonctions multiples sur une seule puce de sorte qu'aucune intervention humaine ne soit nécessaire.

I.1.2. Intérêts des laboratoires sur puce

Les laboratoires sur puce présentent, de manière intrinsèque, des caractéristiques très pertinentes pour les analyses chimiques et biochimiques.

Du fait de la miniaturisation, ces dispositifs nécessitent d'abord de petits volumes d'échantillons et donc de consommables liquides pour les réactions chimiques, qui peuvent être rares, coûteux et/ou polluants. De même, ces dispositifs sont susceptibles de réduire la production des déchets.

La réduction en échelle des volumes de fluide se traduit par un rapport plus favorable entre surface et volume, de sorte qu'une couche sensible de détection se caractérise par un meilleur rendement de capture. Ces différences de rapport surface/volume s'accompagnent également d'une meilleure dissipation de la chaleur, qui peut être intéressante pour la manipulation des fluides par champ électrique (électrophorèse).

Les lois de comportement des fluides aux échelles de la microfluidique sont très bien décrites, dominées par les forces de friction visqueuse. Ce caractère prédictif permet d'envisager des outils de conception optimaux pour remplir des fonctions d'analyse, à l'image des outils de conception rationnels utilisés pour l'avionique qui ont été imaginés par les ingénieurs de l'aéronautique.

L'utilisation des méthodes de fabrication fortement parallélisées issues de la micro-électronique devrait permettre une importante réduction des coûts, qui, couplée avec la conception de systèmes miniaturisés et portables, pourrait donner naissance à des technologies très largement distribuées dans notre environnement.

I.1.3. Application des laboratoires sur puce

Ces attraits ont suscité un vif intérêt dans la communauté, et des laboratoires sur puce sont aujourd'hui développés pour l'étude de la majorité des molécules et macromolécules biologiques : ADN [14-15], protéines et peptides [16-17], cellules

[18-19], anticorps et antigènes [20-21], et sucres [22]. Les applications visées en recherche et développement sont le diagnostic clinique (grippe aviaire [23], cancer [24]), surtout en «point de service». Des laboratoires sur puce ont été utilisés pour la cristallisation des protéines à l'échelle de Nano [25] ou pour mesurer la concentration des essais biologiques [26]. On voit même des systèmes microfluidiques pour produire des biocarburants à partir de glucose et d'oxygène en se basant sur des flux laminaires et des enzymes biologiques [27].

Notons que les techniques de surveillance biomédicale en point de service sont aussi généralisées à la sécurité sanitaire des aliments et l'analyse chimique environnementale pour contrôler la qualité de la nourriture ou la pollution de l'eau [28]. À cet égard, un effort de recherche est mené pour la génération de réacteurs chimiques [29-30] visant des performances supérieures à celles des réacteurs macroscopiques traditionnels (Figure I. 2).

Un autre domaine de recherche actif concerne les techniques miniaturisées pour la recherche pharmaceutique car elles permettent de réaliser des criblages parallélisés haut débit pour la découverte de médicaments [31].



Figure I. 2: Concept de réacteur chimique intégré sur une puce microfluidique capable de remplir des fonctions d'une usine pétrochimique.

Les laboratoires sur puce réalisés dans les laboratoires de recherche ont démontré des performances tout à fait spectaculaires à la fois en termes de sensibilité, mais aussi de cinétique. Les rapports surface/volume favorables aux petites échelles ont par exemple permis de démontrer qu'un immuno-essai pouvait être réalisé en moins de 20

minutes tandis que plus de 24 heures sont nécessaires dans des conditions classiques [32]. La réaction en chaîne par polymérisation (PCR), qui consiste en une vingtaine d'étapes thermiques successives à trois différents paliers dure environ une heure avec les machines standards, elle peut être hautement parallélisée grâce à la microfluidique en gouttes digitales, ce qui diminue considérablement les temps d'analyse par échantillon [33]. Quelques revues complètes sur l'utilisation des systèmes microfluidiques en biologie et chimie ont été proposées [34-35].

I.1.4. Nouvelles applications pour le cancer

Sur le volet de la sensibilité de détection, une équipe de l'Université de Yale a mis au point une technique d'analyse de sang simple, précise et rapide, capable de repérer plusieurs biomarqueurs du cancer du sein ou de la prostate (Figure I. 3) en utilisant une puce électronique et des nanofils comme détecteurs [36]. Leur puce détecte en moins de vingt minutes la présence des antigènes à partir d'un échantillon de 10 microlitres de sang obtenu sans aucune préparation, et avec une sensibilité très élevée permettant de repérer des concentrations de marqueurs très faibles (ng/ml).

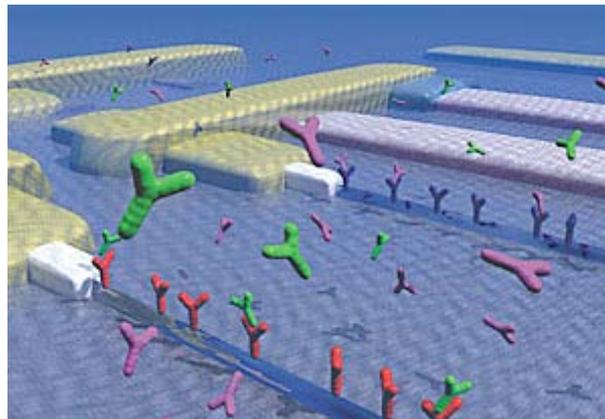


Figure I. 3: Principe des capteurs ultra-sensibles à partir de nanofils de silicium. Les molécules à isoler sont présentes dans la solution qui circule au-dessus de la puce électronique, et s'accrochent spécifiquement via une liaison antigène/anticorps. [42]

Une autre puce intéressante a été développée à Harvard Medicine School pour la détection de cellules tumorales circulant dans le sang [37]. Cette technologie

microfluidique est fondée sur des réseaux de micro-piliers recouverts d'anticorps spécifiques pour la capture de cellules tumorales, et elle a démontré une très forte sensibilité de détection (99,1%) à partir d'un petit échantillon de sang entier. Sur le même principe, un laboratoire sur puce pour détecter et analyser les cellules tumorales dans des micro-biopsies de patients atteints de leucémie a été mis au point par l'équipe de Jean-Louis Viovy [38].

I.1.5. Technologies de laboratoire sur puce déjà commercialisées

Il existe deux domaines dans lesquels les laboratoires sur puce ont démontré tout leur potentiel commercial. D'une part, les technologies microfluidiques ont été appliquées pour la réalisation de puces génomiques ou transcriptomiques, qui visent à détecter la présence d'une séquence d'ADN ou d'ARN cible dans un mélange complexe (Agilent 2100 Bioanalyzer). Le succès de ces approches est aujourd'hui adapté pour la détection de protéines, en concevant des systèmes comprenant les opérations d'extraction des cellules, la séparation des protéines, la digestion et l'analyse par un spectromètre de masse [39-41].

D'autre part, le dosage de la glycémie chez les diabétiques est un exemple de système en « point de service » très répandu. Il s'agit en effet de systèmes portables dans lesquels une goutte de sang est déposée puis manipulée par le système lui-même, et analysée selon une détection ampérométrique afin de déterminer une concentration en glucose. La concentration à mesurer est de l'ordre du milli-molaire, ce qui correspond à une gamme accessible par de nombreuses technologies, et qui a donc pu être rapidement mis en œuvre sans grande difficulté. Ces dispositifs sont maintenant perfectionnés pour donner accès à de nombreuses données physiologiques (Figure I. 4), en conservant le même principe de fonctionnement. On imagine donc avec ce type de technologies développer une médecine personnalisée sur puce capable de diagnostiquer si un écoulement nasal est symptomatique d'un rhume ou de la grippe H1N1 [42].

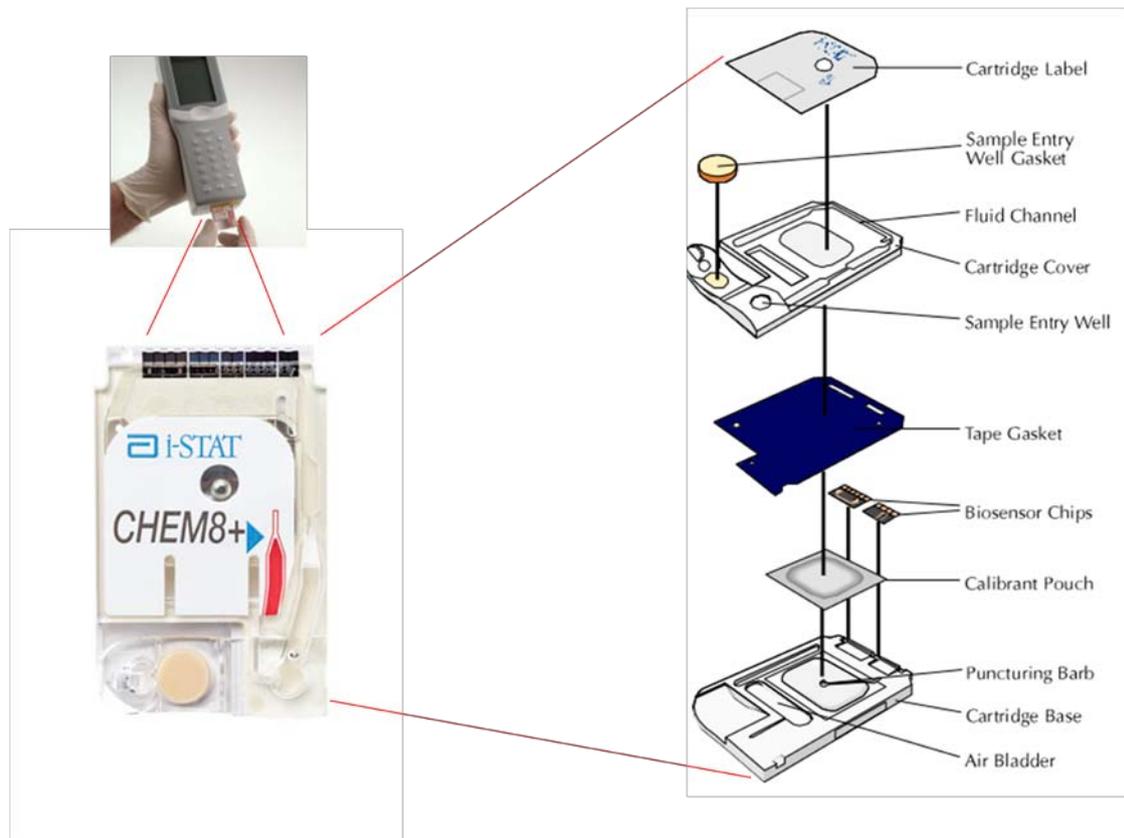


Figure I. 4: Version récente d'un laboratoire sur puce multi-sensoriel, capable de mesurer à partir d'une goutte de sang le Sodium, Potassium, Glucose, Calcium, Hématocrites, SO₂, pH et autres paramètres [43].

Les tests sanguins portables pour la détection rapide du VIH sont aussi un domaine de recherche très actif [44]. On peut ainsi noter que UC Davis health system a récemment proposé un laboratoire sur puce pour le dépistage fondé sur des canalisations microfluidiques recouvertes d'anticorps pour capturer les globules blancs touchés par le VIH, puis détecter les types et les niveaux de protéines inflammatoires (cytokines) libérées par ces cellules.

Mentionnons enfin qu'une part non négligeable des financements de recherche sur les laboratoires sur puce provient des fonds alloués à la lutte contre le bioterrorisme. On voit par exemple apparaître des systèmes de détection du gaz sarin dans le sang [45].

On voit maintenant des laboratoires sur puce qui imitent les cellules des reins pour étudier l'efficacité des médicaments [46], d'autres qui imitent les maladies du cœur [47] et regardent les réponses des artères à différents médicaments. Sera-t-il

possible d'imiter les fonctions de tout le corps être humain sur un laboratoire sur puce? Il s'agit en tout cas d'une perspective intéressante pour remplacer les modèles animaux dans les tests pharmacologiques.

I.2. Systèmes optiques de visualisation en 3D pour la biologie

I.2.1. Positionnement de notre projet : le laboratoire dédié à la microscopie en 3D

Jusqu'à présent, nous avons détaillé le fonctionnement de laboratoires sur puce microfluidiques fondés sur des techniques de fabrication plus ou moins complexes et dédiés à des analyses chimiques, biochimiques et médicales. Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé un nouveau type de laboratoire sur puce, combinant l'optique et les technologies de microfabrication du silicium, optimisé pour l'observation en 3D avec une grande rapidité d'acquisition des transactions biologiques dans la cellule. La microscopie optique permet de collecter des informations sur un échantillon cible projetées dans le plan focal d'observation. Cette projection en 2 dimensions est pénalisante lorsque l'on souhaite étudier des cellules, qui sont par définition des objets complexes en 3 dimensions. Aussi, le développement de techniques de microscopie résolutive dans les 3 dimensions de l'espace est un enjeu ancien en microscopie, qui fait toujours l'objet de développements méthodologiques. Dans la suite, et afin de positionner scientifiquement notre travail, nous proposons un inventaire non exhaustif de techniques anciennes ou récentes de microscopies 3D. Nous nous intéresserons en particulier aux performances et aux limitations de chaque technologie, et nous tenterons ensuite d'imiter ou de dépasser ces caractéristiques avec une optimisation rigoureuse de notre laboratoire sur puce (voir chapitre II).

I.2.2. La microscopie confocale

Le microscope confocal a été conçu pour éliminer la fluorescence émise hors du plan focal d'observation, et ainsi capter l'image non pas dans toute son épaisseur de l'objet, mais suivant un plan donné. En effet, dans un microscope à fluorescence classique, les zones situées immédiatement au dessus et au dessous sont floues et perturbent l'acquisition, et la microscopie confocale permet de collecter des sections optiques d'au mieux ~ 500 nm.

I.2.2.a. Un peu d'histoire

Tout d'abord, rendons hommage à Marvin Minsky qui proposa en 1957 le concept de base du microscope confocal (Figure I. 5), qui prit tout son essor à partir de 1980 suite au développement des sources laser et aux progrès en instrumentation électronique et informatique.

Dans le dispositif confocal, la lumière d'excitation est focalisée en un point dont les dimensions sont limitées par la diffraction. La fluorescence ainsi émise provient de tous les fluorophores ayant été balayés par le faisceau, en-dessous et au-dessus du plan focal d'observation. Mais la fluorescence issue des régions inférieures et supérieures au plan de focalisation constitue un signal indésirable, qui est éliminé à l'aide d'un petit diaphragme placé devant le photodétecteur. La construction d'une image en deux dimensions (plan X, Y) est réalisée point par point grâce à un balayage du faisceau laser le long de l'échantillon. Une image en 3D est enfin réalisée avec l'acquisition d'une succession de sections optiques suivant l'axe vertical Z.

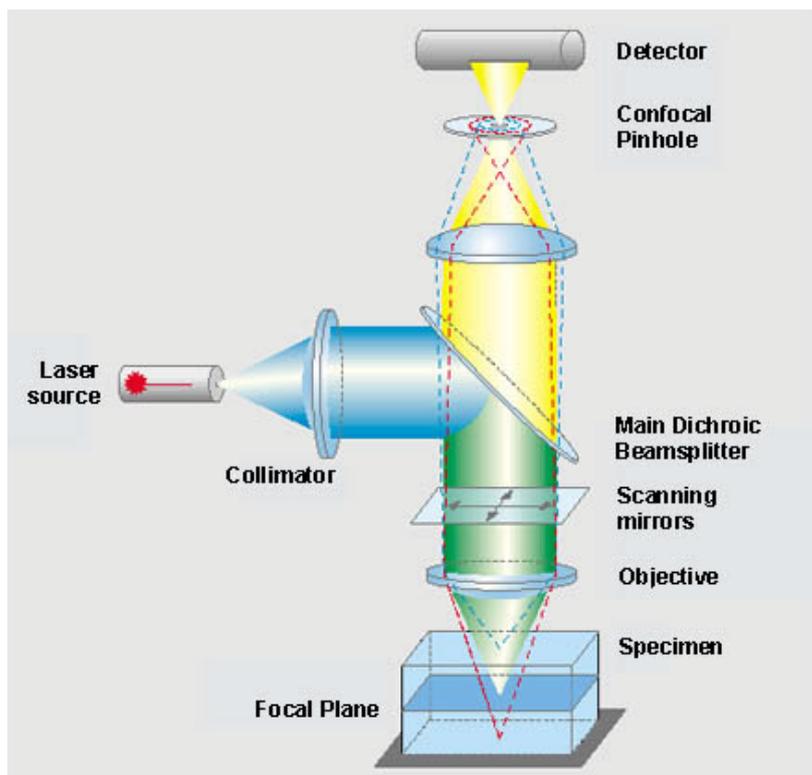


Figure I. 5 : L'excitation des fluorochromes se fait par un laser. Le balayage par le laser se fait point par point suivant l'axe des X et l'axe des Y grâce à des miroirs. Un diaphragme est placé juste à l'entrée du photodétecteur pour ne récupérer que les photons provenant du point illuminé. Les photons de fluorescence sont captés par le photodétecteur pour être amplifiés et transformés en signal électrique dont l'intensité est proportionnelle au nombre de photons reçus.

II.1.1.a Avantages et inconvénients

La technique s'est très vite imposée comme l'outil indispensable en biologie cellulaire des eucaryotes supérieurs en permettant l'observation de structures microscopiques dans des échantillons biologiques transparents épais tels que des cultures cellulaires ou des tranches de tissus [Terasaky 1995].

Le problème majeur de cette technique est la surexposition lumineuse de l'échantillon pour la collection d'une image en 3D, ce qui induit une dégradation rapide des échantillons biologiques vivants (Photoblanchiment, phototoxicité, échauffement...). En outre, la reconstitution d'une image 3D nécessite de réaliser plusieurs vues et une cadence temporelle d'échantillonnage lente, qui peut être réduite à 1 s dans les meilleurs cas dans les levures [48-49], après une optimisation des paramètres d'imagerie.

I.2.3. Techniques innovantes en 3D

Revenons maintenant à un certain nombre d'approches récemment proposées pour effectuer de l'imagerie rapide en 3D moins photo-toxique.

I.2.3.a. Microscopie astigmatique contrôlée

Une solution très élégante pour l'imagerie d'objets ponctuels fluorescents en 3D s'appuie sur l'introduction d'une lentille cylindrique dans le chemin optique d'émission d'un microscope à champ large (Figure I. 6). Cette lentille produit un astigmatisme qui déforme l'image de l'objet de manière plus ou moins marquée suivant la distance au plan focal d'observation. Cette approche a été utilisée pour suivre des particules fluorescentes en 3D [50], plus récemment pour suivre des nano-cristaux photoniques dans des cellules vivantes [9]. Elle a enfin été combinée avec succès aux techniques de super-résolution de type PALM ou STORM pour la visualisation nanoscopique de structures cellulaires [51-52].

Cette technique a pour principale vertu de perdre un minimum de lumière au moment de la collection de la fluorescence. Elle est toutefois fortement limitée en termes de profondeur de champ qui est de l'ordre de 600 nm [51].

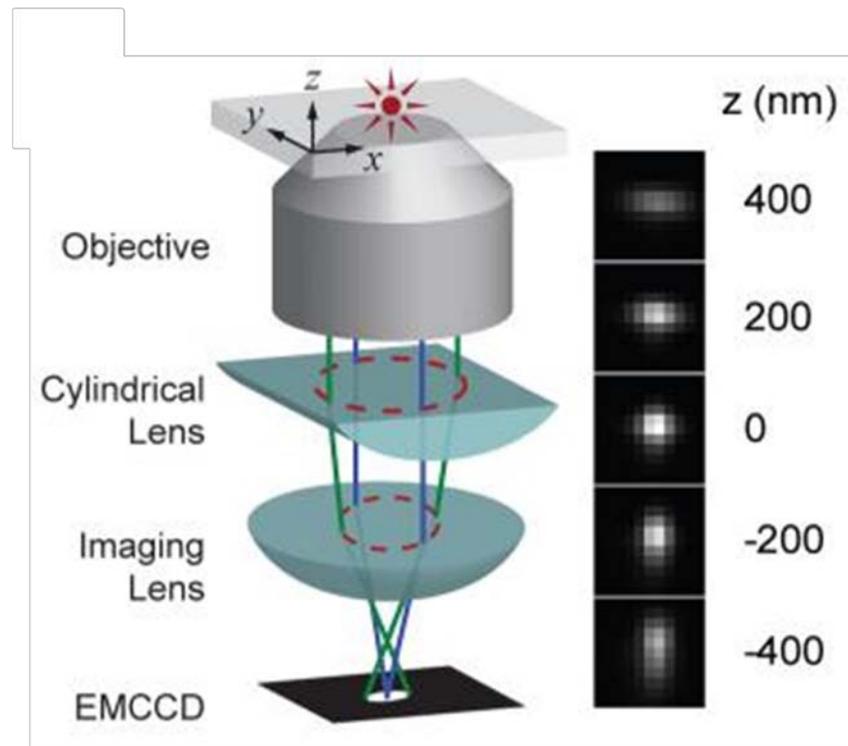


Figure I. 6: Schéma optique de la microscopie astigmatique (issu de [51]). L'ajout d'une lentille cylindrique dans le chemin d'optique d'émission induit une distorsion de l'image directement reliée à la position de l'objet par rapport au plan focal d'observation.

I.2.3.b. Techniques mutliplans et bifocales

Les techniques d'imagerie multiplans et bifocale [53-54] consistent à utiliser un diviseur de faisceau dans un microscope à champ large (Figure I. 7), qui dissocie le faisceau d'émission suivant un trajet optique correctement focalisé et un autre défocalisé, qui sont recombinaés sur une caméra [55], ou deux caméras [56]. La profondeur de champ maximale atteint $\approx 1 \mu\text{m}$, voire même $2,5 \mu\text{m}$ avec des nanocristaux photoniques [56]. La précision de ces méthodes est nanométrique et l'erreur de localisation axiale est trois fois plus grande que dans les directions latérales. Elle présente toutefois un inconvénient majeur lié à la division du faisceau, ce qui implique de collecter deux fois plus de photons pour obtenir deux images résolutes.

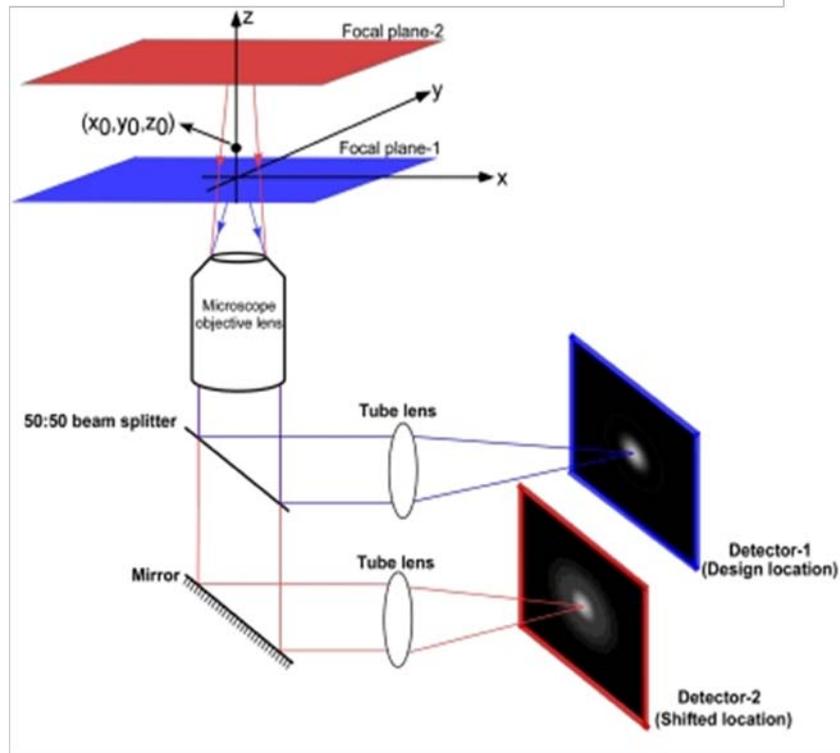


Figure I. 7 : L'approche bifocale est fondée sur l'introduction d'un diviseur de faisceau, qui permet de collecter un signal focalisé et non focalisé vers deux caméras [62].

I.2.3.c. Microscopie à deux photons

Levi et al [57] ont développé une technique de suivi 3D en microscopie de fluorescence par excitation à deux photons. Cette approche est fondée sur un faisceau laser tournant en orbite circulaire autour de la particule cible, ce qui revient à considérablement diminuer la zone de balayage du microscope, et permet ainsi d'accéder à des cadences d'acquisition de ~ 32 ms. L'utilisation d'une source à 2 photons engendre moins de photoblanchiment et de photodégradation pour les cellules vivantes.

Récemment Carlton et al ont reporté une nouvelle plateforme de microscopie dite OMX pour l'imagerie rapide dans des cellules vivantes [58]. Ce système est capable d'enregistrer simultanément quatre longueurs d'ondes avec des temps d'exposition de ~ 10 millisecondes. Cette plateforme a été utilisée pour étudier la viabilité des levures sous un microscope avec des temps d'exposition de 10 ms en 2D, et 10 images en 3D

avec 100 ms par image. En utilisant des intensités d'éclairage comparables, nous avons atteint des cadences d'acquisition ~5 fois plus rapides avec les micromiroirs. Notons en outre que ces auteurs ont montré qu'ils pouvaient minimiser les effets de photodégradation, très critiques en imagerie cellulaires. En outre, OMX peut facilement être appliquée pour l'illumination structurée 3D (3D SIM), PALM et TIRF.

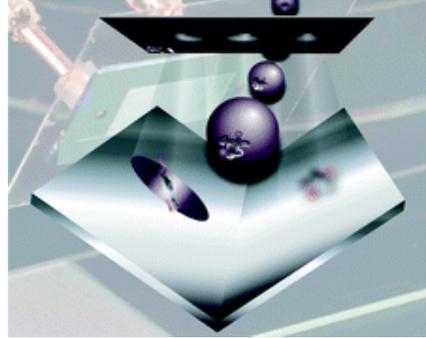
I.3. Quelques mots sur nos performances

Les technologies que nous venons de présenter sont issues du monde de l'optique, et démontrent un fort potentiel pour les applications d'imagerie en biologie cellulaire. Notre approche repose sur les technologies de microfabrication, et n'implique pas de modification du trajet optique dans un microscope. Elle est donc plutôt celle d'un technologue, au sens de la micro-électronique. A noter que d'autres groupes ont développé des techniques fondés sur des miroirs mais sans une application biologique [59-60].

Pour situer d'emblée les performances de notre méthode d'imagerie 3D, mentionnons qu'elle permet atteindre de fortes profondeurs de champ jusqu'à 10 μm , c'est à dire dix fois plus que les techniques optiques, sans aucun calibrage pour les mesures en 3D. Les outils actuels de suivi 3D dans la levure permettent d'atteindre des cadences d'acquisition de 1 s au mieux pour l'acquisition d'un seul [48-49, 61]. Suite à nos améliorations, nous avons sondé la dynamique de la chromatine en 3D à l'échelle de 15 ms (60 fois plus vite que la littérature) avec une erreur de 27 nm.

Dans la partie suivante, nous développons le procédé utilisé pour la fabrication de notre laboratoire sur puce et les optimisations technologiques qui ont été faites pour aboutir à ces résultats.

Chapitre II



Laboratoire sur puce pour la microscopie 3D

II.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous souhaitons donner un bref aperçu sur la microfabrication du silicium, qui est le support de la microélectronique et des microsystèmes. Nous montrerons ensuite comment ces procédés ont été mis en œuvre pour la réalisation de notre laboratoire sur puce pour la visualisation en 3D, dont nous détaillerons le principe de fonctionnement qui est inspiré des méthodes de stéréovision. Nous présenterons enfin notre travail d'optimisation du dispositif.

II.2. Microfabrication sur silicium

Revenons sur les étapes clés qui permettent de réaliser les microsystèmes, avant de montrer comment nous les avons exploitées pour notre travail.

II.2.1. Photolithographie

Si l'on reprend la définition du dictionnaire, la lithographie est un art ancien, qui consiste à dessiner des motifs sur une pierre généralement recouverte d'une substance grasse, puis à transférer les motifs dans la roche par attaque avec un acide. La photolithographie est plus récente. Elle est apparue en même temps que la photographie, qui repose sur le transfert sur un support solide d'une information lumineuse, la scène photographiée. Dans les années 1930, Kodak a présenté une résine photosensible basée sur un polymère soluble (cinnamone de vinyle) avec des groupes secondaires qui sont liés les uns aux autres (réticulés) au cours de l'exposition qui pouvait être appliqué sur une plaque de métal pour former une image lors de l'exposition à la lumière visible. Le matériau a été appelé une résine photosensible. En utilisant un masque noir et blanc sur lequel des motifs à transférer sont réalisés en chrome, on peut écrire un réseau de pistes. Aussi, la photolithographie a été rapidement utilisée pour écrire les motifs des circuits intégrés [62] jusqu'à des dimensions de l'ordre de $1\ \mu\text{m}$ (reliées à la longueur d'onde d'exposition par le critère de Rayleigh).

Notons qu'il existe deux classes de résines (Figure II. 1). Les résines positives deviennent solubles dans un développeur lorsqu'elles sont exposées à une irradiation. Dans ce cas, le masque de photolithographie est transféré de manière exacte dans la résine photosensible. Les résines négatives d'autre part polymérisent à la suite de l'exposition aux UV en la rendant résistante à la solution de révélateur, si bien que le négatif du masque est imprimé dans la résine.

Une fois la photolithographie réalisée, il est nécessaire de transférer les motifs dans le substrat, et plusieurs technologies ont été élaborées dans ce but.

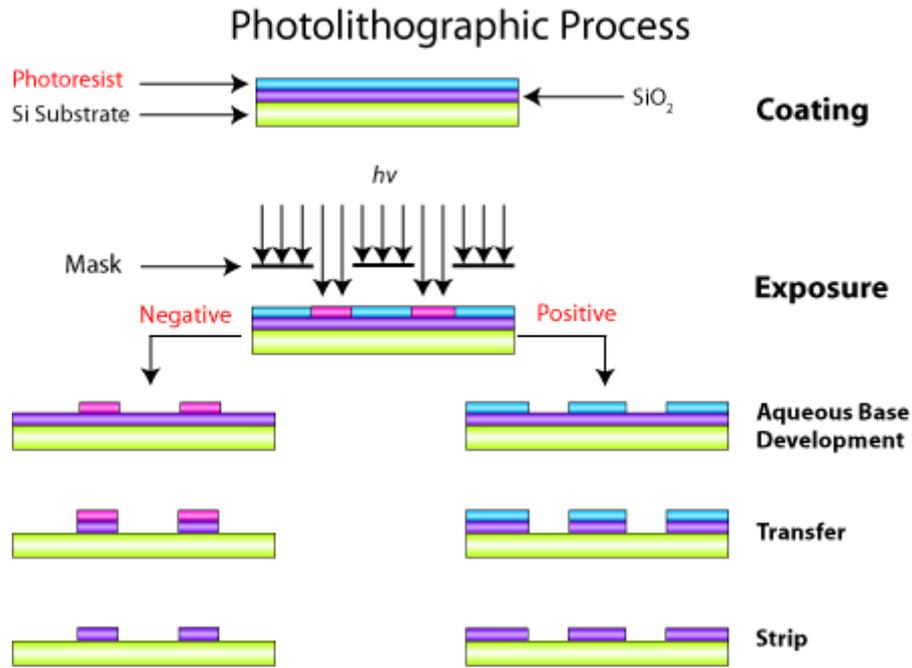


Figure II. 1: Principe de la photolithographie. Les résines sont exposées par rayonnement ultraviolet (UV) à travers un masque qui modifie leur solubilité. Dans le cas d'une résine négative la zone insolée devient moins soluble (couleur mauve). Au contraire, Dans le cas des résines positives, la zone insolée devient plus soluble (couleur verte). Les motifs du masque sont ensuite transférés par gravure dans le substrat.

II.2.2.Gravure

L'étape de gravure est une étape fondamentale du micro-usinage [63-64], qui peut être effectuée soit en solution (gravure humide), soit au moyen d'un plasma (gravure sèche).

II.2.2.a Gravure humide

La gravure humide consiste à graver un matériau par des attaques chimiques en solution. Cette gravure est soit isotrope, c'est-à-dire que la vitesse de gravure est la même dans toutes les directions (Figure II. 2), soit anisotrope (Figure II. 3). Des mélanges de gravure isotrope pour le silicium sont constitués par un mélange d'acide fluorhydrique, acide nitrique et d'éthanol [65], ou pour le verre par l'acide fluorhydrique [66]. La gravure humide isotrope ne permet pas de rendre fidèlement les profils imprimés sur la résine de photolithographie, ce qui limite sévèrement son utilisation.

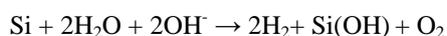


Figure II. 2: Phénomène de sous-gravure lors de la gravure humide isotrope.

Les solutions de gravure anisotrope du silicium les plus connues sont constituées avec l'hydroxyde de potassium (KOH) [67-68], ou le tétraméthyle ammonium hydroxyde (TMAH) [69-70]. La sélectivité de la gravure est déterminée par la direction cristallographique du substrat car certains plans cristallographiques du silicium sont caractérisés par des configurations atomiques en surface défavorables à une réaction de dégradation¹ (Figure II. 3). Par exemple les faces (111)² du silicium ont des vitesses de gravure de plusieurs ordres inférieures à celles de plans rapides comme (100). Ainsi, selon l'orientation des substrats (100) ou (110), il est possible d'obtenir différents angles de gravure, soit 54,7° ou 35,3° [71].

Notons que l'état de surface après gravure est d'une très faible rugosité, car définie par un plan cristallin. C'est de ce fait une très bonne solution pour réaliser des miroirs sans aberrations optiques.

¹ La réaction globale d'attaque anisotrope du silicium s'écrit :



¹Cette réaction est sensible aux conditions de température, ce paramètre devant être optimisé pour améliorer la vitesse et la sélectivité de gravure.

² Selon la notation de Miller (Miller, W. A treatise on crystallography, 1839).



Figure II. 3 : Différents profils de gravure humide anisotrope en silicium cristallin pour application unique; (b) des exemples de micropuits faits par gravure humide anisotrope [72].

II.2.2.b Gravure sèche anisotrope

La gravure sèche est un ensemble de techniques de gravure en exposant le matériau à un bombardement d'ions produits par un plasma [72]. En utilisant un champ électrique, il est possible de polariser le gaz d'ions et ainsi de réaliser des gravures anisotropes. Le procédé "Bosch" a permis de réaliser des gravures sur des grandes profondeurs avec d'excellents rapports d'aspect en jouant sur des étapes successives de gravure anisotrope suivies d'étapes de passivation.

II.2.3. Évaporation de métaux

L'évaporation est une technique de dépôt sous vide qui se décompose en trois étapes : la création des espèces gazeuses, le transport des espèces de la source au substrat et enfin le dépôt sur le substrat. Le dépôt se fait généralement par réaction chimique en phase vapeur (CVD) pour les oxydes (Figure II. 4), ou par pulvérisation cathodique et évaporation pour les métaux. Le procédé de CVD est associé à la formation d'une couche à la surface d'un substrat à partir d'un précurseur volatile issu d'une ou plusieurs réactions chimiques. Les réactions dans un réacteur de CVD sont faites soit à basse pression (LPCVD) ou bien assistées par plasma (PECVD). Le LPCVD [73] est réalisé dans un réacteur à des températures allant de 400 à 800 °C, et le processus est généralement effectué sur les deux faces du substrat en même temps. Ces hautes températures sont susceptibles de faire fondre certains métaux. Aussi, le PECVD [74], qui met en jeu des réactions chimiques sous l'activation d'un plasma,

offre une alternative souvent intéressante car ce procédé est effectué à basse température.

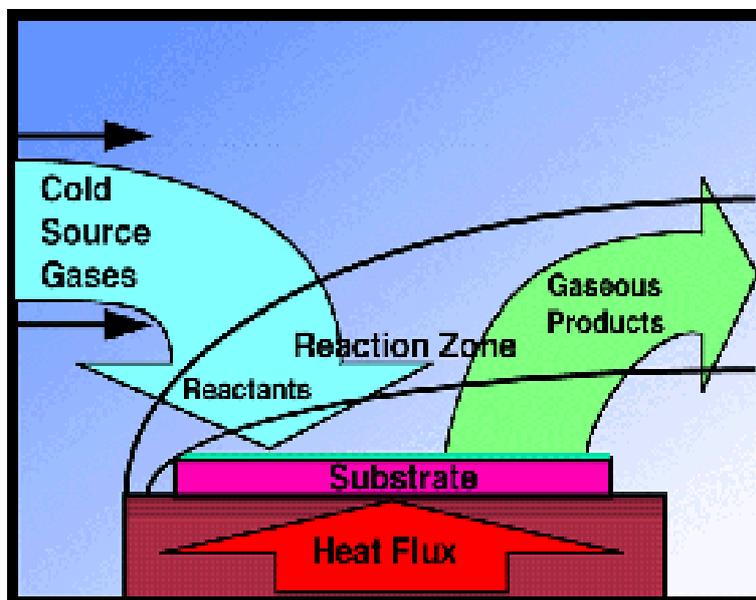


Figure II. 4: Principe de la CVD. La couche est déposée à partir de précurseurs gazeux qui réagissent sur le substrat. Ce dernier est généralement chauffé pour fournir l'énergie d'activation nécessaire au déclenchement de la réaction chimique et pour permettre une mobilité suffisante des atomes pour former la structure désirée. Les vapeurs des précurseurs sont généralement véhiculées par un gaz vecteur qui peut lui-même être réactif.

II.2.4. Lithographie douce avec le PDMS

Le Polydiméthylsiloxane (PDMS) est un polymère siliconé qui a été utilisé comme moyen alternatif de microfabrication, en particulier pour les applications microfluidiques (Figure II. 5). Le PDMS est transparent, biocompatible, bon marché, souple et facile à manipuler. La stratégie de fabrication de ce matériau, qui a été baptisée lithographie douce, a été développée par le groupe de Georges Whitesides à Harvard [75-76]. Elle repose sur la fabrication d'un moule qui se présente sous la forme d'un négatif des structures que l'on désire réaliser (Figure II. 6).

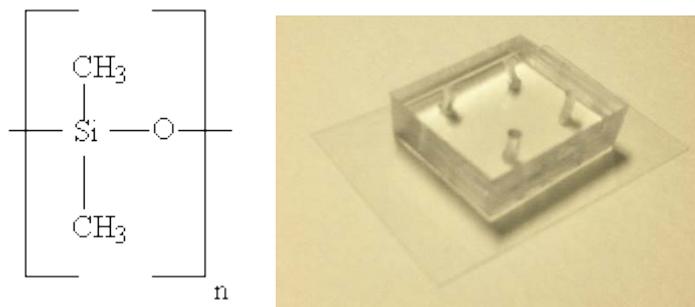


Figure II. 5: Formule chimique du PDMS à gauche. Le panneau à droite est un dispositif en PDMS fait par Qihao HE (LAAS).

Le PDMS liquide et un agent réticulant permettant d'obtenir un élastomère sont alors mélangés. Le mélange est ensuite placé dans une cloche à vide jusqu'à la disparition des bulles d'air puis versé sur le moule avant d'être placé dans une étuve. Après réticulation, le PDMS est démoulé avec une impression contenant les canaux désirés (Figure II. 6.a). Notons que cette étape de démoulage est facilitée après dépôt d'une couche moléculaire anti-adhésive pour le PDMS (Figure II. 6.b). Ensuite les structures négatives du moule seront dans le PDMS (Figure II. 6.c, d), et cette puce pourra être collée sur une lamelle de verre (Figure II. 6.e).

En termes de coût, la photolithographie douce ne fait intervenir que de simples appareillages comparativement aux techniques classiques sur silicium, et le PDMS est bien meilleur marché que le verre et le silicium. Tous ces avantages font du PDMS le matériau de prédilection pour les laboratoires ne disposant pas d'outils technologiques avancés.

La technologie PDMS présente cependant un certain nombre d'inconvénients liés à la porosité du matériau et à sa faible résistance chimique vis-à-vis des solvants organiques en particulier. Le PDMS reste donc majoritairement réservé à du prototypage rapide. Notons enfin que d'autres polymères sont utilisés pour le développement des MEMS tels que la SU-8 [77-78] et le PMMA [79].

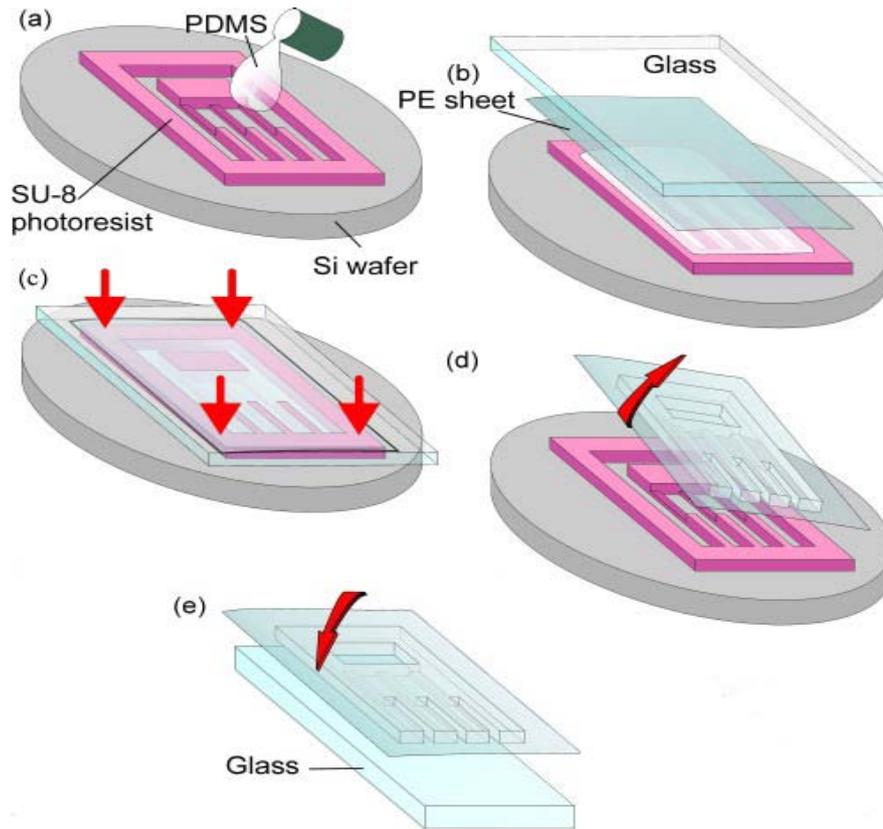


Figure II. 6: Technologie douce pour la fabrication des canaux en PDMS [80].

II.3. Technologie du laboratoire sur puce

Nous allons maintenant décrire les procédés que nous avons mis en œuvre au sein de la salle blanche du LAAS-CNRS pour la fabrication et l'optimisation d'un laboratoire sur puce dédié à la visualisation 3D. Ce dispositif est fondé sur la fabrication de miroirs en forme de V [81], qui servent pour observer des objets sous différentes facettes, et il est obtenu par gravure humide du silicium. Décrivons d'abord les étapes technologiques du procédé. Le logiciel CLEWIN a été utilisé pour la création du masque. Ce masque est formé des microcanaux de 13 mm de longueur et 20 μm de largeur avec 2 réservoirs sur les bords de 3 mm de longueur et 1mm de largeur. Ces réservoirs servent à alimenter les canaux (Figure II. 7).

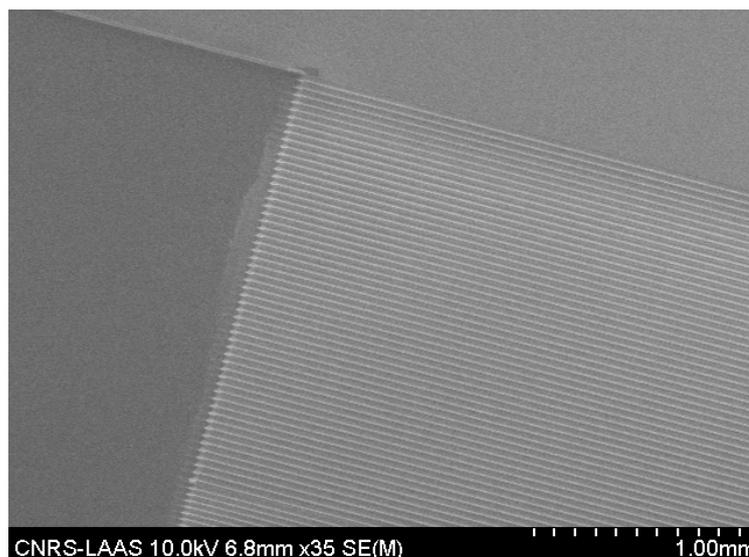


Figure II. 7: Image MEB montrant la région de connexion entre le réservoir et les canaux microfluidiques.

II.3.1. Etapes de fabrication

II.3.1.a Etape 1: Nettoyage des plaquettes de silicium

Une procédure d'attaque dite "piranha" destinée à enlever les impuretés et les composés organiques en surface du silicium, en faisant croître une fine couche d'oxyde qui va piéger ces impuretés, puis en éliminant cette couche. Cette étape s'effectue de la manière suivante:

- ✓ Nettoyage des plaquettes dans le bain H_2SO_4 (90%)/ H_2O_2 (10%) [1:1] en volume pendant 30 secondes pour créer un oxyde de silicium de quelques nanomètres d'épaisseur ; Rinçage des plaquettes dans l'eau désionisée (EDI) et séchage sous azote ;
- ✓ Attaque chimique dans l'HF (10 %) pendant 30 s pour enlever la couche d'oxyde ;
- ✓ Deux rinçages des plaquettes dans l'EDI (de résistivité $11 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ et plus).

II.3.1.b Etape 2: dépôt du nitrure de silicium

Une couche épaisse de 80 nm, qui joue le rôle de masque durant la gravure humide du silicium, est déposée par LPCVD (Low Pressure Chemical Vapor Deposition).

II.3.1.c Etape 3: photolithographie

Après un nouveau nettoyage au "piranha", on procède à une photolithographie (Figure II. 8.1) de résine AZ1529 (3 μm d'épaisseur), et on expose à travers un masque dont les largeurs des motifs sont de 10 à 30 μm .

II.3.1.d Etape 4: Gravure sèche RIE

Une gravure ionique réactive (Figure II. 8.2) est réalisée sur une profondeur de de l'ordre de 80 nm afin de transférer le masque à travers la couche de silicium.

II.3.1.e Etape 5: Gravure humide

Après le délaquage de la résine, une gravure humide anisotrope du silicium dans le KOH à 90 °C pendant 17 minutes (Figure II. 8.3). Des sillons en forme de V de 10 à 30 μm de largeur sont formés, et suivant des profondeurs de 3,6 à 10,8 μm , ou de 7 à 21 μm pour des substrats (110) ou (100), car les angles de gravure sont de 54,6 ° et 35,4 °. Notons que la gravure est plus profonde dans les canaux d'arrivée microfluidique, car il n'y a pas de limite physique à la gravure du silicium.

II.3.1.f Etape 6: Métallisation

Pour obtenir des miroirs à facettes, plusieurs procédés d'évaporation (Figure II. 8.4) ont été testés en utilisant une bicouche titane/or (100 nm/400 nm, le titane est employé pour favoriser l'accroche de l'or), une monocouche d'aluminium (200 nm), une monocouche de platine (200 nm), ou une monocouche d'argent (200 nm). Après optimisation, l'aluminium s'est montré être la meilleure solution (voir la suite).

II.3.1.g Etape 7: Oxydation

Cette étape a pour but de faire croître une couche d'oxyde de 1000 nm sur le métal pour éviter l'oxydation et la dégradation du métal en présence de l'air ou de l'eau. Ce dépôt est réalisé par PECVD à une température de 250 degrés, et la couche résultante est biocompatible, caractérisée par un indice de réfraction de 1,5. Notons que dans le cas de l'argent, un dépôt PECVD plus lent à haute fréquence est nécessaire pour améliorer l'adhésion du SiO₂ à la surface.

II.3.1.h Etape 8: Scellement du laboratoire sur puce

Le substrat de silicium microfabriqué est ensuite percé de 2 trous pour obtenir des vias d'arrivée de liquide. Cette opération est réalisée par ultrasons ("Disk cutter") sur la face arrière. La dernière étape est la formation des canaux microfluidiques, qui exige le scellement du substrat de silicium avec une lamelle de verre (Figure II. 8.5). Pour ce faire, nous avons déposé une couche de PDMS sur une lamelle de verre par enduction centrifuge, et nous avons fait réticuler le PDMS à 75 °C pendant 45 min. Le collage est enfin réalisé en traitant la surface du PDMS avec un plasma oxygène à 300 W pendant 30 s. Nous avons enfin porté les deux surfaces au contact, et fait recuire l'ensemble pendant 10 min à 75 °C. Ce protocole qui crée des liaisons covalentes entre les deux surfaces, produit un collage de grande qualité [75].

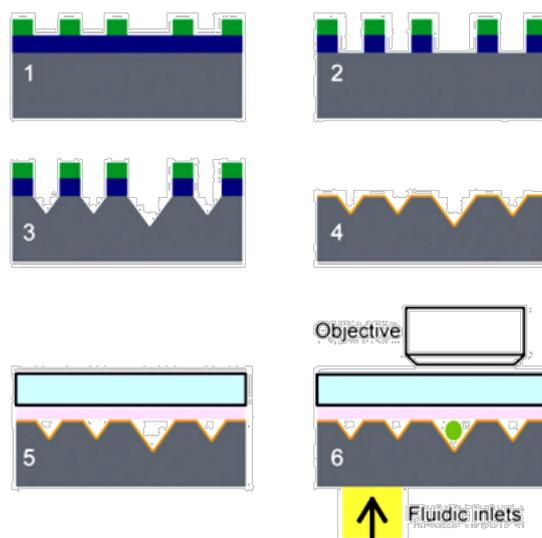


Figure II. 8: Représentation des différentes étapes du processus technologique de fabrication de micro-miroirs en forme de V. 1) Une photolithographie selon des canaux (vert) est faite sur un wafer nitruré (couleur bleu). 2) Une gravure RIE de 80 nm de la couche de nitrure jusqu'au Silicium. 3) Gravure anisotrope KOH nécessaire pour graver des sillons en V dans le Silicium. 4) Dépôt d'une couche de 200 nm d'aluminium par métallisation. Les Panneaux 5 et 6 décrivent l'intégration du système par un collage d'une fine couche de PDMS (couleur mauve) déposée sur une lamelle en verre (couleur bleu clair) sur du Silicium, afin de l'utiliser avec microscopes droits standards. Les échantillons fluorescents (sphéroïde verte) sont transportés dans les rainures par actionnement fluïdique.

II.3.1.i Etape 8: Connectiques fluïdiques

L'alimentation fluïdique dans les canalisations du laboratoire sur puce est fondée sur une approche développée durant la thèse de Rémy Fulcrand au LAAS. Des plots en PDMS sont fabriqués pour assurer la communication entre le dispositif et le système de remplissage. Ces connectiques sont collées sur la face arrière de la puce pour communiquer via des tuyaux le liquide à nos sillons en V gravés dans le silicium qui forment naturellement des canalisations microfluidiques.

Suite à ces étapes, l'intégration de notre laboratoire sur puce avec la gestion des fluïdes pour la visualisation 3D des cellules *in vivo* est terminée (Figure II. 9).

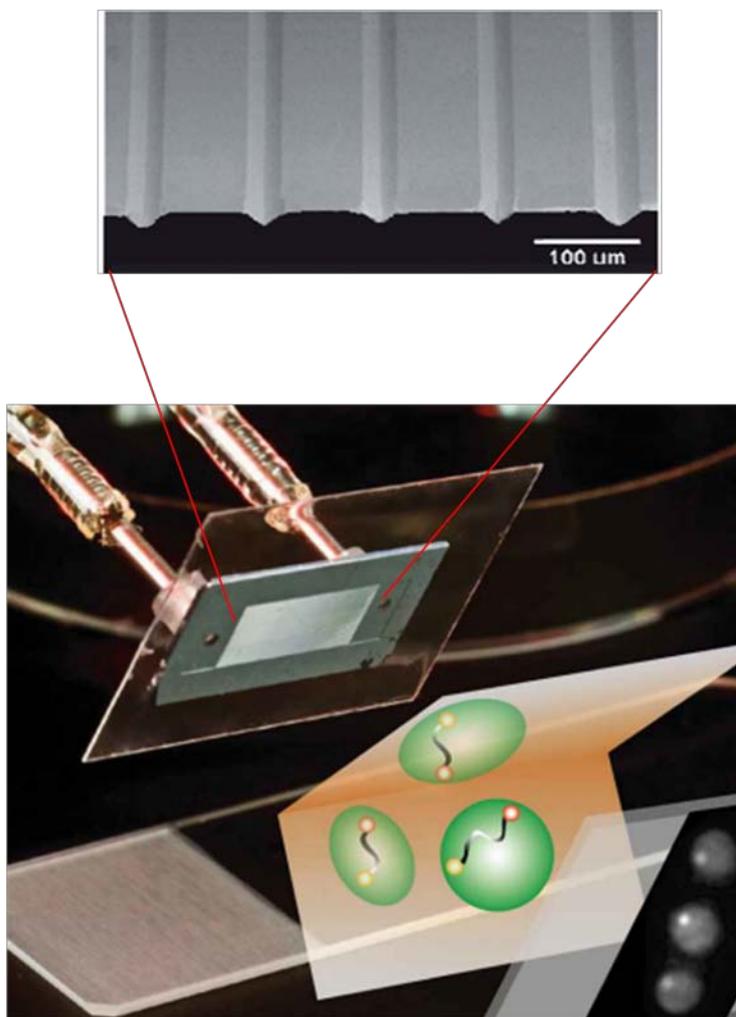


Figure II. 9: Le panneau supérieur représente l'image en microscopie électronique à balayage d'un substrat de silicium avec les gravures en V [82]. Dans le panneau inférieur est représentée la gestion intégrée du laboratoire sur puce y compris les entrées et sorties fluidiques via les connectiques. La lame de microscope au bas de l'image sert à l'échelle (dimensions 75 * 25 mm).

Dans la suite nous expliquerons notre méthode pour suivre des particules en 3D avec notre laboratoire sur puce.

II.4. Principe de la reconstruction 3D

II.4.1. Introduction

Notre dispositif est dédié à l'observation en 3D, et il est basé sur les méthodes de stéréovision qui permettent de reconstruire une scène en 3D à partir de plusieurs prises

sous différents angles. C'est une technique utilisée pour la vision humaine : chaque œil fournit en effet au cerveau deux vues de notre monde environnant avec un décalage spatial, ce qui permet de recréer notre environnement en relief instantanément. Remarquons toutefois que la perception humaine est basée sur au moins cinq processus distincts en plus de la vision stéréoscopique : perception à partir des ombres et dégradés, perspective atmosphérique, perspective géométrique, perspective par déformation de la texture, et perception en couches par l'analyse des occlusions et jonctions en T [83-84]. La perception du relief par la vision stéréoscopique seule fait l'objet de nombreux travaux de recherche depuis l'apparition de la vision par ordinateur dans les années 60 [85]. Un système de vision pour les tâches de manipulation robotique dans des environnements domestiques naturels utilise deux paires de caméras stéréo : une caméra périphérique et une fovéale. Selon le contexte, l'une ou l'autre de ces caméras sera utilisée pour modéliser l'objet [86].

II.4.2. Stéréovision dans notre laboratoire sur puce

Dans notre cas, les micro-miroirs sont assemblés au dessus d'un échantillon à observer, et nous plaçons l'ensemble sur un support de microscope droit ou inversé (Figure II. 10.a). A titre d'exemple, si nous observons une bille fluorescente à l'intérieur de cet assemblage, nous voyons apparaître de part et d'autre de l'objet deux images qui correspondent aux réflexions de la bille à travers les micro-miroirs (Figure II. 10.b). Pour avoir une intuition du protocole de reconstruction 3D, remarquons que les micro-miroirs sont inclinés par rapport à l'angle d'observation, et que les images réfléchies présentent une vue de la scène de côté. Ainsi, les déplacements verticaux (le long de l'axe z dans la Figure II. 10) sont projetés au moins en partie dans le plan d'observation (le long de l'axe y dans la Figure II. 11), ce qui ouvre la voie à une reconstruction tridimensionnelle d'une trajectoire à partir d'une seule vue de la scène capturée par un microscope optique. Notons que les coordonnées en 2D sont obtenues par un plugin (particle tracker) sous le logiciel gratuit ImageJ fondé sur le calcul du centre de masse de la particule [87] (pour plus d'informations voir l'annexe B).

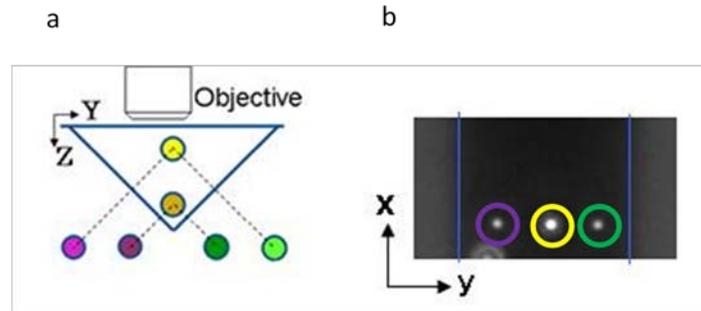


Figure II. 10: Mise en œuvre des micro-miroirs pour la microscopie optique. (a) Assemblage des micro-miroirs placés tête en bas avec une lamelle de microscope. Deux particules fluorescentes placées l'une au-dessus de l'autre (bille orange et jaune) sont indiscernables dans l'image projetée par le microscope. Leur écart selon la direction z est directement mesurable le long de l'axe y dans les images réfléchies (distances entre les images mauves claires et foncées d'une part, et vertes claires et foncées d'autre part). (b) Image obtenue avec une bille fluorescente de $1\ \mu\text{m}$ avec les réflexions à gauche et à droite. Les lignes bleues correspondent à la base des miroirs.

Pour une description quantitative du protocole de reconstruction 3D, définissons tout d'abord un repère associé aux micromiroirs : (Ox) désigne l'axe des miroirs, (Oy) et (Oz) sont choisis de manière à former un repère orthonormé direct (Figure II. 11). La forme triangulaire des micromiroirs et l'invariance du système suivant la direction Ox permet de simplifier la modélisation optique et géométrique puisqu'il est possible de représenter le système objet/miroirs/images en deux dimensions, dans le plan (yOz) . On observe une scène projetée dans le plan (xOy) et l'on souhaite remonter à l'information complète en 3D.

Par définition, la stéréovision nécessite deux points de vue. Aussi, il suffit d'analyser la particule avec une de ses réflexions pour recueillir des informations 3D. Partons donc du cas de la réflexion à droite dans notre repère.

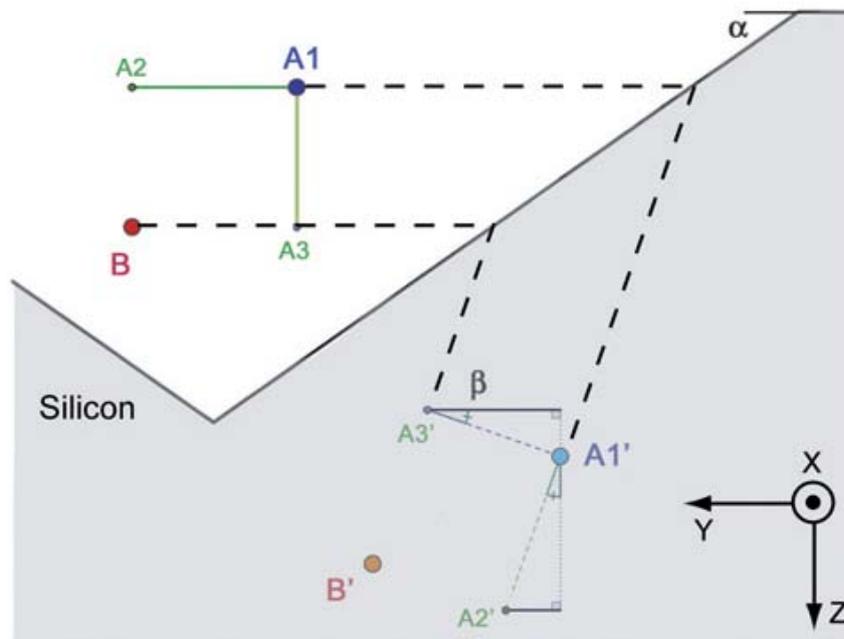


Figure II. 11: Principe géométrique de la reconstruction 3D.

La reconstruction 3D est purement géométrique et repose sur un seul paramètre, à savoir l'angle des miroirs en forme de V, qui est défini par la structure cristallographique de silicium et ci-après désigné α (Figure II. 11). Pour résoudre le problème, il est commode d'introduire l'angle défini par $\beta = \pi/2 - 2\alpha$.

Premièrement, nous calculons la distance δy^1 selon l'axe des y entre les deux réflexions côté gauche de A1 et A2 en fonction de la distance réelle Δy entre A1 et A2:

$$\delta y^1 = \Delta y \sin(\beta) \quad (1)$$

Appliquons la même procédure pour A1 et A3, qui sont séparés selon l'axe des z et situés sur la même coordonnée y, la distance δy^2 le long de l'axe y entre les deux réflexions est :

$$\delta y^2 = \Delta z \cos(\beta) \quad (2)$$

A partir de ces deux équations, on peut déterminer la position relative (Δz) d'un point quelconque. En effet, tout point du plan étant l'image de A par une translation selon (Oy) suivie d'une autre selon (Oz), l'écart observé selon y entre l'image du point référence (A1) et celle du point considéré (B) vaut :

$$\delta y^{total} = \delta y^1 + \delta y^2 = \Delta y \sin(\beta) + \Delta z \cos(\beta) \quad (3)$$

Ainsi, la distance verticale Δz entre A1 et B est directement proportionnelle à la distance latérale entre leurs réflexions :

$$\Delta z = \frac{\delta y^{total} - \Delta y \sin(\beta)}{\cos(\beta)} \quad (4)$$

Pour l'image droite (d), la seule différence dans les calculs est sur le signe de Δz . Cela donne au final :

$$\Delta z = \frac{\Delta y \sin(\beta) - \delta y^{total}}{\cos(\beta)} \quad (5)$$

Pour retrouver la position 3D à partir des images réfléchies, on utilise les formules (4) et (5), ce qui permet de trouver les relations entre la position relative en 3D d'un point () et la position relative en y de ses images () :

$$\left\{ \begin{array}{l} \Delta z = \frac{\delta y^{total} - \Delta y \sin(\beta)}{\cos(\beta)} \\ \Delta z = \frac{\Delta y \sin(\beta) - \delta y^{total}}{\cos(\beta)} \end{array} \right\} \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \Delta y = \frac{\delta y^{total} + \delta y^{total}}{2 \sin(\beta)} \\ \Delta z = \frac{\delta y^{total} - \delta y^{total}}{2 \sin(\beta)} \end{array} \right\} \quad (6)$$

Ainsi, une image collectée par le microscope, contenant des images de l'objet et de ses deux réflexions, permet de réaliser simultanément 3 mesures des coordonnées

(x, y, z) de particules, et leur comparaison fournit une évaluation quantitative de leur cohérence (Figure II. 12).

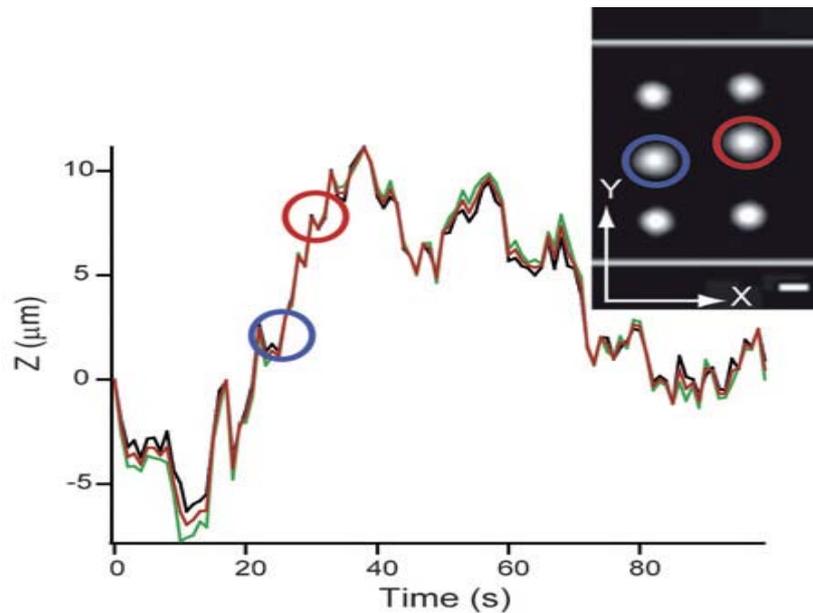


Figure II. 12: La position z en fonction du temps d'une particule fluorescente de $1\ \mu\text{m}$ diffusant à l'intérieur du Laboratoire sur puce observée avec un objectif de $20\times$, Z est calculé à partir de la position relative de la bille et son reflet à droite, la bille et sa réflexion à gauche, et à partir des réflexions côté gauche et côté droit (vert, noir et courbes en rouge, respectivement). Notez que le suivi 3D peut être effectué pour les déplacements le long de l'axe z aussi grand que $15\ \mu\text{m}$ sans bouger de tout appareil mécanique partie du microscope. L'image à droite montre la particule fluorescente avec ses réflexions latérales à deux moments différents, qui sont indiquées par les cercles sur la figure. Les lignes verticales correspondent aux limites des miroirs (échelle= $5\ \mu\text{m}$).

II.5. Validation du principe d'imagerie 3D

Après la conception du système, c'est le moment de démontrer qu'il est efficace et précis. Pour cela, nous avons constitué une scène modèle dans laquelle toutes les particules sont situées à la même hauteur (position z identique) en le collant physiquement sur la surface de verre (Figure II. 13) à la base des miroirs.

Leur écart en z est calculé à partir de la position des images réfléchies selon les formules (4, 5, 6), et on constate que les particules sont effectivement toutes dans le même plan, espacées de $-45\ \text{nm}$ en moyenne $\pm 300\ \text{nm}$, ce qui est très convaincant étant donné que leur diamètre est de $1\ \mu\text{m}$. Nous avons ainsi démontré que notre méthode est fiable pour la reconstruction 3D.

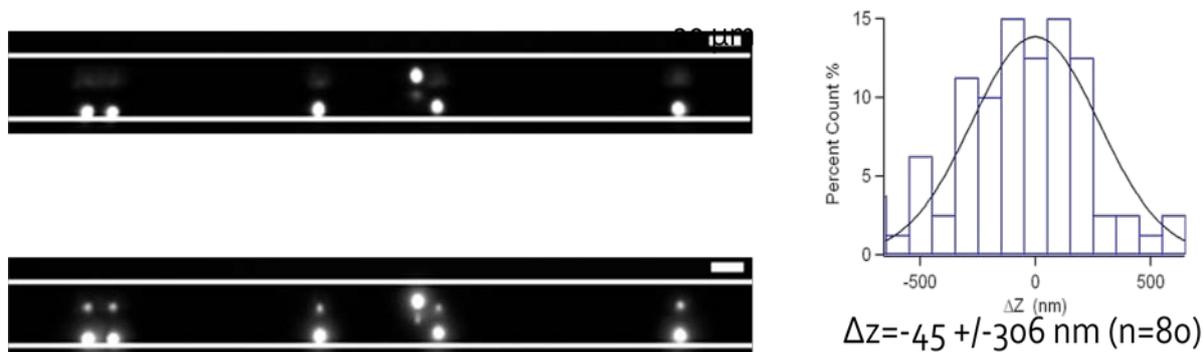


Figure II. 13: Panneau de gauche : billes fluorescentes (grande intensité) collées sur la surface d'une lamelle et leurs réflexions (intensité plus petite). L'erreur calculée entre les trois valeurs La distance en z entre ces billes, qui sont physiquement collées sur une lamelle, est mesurée à partir des réflexions, confirmant qu'elles sont toutes dans un même plan à 300 nm près.

II.6. Application du laboratoire sur puce à la biologie

II.6.1. Observation du noyau de cellules eucaryotes

Nous avons utilisé nos micromiroirs pour la visualisation de levures rendues fluorescentes avec un seul site marqué dans leur génome comme dans la Figure II. 14 (voir le Chapitre III pour les explications sur la technique de marquage des levures). Nous avons également observé deux sites marqués en fluorescence dans une seule cellule en 3D. Nous avons déjà testé nos micromiroirs avec des souches de levure dans lesquelles deux gènes sont marqués avec deux couleurs différentes. Ce travail préliminaire nécessite encore une optimisation des conditions d'éclairage à deux couleurs de l'échantillon. Des essais ont enfin été menés à EMBL par S. Huet et J. Ellenberg (Heidelberg) pour visualiser le centromère des cellules mammifères (CenpA-GFP en faisant un stack de 0.3 μm de pas).

Dans la suite, nous présentons les résultats obtenus avec un seul site fluorescent dans des levures, car ce système biologique nous a permis de valider et d'optimiser notre technologie.

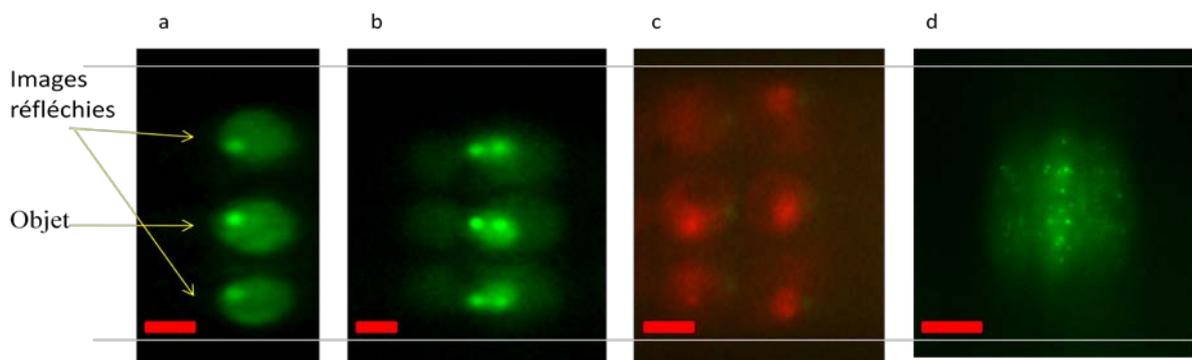


Figure II. 14 : Images des cellules dans notre dispositif. a) Image d'une levure avec un seul site marqué avec ses deux images réfléchies. b) Une levure avec deux sites marqués en GFP dans les sillons des micromiroirs. c) Application des micromiroirs dans des cellules avec deux points marqués en GFP et RFP. d) Centromère des cellules mammifères visualisés en 3D avec notre technique. La ligne blanche représente les micromiroirs et l'échelle est de $2\mu\text{m}$.

II.7. Optimisation des performances optiques du système

II.7.1. Introduction

Nous avons ensuite cherché à optimiser les performances de notre technologie pour l'imagerie en 3D. Comme notre stratégie de suivi des particules repose sur des algorithmes de suivi de particules en 2D, qui sont d'autant plus performants que le point analysé est caractérisé par un bon rapport signal/bruit, il convient d'optimiser la qualité du signal issu de l'objet et de ses réflexions. Pour ce faire, nous avons joué sur des paramètres liés à la technologie (orientation cristalline du substrat et choix du métal déposé), mais aussi sur des paramètres d'optique (ouverture numérique de l'objectif), et d'autres tels les types de caméra, les filtres d'excitation et d'émission, et la source de lumière, qui sont détaillés dans le chapitre III.

II.7.2. Substrat en silicium

Le silicium a une structure cristalline identique à celle du diamant, ce qui permet de décrire son orientation grâce aux indices de Miller. Nous avons testé deux géométries de micromiroirs obtenues avec des substrats (100) et (110) dont l'angle

associé est respectivement $35,4^\circ$ et $54,7^\circ$ (Figure II. 15). D'emblée, nous constatons une différence de netteté lorsque l'on observe des levures en présence des miroirs puisque l'objet est mal résolu avec les miroirs à $35,4^\circ$.

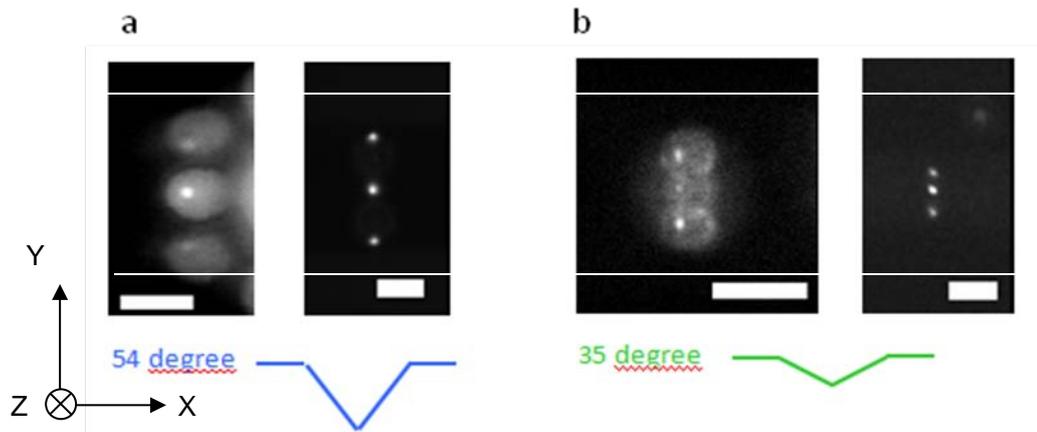


Figure II. 15: a) les levures et les billes sont bien résolues en utilisant des miroirs à $54,7^\circ$, tandis que dans b) les images de levures sont chevauchées (miroirs à $35,4^\circ$), ce qui rend le suivi des particules plus difficile. L'échelle est de $5\mu\text{m}$.

Nous avons ensuite voulu comparer de manière quantitative les résultats d'imagerie 3D avec les deux géométries de miroirs. Pour ce faire, les trajectoires de billes fluorescentes de $1\mu\text{m}$ en diffusion libre ont été suivies, et nous avons comparé la cohérence des trois mesures de position en z effectuées à chaque image à partir du positionnement de l'objet et de ses deux réflexions (voir équations 4 et 5). Ces mesures ont été résumées dans un histogramme représentant l'ensemble des écarts entre les 3 mesures (Figure II. 16). Les données ont été analysées avec un profil gaussien, qui nous a permis de déduire que les miroirs de $54,7^\circ$ sont 4 fois plus précis que ceux de $35,4^\circ$: l'écart standard entre les mesures est de 133 nm ($n=757$) pour $54,7^\circ$ contre 668 nm ($n=529$) $35,4^\circ$.

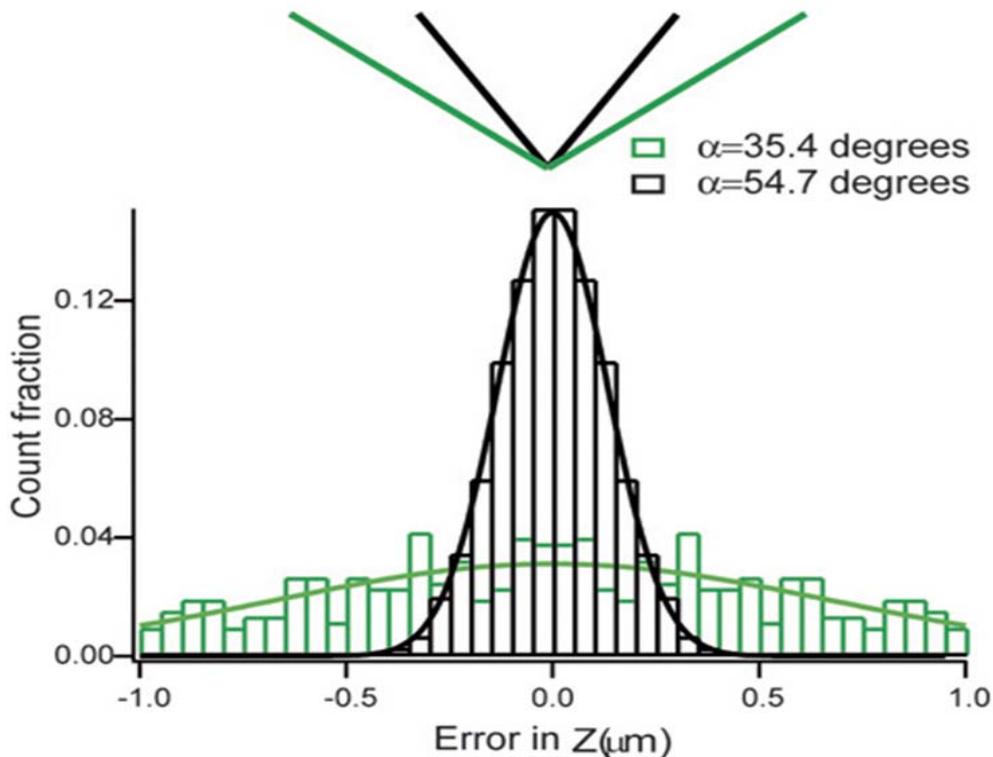


Figure II. 16: Image d'une bille avec ses images réfléchies dans deux genres de miroirs de 54° et 35° respectivement avec le même objectif de 20X. L'erreur entre les valeurs de Z calculée pour des miroirs de 54° et de 35° montrant que les miroirs de 54° sont plus précis.

II.7.3. Choix du métal

Dans les applications optiques courantes, les miroirs métalliques sont souvent utilisés, leurs coefficients de réflexion atteignant dans les meilleurs cas un maximum de 95%. Dans le souci d'amélioration des miroirs, différentes couches de métaux à savoir Al, Ag, Pt, et Au ont été déposées.

II.7.3.a Or

Si l'or est inerte chimiquement, sa réflectivité n'est vraiment bonne (supérieure à 80 %) que pour les basses fréquences (Figure II. 17). Or les observations en microscopie de fluorescence se font souvent dans les hautes fréquences du visible (violet, bleu, vert). En conséquence, certaines images peuvent avoir une luminosité bien inférieure à celle de l'objet correspondant, ce qui s'avère problématique.

II.7.3.b Argent

L'argent est un métal relativement ductile et très malléable. Il présente une forte réflectivité dès 400 nm (Figure II. 17), comparable à celle de l'aluminium. Il ne s'oxyde pas à l'air (très peu en fait) mais est attaqué par les sulfures, d'où le noircissement de la vaisselle en argent qu'on observe parfois. Le problème majeur avec l'argent vient de la faible adhérence de la couche de protection de SiO₂ : le nettoyage des surfaces, réalisé avec un mélange sulfochromique, se traduit par un changement de couleur et une baisse de réflectivité.

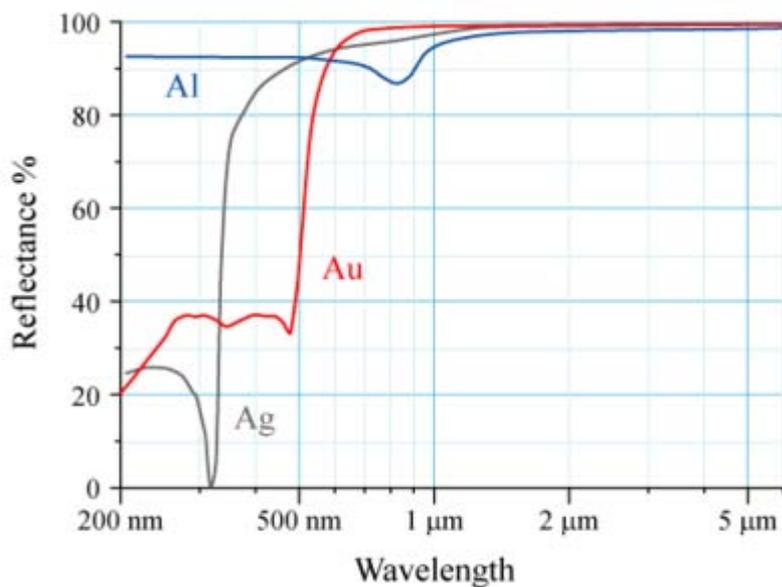
II.7.3.c Aluminium

L'aluminium est relativement peu coûteux et offre un facteur de réflexion initiale de 85-91 % (Figure II. 17.a). Si une surface d'aluminium non protégé est exposée à une solution, ses caractéristiques optiques sont rapidement dégradées. Aussi, ces miroirs sont recouverts par une couche de protection de SiO₂ contre l'abrasion et la corrosion. Notons que des miroirs en aluminium ont été utilisés pour les centrales solaires avec une couche de SiO₂. Les résistances de ces miroirs ont été excellentes vu que, après 12 ans d'exposition aux conditions climatiques agressives de Mexico, une diminution de la réflexion de seulement 3% (de 0,85 à 0,82) a été détectée [88].

Nous avons ensuite voulu comparer de manière quantitative les résultats d'imagerie 3D avec les différents métaux réfléchissants, et nous avons procédé suivant la même méthode de mesure de la cohérence des positions en Z (voir partie II.7.2). Nos mesures sont résumées dans l'histogramme représentant l'ensemble des écarts entre les 3 mesures de la position de Z (Figure II. 16). Les histogrammes ont été analysés avec une gaussienne, qui nous a permis de déduire que les miroirs en aluminium sont plus efficace par un facteur 1.7 que ceux en or pour le tracking 3D.

Suite à ces optimisations, nous avons commencé à fabriquer des micromiroirs sur des substrats à 54,7° avec une face réfléchissante en aluminium.

a)



b)

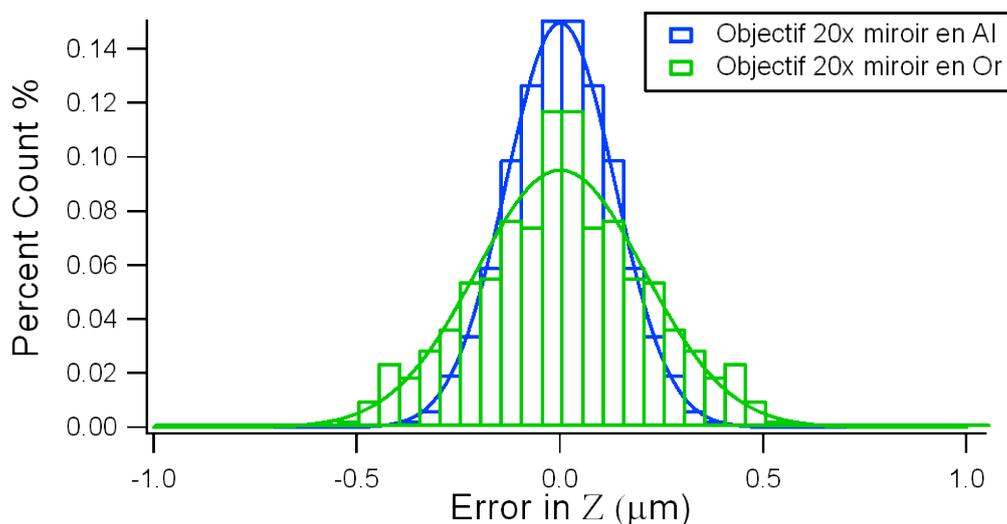


Figure II. 17: A) La réflectance de différents métaux est représentée en fonction de la longueur d'onde. Pour l'émission de la EGFP aux alentours de 500 nm, l'argent et l'aluminium sont les meilleurs candidats, tandis que l'or est bien réfléchissant à partir de 600 nm. B) Histogramme des erreurs entre les valeurs de Z calculée pour des miroirs avec des facettes en or et aluminium montrant que les miroirs en aluminium sont meilleures.

II.7.4. Choix de l'ouverture numérique de l'objectif

L'ouverture numérique (NA) est une caractéristique essentielle pour le choix d'un objectif. Elle détermine en effet la luminosité et la résolution d'un objectif. Elle dépend directement de 1°) l'indice de réfraction du milieu et 2°) de l'angle formé par

trois points particuliers qui sont : le centre de la lentille, le foyer objet de la lentille et le bord de la lentille. Plus cet angle sera grand et meilleures seront la luminosité (plus de rayons lumineux se trouvent collectés) et la résolution (Figure II. 18).

L'ouverture numérique de l'objectif est exprimée par la formule $NA = n \sin(\theta)$, où n désigne l'indice de réfraction du milieu et θ l'angle d'incidence. Dans l'air, cet angle peut avoir un maximum de 72 degrés, ce qui correspond à une valeur de $NA = 0.95$.

L'ouverture numérique de l'objectif peut être augmentée de façon spectaculaire par l'utilisation d'un milieu à immersion comme la glycérine, l'eau ou l'huile. En utilisant un milieu d'immersion avec un indice de réfraction similaire à celui de la lamelle de verre, pratiquement une huile spécifique, la dégradation de l'image due aux variations de l'épaisseur de la couverture en verre est pratiquement éliminée.

D'une manière générale, les objectifs de faible grossissement (5x à 20x) sont dotés d'une faible NA (0,5 à 0,75), ils offrent une grande distance de travail et une grande profondeur de champ. Les objectifs de grandissement supérieur (40x à 100x) ont une NA supérieure à 0,75 et offrent une excellente résolution mais une faible profondeur de champ. Pour obtenir une ouverture numérique effective supérieure à 0,75 les objectifs doivent être à immersion.

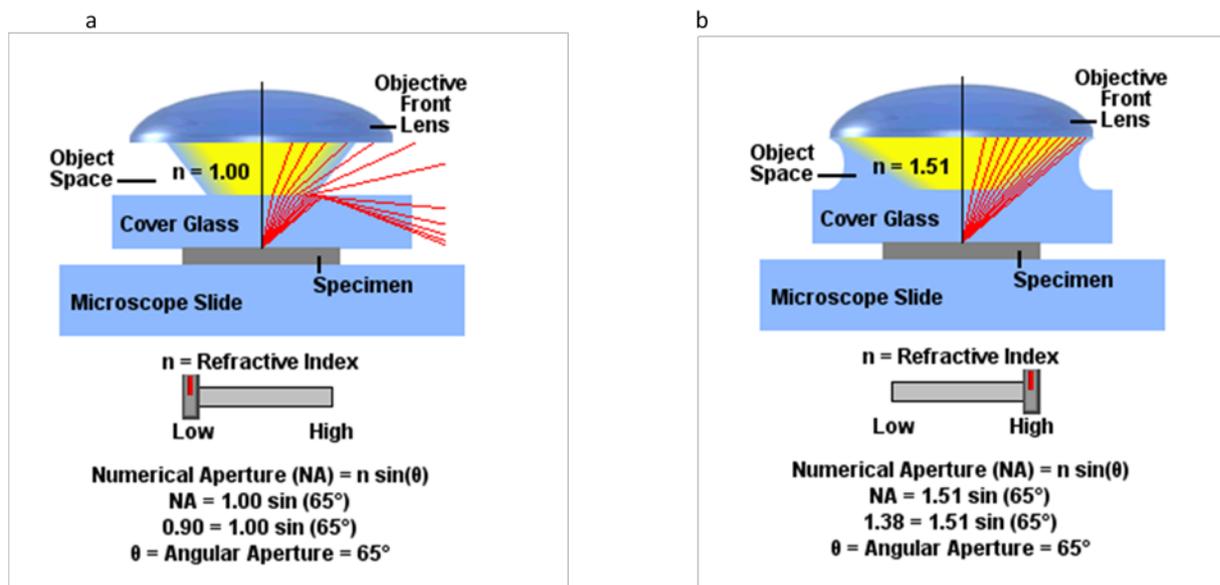


Figure II. 18: Ouverture numérique d'un objectif a) objectif avec une ouverture numérique de 1 dans laquelle les rayons lumineux sont déviés et les rayons les plus externes seront perdus. b) à droite : Les

rayons ne sont plus déviés et peuvent tous être collectés par la lentille (tiré du site de Nikon) ce qui augmente les nombres des photons et collectés et la résolution de l'image.

Deux autres caractéristiques de l'objectif dépendent de l'ouverture numérique : la distance de travail D et la profondeur de champ Δz (Figure II. 19). Un objectif de haute qualité sera caractérisé par une grande ouverture numérique ($1,0 < NA < 1,45$) ce qui a comme conséquence une distance de travail limitée (90 à 180 μm) et une profondeur de champ réduite (effet de sectionnement optique).

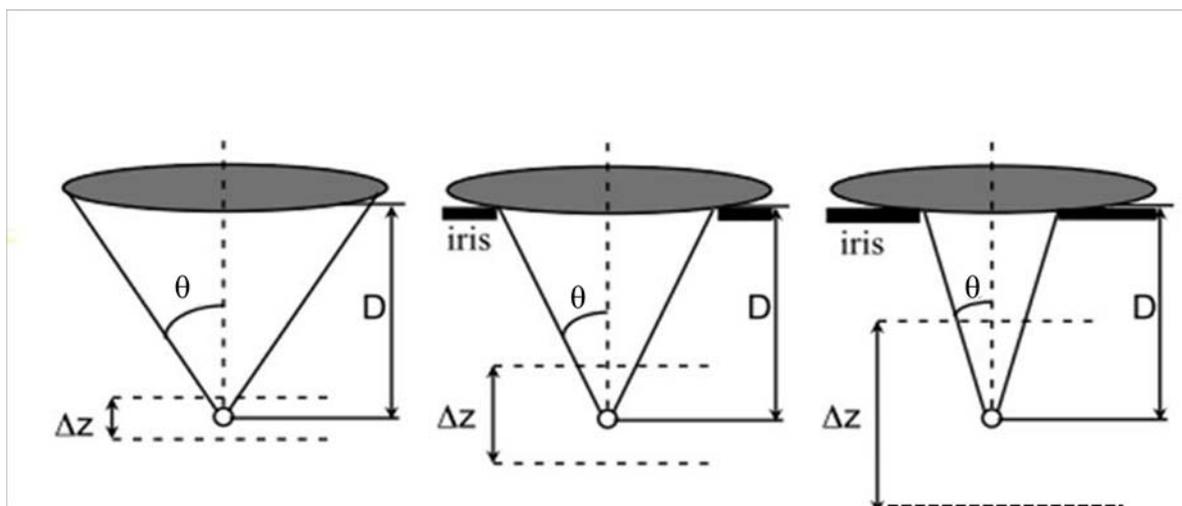


Figure II. 19: l'ouverture numérique est caractérisée par l'angle θ et détermine la distance de travail D et la profondeur de champ Δz . Un iris placé devant la lentille permet de faire varier l'ouverture numérique sans changer le grandissement et d'augmenter la profondeur de champ.

Pour optimiser les miroirs, un objectif 100X, muni d'un iris permettant de faire varier l'ouverture numérique, a été utilisé afin de tester les effets liés à la profondeur de champ. Nous avons observé la diffusion de micro-particules avec différentes ouvertures numériques de 0.6 à 1.3, et nous avons utilisé la méthode présentée dans la Figure II. 12 caractérisant la cohérence des trois mesures de z effectuées à chaque image. L'historique de l'occurrence de ces erreurs dans la Figure II. 20 montre que plus l'ouverture numérique est grande, meilleure est la résolution de positionnement, comme attendu selon la théorie (Équation III.1, Équation III.2).

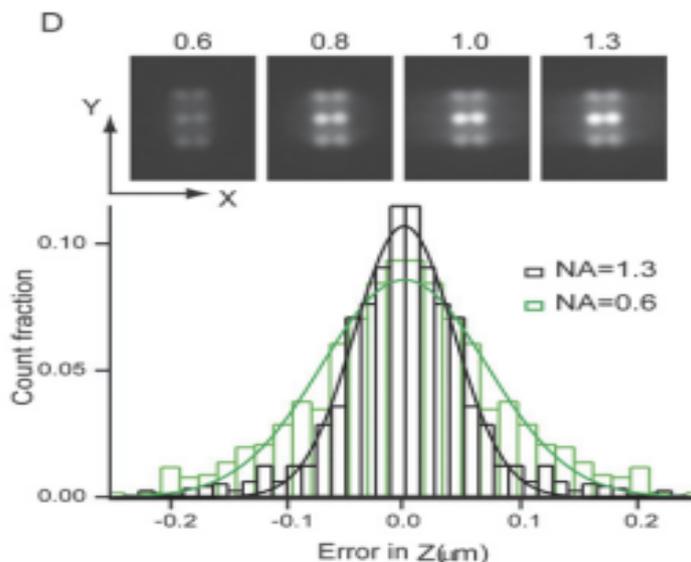


Figure II. 20: Les panneaux supérieurs montrent une particule fluorescente fixe observée avec un objectif 100X et ouvertures numériques de 0,6, 0,8, 1,0 et 1,3. Le graphique représente des histogrammes de la différence z mesures obtenues avec l'objectif 100X et ouvertures numériques de 0,6 ($n = 1113$) et 1,3 ($n = 1189$), et leurs gaussienne permet un ajustement lié à la largeur de 60 nm et 87 nm, respectivement (courbes vertes et noires).

II.8. Limitations des miroirs en V

II.8.1. Introduction

Nous avons démontré que les miroirs en V sont de puissants outils pour la microscopie en 3D. Il existe toutefois une limite intrinsèque à cette technologie qui est liée au fait d'avoir deux miroirs placés en vis-à-vis. En effet, comme dans une galerie des glaces, il existe un ensemble de réflexions à partir d'un même objet, et nous nous sommes jusqu'à présent limité aux réflexions primaires (jaune et vert dans la Figure II. 21). Or, il est facile de comprendre que les images primaires peuvent à leur tour se réfléchir sur les miroirs pour former des réflexions secondaires (vert clair et jaune clair dans Figure II. 21). En suivant des billes fluorescentes, nous avons détecté la présence de ces images réfléchies secondaires qui gênent l'observation des images réfléchies et diminuent la résolution (Figure II. 21 à droite).

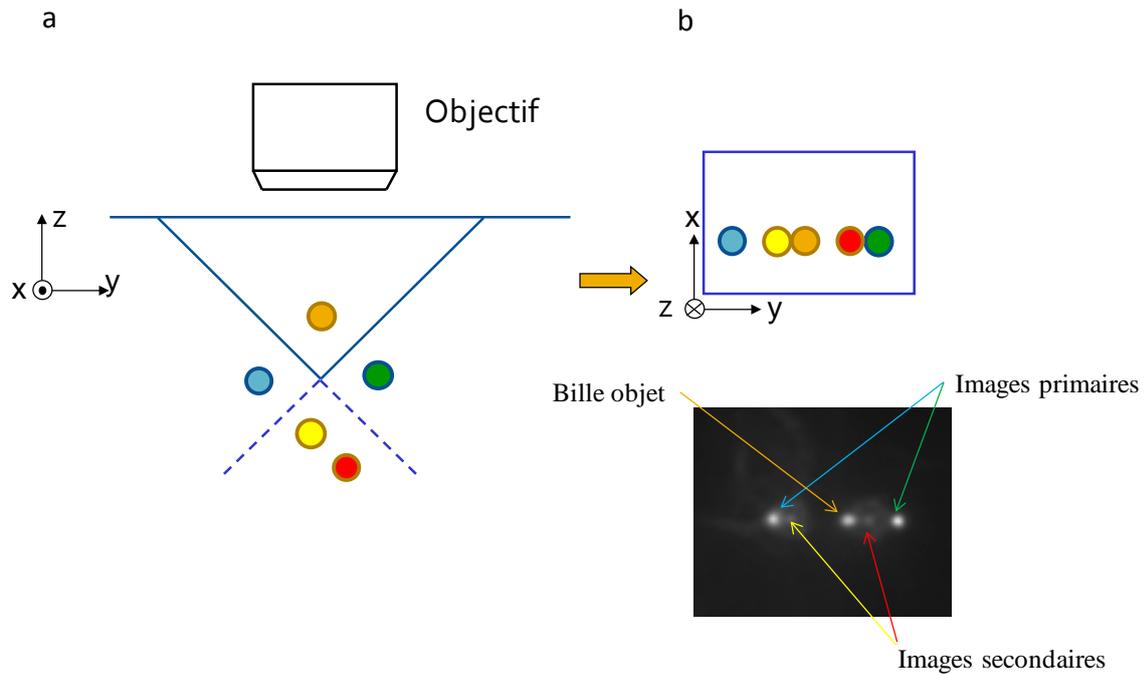


Figure II. 21: a) bille fluorescente placée entre les miroirs en V, on peut voir les images primaires de la bille qui sont utilisées pour la reconstruction en 3D, et l'apparition d'images secondaires qui interfèrent avec le suivi en 3D. b) Schéma représentant une particule entre les facettes du miroir en V avec ses réflexions primaires (jaune et vert) respectivement et les images secondaires (jaune clair et vert clair).

Nous avons démontré dans la partie II.10 qu'une seule réflexion est suffisante pour accéder à l'information 3D de manière fiable en utilisant des miroirs à $54,7^\circ$. Or, l'utilisation d'un seul miroir permet d'éviter la formation d'images secondaires telles que nous venons de les décrire. Aussi, nous avons décidé de fabriquer une nouvelle génération de miroirs avec une seule facette.

II.8.2. Protocole de fabrication des micro-miroirs à une facette

La nouvelle technologie comporte deux niveaux de masques sur des wafers de Silicium d'orientation $\langle 100 \rangle$. Le premier niveau est formé de longues lignes dont la largeur varie entre $20 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m}$, $35 \mu\text{m}$ et $50 \mu\text{m}$ et l'espacement est de $20 \mu\text{m}$ (Figure II. 22).

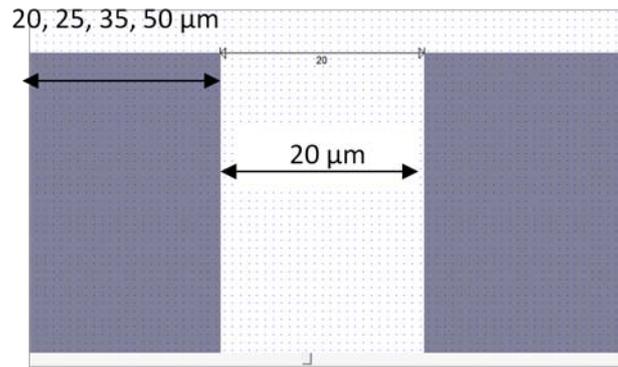


Figure II. 22: Premier niveau de masque avec les motifs des canaux à graver qui sont de 20, 25, 35 et 50 μm et distants de 20 μm .

Notre procédé reprend l'étape de gravure humide, mais au lieu de graver les sillons jusqu'au fond, on s'arrête à 5 μm de profondeur. Projeté dans le plan du wafer, les facettes des miroirs représentent $l = 3,54 \mu\text{m}$ avec un angle de gravure de $54,7^\circ$, et le fond du canal est plat. Nous avons ensuite voulu recouvrir spécifiquement les facettes des miroirs de métal, ce qui nécessite un deuxième niveau de résine. Notons enfin que dans un souci d'optimisation, nous avons réduit au maximum la réflectivité des surfaces non métallisées, en recouvrant le silicium d'une couche de diélectrique opaque (Figure II. 23).

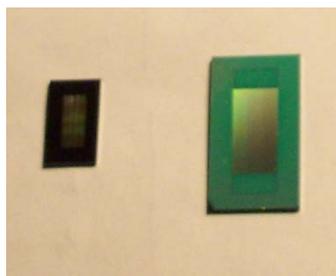


Figure II. 23 : la figure à gauche montre les micromiroirs à une facette, qui sont presque exclusivement opaques sauf sur les sillons, tandis que les miroirs en V sont réfléchissant sur l'ensemble de la surface, ce qui donne cette impression de brillant.

II.8.2.a Détails techniques du protocole

Nous avons résumé les 6 principales étapes du procédé de fabrication dans la Figure II. 24. Les étapes a et b du procédé sont identiques au procédé initial détaillé dans la partie VI.2, au détail près que l'on a surveillé la vitesse de gravure avec un profilomètre mécanique pour stopper la gravure à $5,13 \mu\text{m}$ au bout de 4 min 30 s.

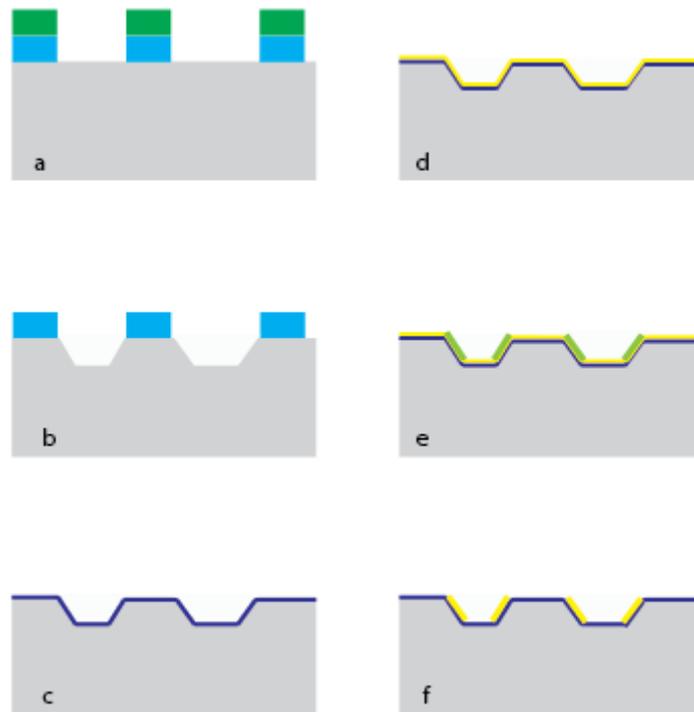


Figure II. 24: Principe de fabrication des miroirs à une facette. a) wafer après une gravure ionique réactive RIE pour transférer les motifs photolithographiés dans une couche de nitrure de protection (couleur bleu). b) Gravure anisotropique du wafer par KOH pour avoir des sillons de profondeurs $5\mu\text{m}$. c) Dépôt d'une nouvelle couche du nitrure de silicium (couleur bleu foncé) de 350 nm pour rendre la surface opaque. d) évaporation d'une couche d'Aluminium (couleur jaune) de 200 nm pour obtenir l'effet du miroir bien réfléchissant. e) une deuxième photolithographie selon des largeurs des motifs bien définies (couleur verte) pour protéger les zones d'aluminium durant l'attaque. f) des miroirs avec une seule facette réfléchissante.

Les étapes suivantes sont nécessaires pour la fabrication du nouveau système :

- Un dépôt d'une couche de 365 nm de Nitrure du Silicium (Si_3N_4) par PECVD (plasma-enhanced chemical vapor desposition) pour rendre la surface du wafer la plus opaque possible (Figure II. 24.c), et ainsi de limiter la réflexivité des surfaces qui ne sont pas considérés comme miroirs. Cette étape dure 2 min 30 s.

- Une métallisation permet d'avoir une surface bien réfléchissante en évaporant une couche de 200 nm d'Aluminium sur toute la plaque (Figure II. 24.d).
- Une photolithographie d'un 2^{ème} niveau d'une résine positive (4562) de grandes épaisseurs de résine 10 µm (Figure II. 24.e) afin de masquer les facettes obliques métallisées (Figure II.25). Un recuit de la résine à 100 °C pendant 1 minute est ensuite réalisé pour assurer la stabilité pendant l'étape suivante d'attaque d'aluminium en milieu liquide.

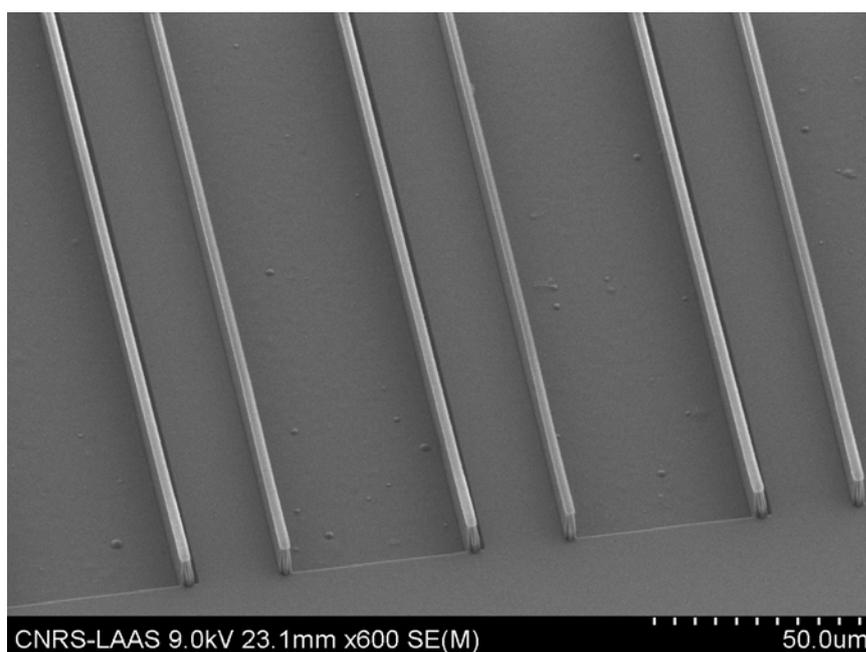


Figure II. 25 : Image par microscopie électronique à balayage montrant les facettes recouvertes de résine montrant la précision de l'alignement.

- Une attaque d'Aluminium est effectuée dans une solution d'attaque d'Aluminium ($\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{CH}_3\text{COOH} + \text{HNO}_3$) pendant 2 minutes pour enlever l'aluminium (Figure II. 24.f) sauf dans les zones masquées par la résine (Figure II. 26).

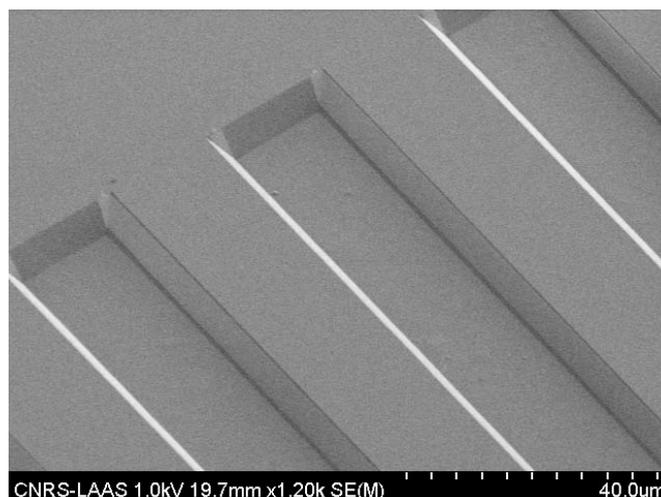


Figure II. 26: image par microscopie électronique à balayage montrant les facettes recouvertes d'Aluminium montrant la précision de l'alignement et la qualité de l'attaque d'Aluminium sur les extrémités.

- Attaque de la résine dans l'acétone, puis rinçage avec l'EDI et séchage à l'azote.
- Dépôt d'oxyde de silicium(SiO_2) pour éviter l'oxydation et la dégradation de l'aluminium en présence de l'air ou de l'eau, une couche de 500 nm est déposée par PECVD.

II.8.3. Précision de pointé

Nous avons souhaité enfin mesurer la précision du repérage spatial de microbilles fluorescentes obtenue avec les miroirs à une facette. Nous avons calculé le déplacement quadratique moyen (MSD, voir plus en détail en chapitre IV) de billes de $1\mu\text{m}$ fixées sur des surfaces traitées à la polylysine. Comme la particule ne bouge pas, son déplacement apparent est seulement lié à l'erreur de mesure de position spatiale σ :

$$MSD([t]) = 3\sigma^2$$

La valeur du MSD est 300 nm^2 , ce qui nous permet d'estimer une erreur de mesure de 10 nm suivant tous les axes.

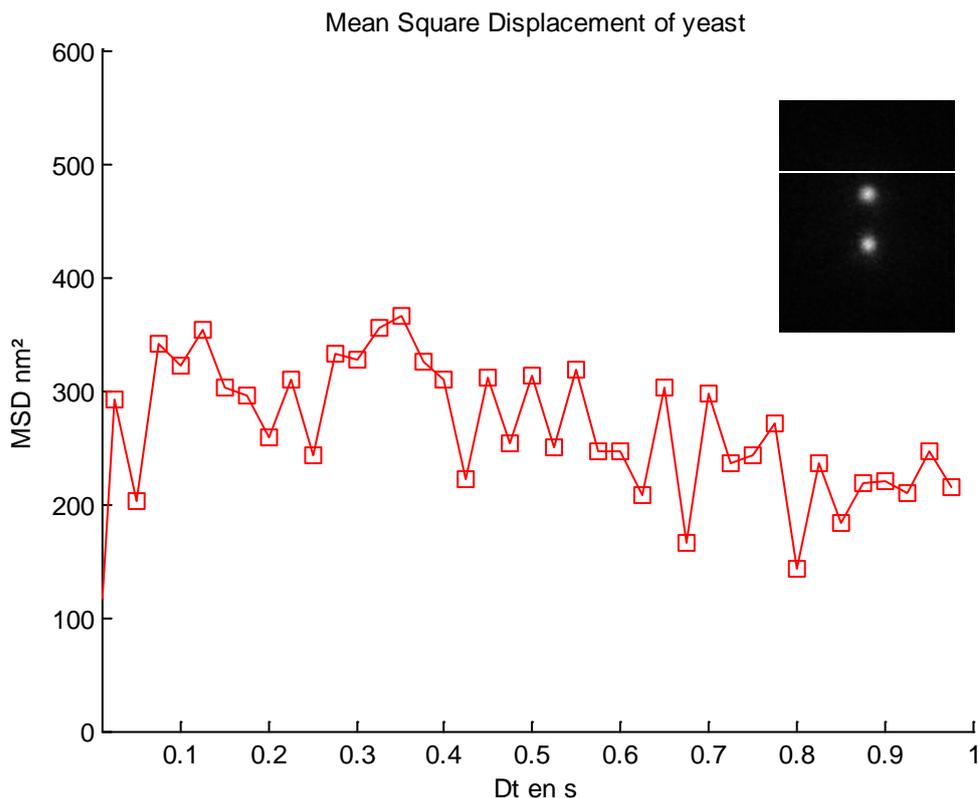


Figure II. 27: MSD pour une bille fixe de $1\ \mu\text{m}$ collée à la surface des micromiroirs. Et à droite l'image d'une bille fluorescente et de réflexion qui est de même intensité montrant la qualité de notre méthode.

Une fois obtenus ces systèmes fonctionnels, nous avons validé leur utilisation fonctionnelle pour l'observation de particules fluorescentes diffusant en milieu liquide, mais aussi pour l'observation de cellules vivantes.

II.8.4. Comparaison avec les miroirs en V

II.8.4.a Réduction du photoblanchiment

Nous avons d'abord constaté que les miroirs à une facette permettaient de diminuer le phénomène de photoblanchiment, qui correspond à la photodégradation des liaisons moléculaires responsables de la fluorescence. Le photoblanchiment est souvent attribué à la présence de dioxygène dissous par un processus d'annihilation triplet-triplet entre la molécule fluorescente et le dioxygène, la rendant définitivement non-fluorescente [3].

Le fait de placer des miroirs au dessus d'un échantillon réfléchit la fluorescence émise par l'objet, ce qui permet de réaliser les reconstructions 3D. Toutefois, la lumière d'excitation est également réfléchiée, ce qui expose d'autant plus la molécule aux radiations et accélère donc le phénomène de photoblanchiment. La nouvelle génération de nouveaux miroirs ne présente qu'une seule facette, ce qui se traduit par moins de réflexion et donc moins de photoblanchiment. C'est ce que nous avons voulu valider en observant des levures vivantes dont le noyau est marqué en fluorescence avec un temps d'acquisition de 500 ms. Après 20 secondes d'exposition avec la lampe à mercure (Figure II. 28), le photoblanchiment est multiplié par 4 avec les miroirs en V, et seulement par deux avec les miroirs à une facette, par rapport à une levure sur une lamelle de microscope. Autrement dit, cette technologie est mieux adaptée pour le suivi des cellules pendant de longues acquisitions.

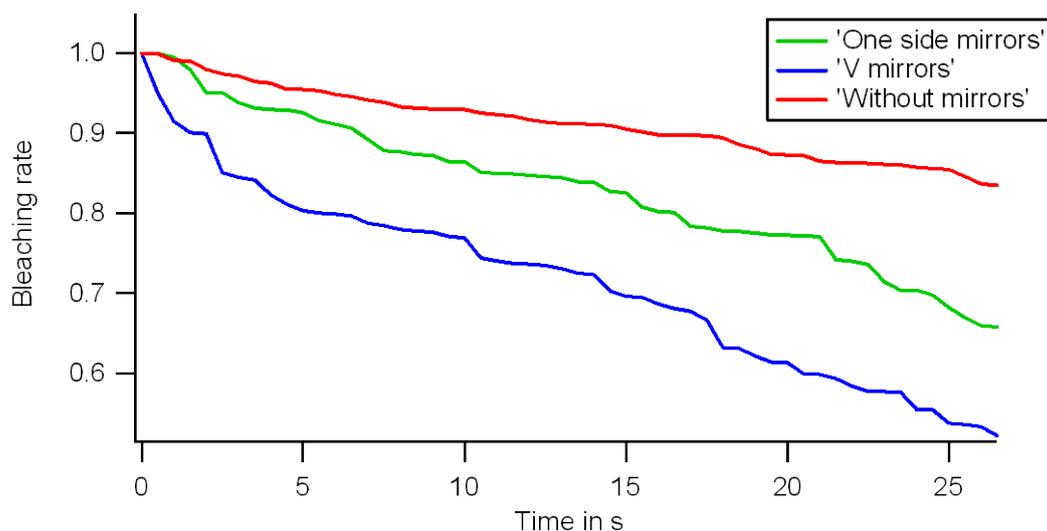


Figure II. 28 : a) le graphe en rouge est le photoblanchiment d'une cellule de levure sans l'utilisation des miroirs en V et en bleu se voit l'effet de la lumière réfléchissante sur l'augmentation du taux de photoblanchiment qui est de 2.1.

II.8.4.b Amélioration du contraste entre objet et réflexions pour les levures

L'utilisation des miroirs pour la visualisation en 3D suppose de collecter une bonne image de l'objet et de ses réflexions. Dans le cas des miroirs en V, nous avons constaté de manière presque systématique que l'objet était très diffus (Figure II. 29), et

le signal sur bruit d'un locus de chromatine pratiquement indiscernable. Ce problème provient très probablement de la présence des réflexions secondaires (Figure II. 21), qui augmente le bruit de fond sur l'objet. Aussi, nous avons presque toujours travaillé avec les deux réflexions pour remonter aux informations 3D. Cette approche n'est cependant pas favorable car les images réfléchies sont moins intenses que l'objet puisque la réflectivité des miroirs n'est pas parfaite.

L'image ci-dessus (Figure II. 29) illustre la différence entre les deux techniques : le suivi en 3D avec les nouveaux miroirs avec une facette se fait à partir de l'image de l'objet initial et d'une image réfléchie, tandis que dans la plupart des cas avec les miroirs en V le suivi en 3D est calculé à partir des réflexions ce qui ajoute une erreur sur les mesures. Nous ajoutons qu'avec la nouvelle technique l'intensité du point fluorescent est plus brillante que son entourage, ce qui améliore la résolution et la précision de l'algorithme de suivi.

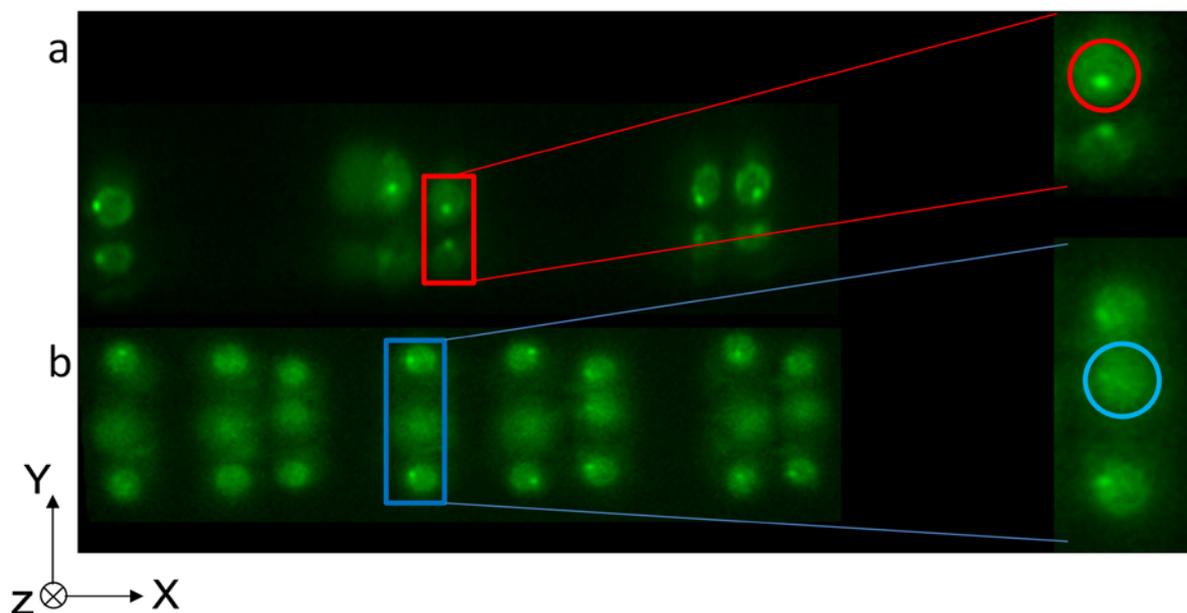


Figure II. 29 : Image de levures avec un miroir en V (a) et avec un miroir à une facette (b), montrant les améliorations obtenues avec cette deuxième génération de miroirs, liées à la meilleure image de l'objet, et la grande netteté du locus chromatinien et de son environnement nucléaire.

Nous avons finalement appliqué ces miroirs pour observer des cellules mammifères. Les premiers essais d'expérience sont encourageants avec deux

centromères marqués (Figure II. 30). Pour finaliser, il reste des optimisations à faire surtout au niveau de la dimension de la profondeur des canaux parce que les dimensions de cellules mammifères testées étaient de 15 μm de longueur et largeur et de 5 μm de hauteur.

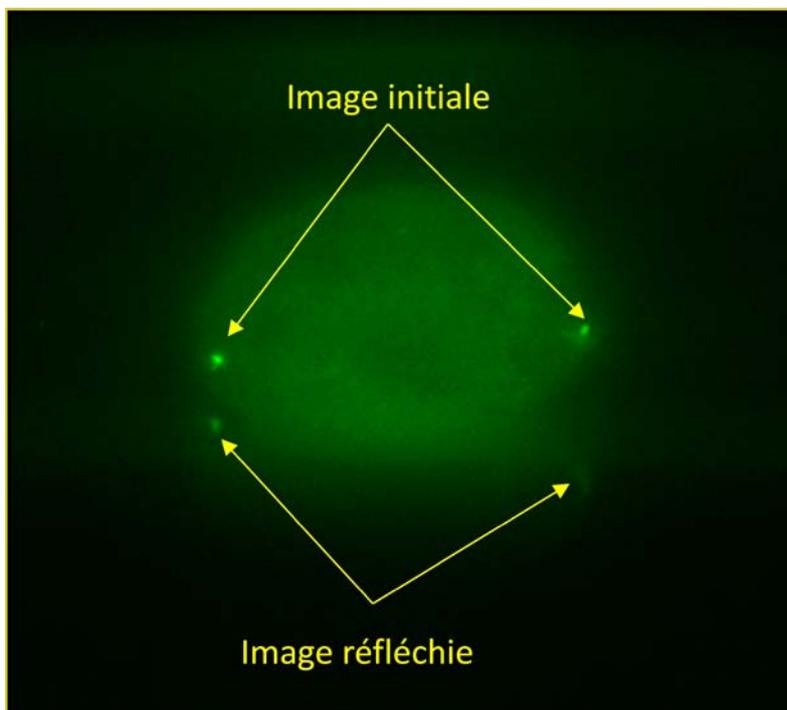


Figure II. 30: cellule mammifère contenant deux points marqués avec les réflexions

II.9. Conclusion

La technologie de microfabrication sur silicium est à la base de notre laboratoire sur puce dédié à l'imagerie en 3D dans des cellules vivantes. Notre technologie est adaptée à la microscopie à champ large et nécessite aucune modification sur le microscope. L'optimisation des paramètres liés à la technologie est indispensable pour améliorer la qualité des images obtenues. Ensuite, nous avons amélioré les miroirs en V en développant une nouvelle technologie des miroirs à une seule facette qui a divisé par deux le facteur de photoblanchiment et a donné un meilleur contraste.

Notre technologie 3D est adaptée pour étudier la dynamique de la chromatine en temps réel à l'échelle de la milli seconde. L'approche classique pour étudier les

chromosomes consiste à marquer avec des fluorophores des régions génomiques ciblées, et à observer par microscopie de fluorescence leur positionnement et leur comportement spatial au cours du temps. Les outils actuels de visualisation 3D avec la microscopie confocale dans la levure permettent d'atteindre des cadences d'acquisition de 1 s au mieux pour l'acquisition d'un seul gène. En outre, les performances du dispositif nous laissent atteindre une gamme temporelle quasiment inatteignable avec la microscopie confocale en visualisant le mouvement de loci chromosomiques sur le Chromosome III en 3D avec un intervalle de temps d'acquisition de 20 ms avec une erreur de positionnement de 27 nm et qui permet atteindre de fortes profondeurs de champ jusqu'à 10 μm .

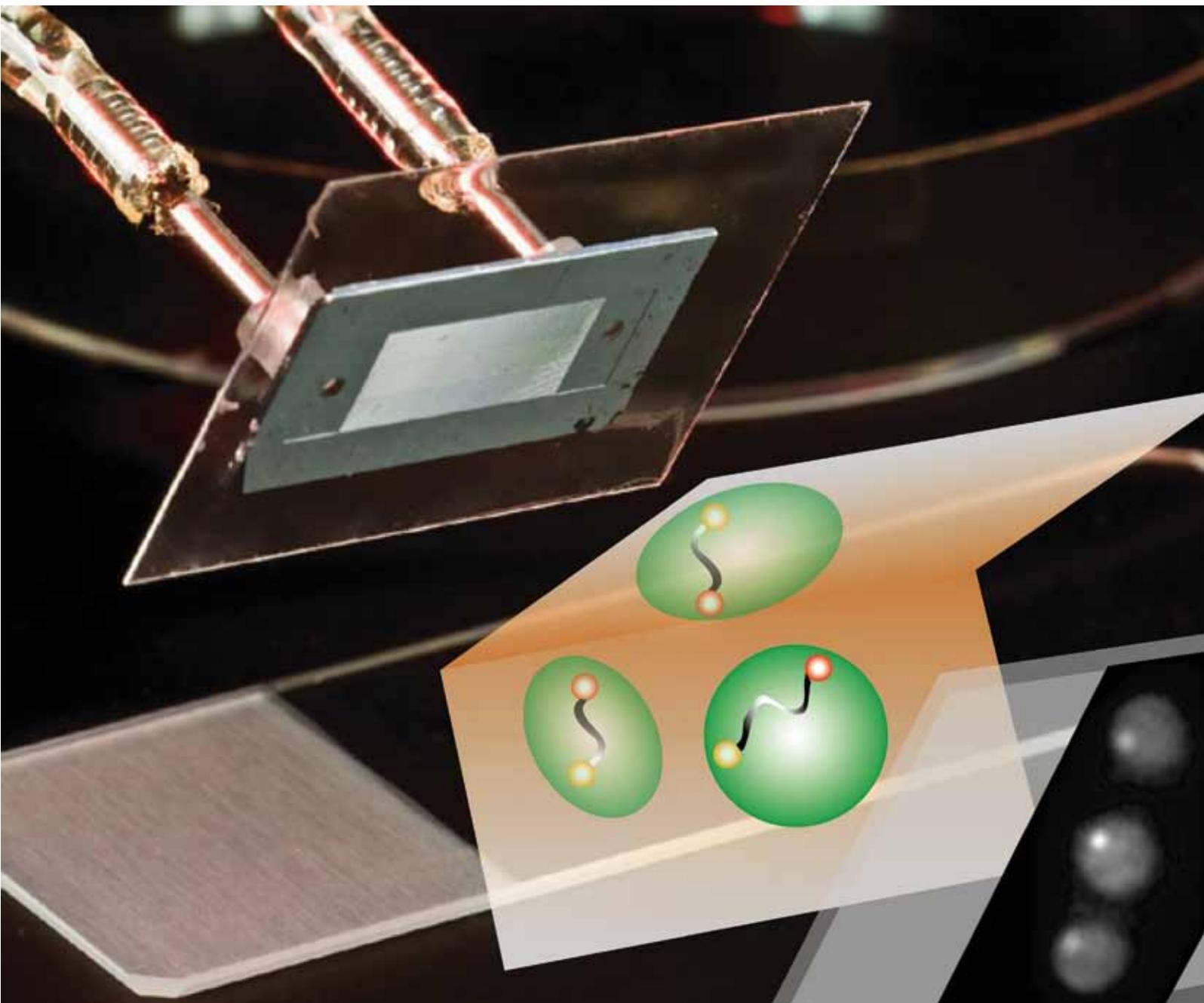
Article

Lab on a Chip

Miniaturisation for chemistry, physics, biology, & bioengineering

www.rsc.org/loc

Volume 9 | Number 21 | 7 November 2009 | Pages 3025–3164



ISSN 1473-0197

RSC Publishing

**Lab on a Chip launches
a new Methods section**

Bancaud
3D-microscopy using micro-mirrors
Schneider
Lipid bilayer patterns using sSAW



1473-0197(2009)9:21;1-W

Lab-on-Chip for fast 3D particle tracking in living cells†

Houssam Hajjoul,^{ab} Silvia Kocanova,^{cd} Imen Lassadi,^{cd} Kerstin Bystricky^{cd} and Aurélien Bancaud^{*ab}

Received 6th May 2009, Accepted 13th August 2009

First published as an Advance Article on the web 2nd September 2009

DOI: 10.1039/b909016a

We present a novel Lab-on-Chip technology for 3D particle tracking in living cells based on V-shaped micro-mirrors, which are used to observe fluorescent specimens from multiple vantage points, providing simultaneous stereo-images that can be recombined for 3D reconstruction. Our technology can be readily used with standard fluorescence microscopes, and we apply it to study chromatin dynamics using yeast strains with one or two GFP-tagged gene loci. Using an Andor EMCCD camera, loci are followed in 3D with inter-frame intervals of up to 10 ms and with an error of 27 nm per axis, yielding quantitative information on their dynamics with exquisite temporal spatial resolution.

Introduction

The continuously growing library of fluorescent probes that enables visualization of virtually any protein in living cells has made fluorescence microscopy a key tool in modern biology. New generations of microscopes make it now possible to record three-dimensional images over time providing quantitative information of molecular processes of life.¹ These techniques however have their shortcomings. 3D reconstruction is generally achieved by acquiring a collection of views of the same specimen, which is thus exposed to high doses of illumination that induce photobleaching and potentially trigger cellular photodamage. In addition, the acquisition of several views at each time point increases the time sampling, which can be minimized to ~ 1 s at best^{2,3} after careful optimization of the imaging settings.

A number of approaches have recently been proposed to perform fast and less damaging 3D tracking. A first class of instruments consists of dedicated confocal microscopes embedding multiple detectors, which are coupled to a feedback system for the dynamical tracking of fluorescent objects.^{4–6} These techniques reach microsecond time resolutions, but they are suited to track single particles one at a time. A second set of approaches, which involve some modifications of the microscope optical path, include bifocal microscopes,⁷ which simultaneously acquire two spatially separated images by insertion of a defocusing lens ahead of the camera, or astigmatic microscopes,⁸ which provide the full 3D position information owing to the introduction of a cylindrical lens in the emission path. These techniques were used *in vivo* with inter-frame intervals on the order of 50 ms.⁷ Alternatively, microfabricated pyramidal mirrors that are placed on fluorescent specimens and used with standard microscopes have been proposed for multiple vantage point imaging,⁹ and 3D particle tracking *in vitro*.^{10,11} Here, we present an integrated

Lab-on-Chip based on V-shaped micro-mirrors that are optimised for 3D tracking in living cells.

Lab on chip fabrication

Our technology is based on silicon wet etching. The process flow involves one single photolithography step performed on silicon wafers covered with an 85 nm nitride layer (blue representation in Fig. 1a). The photoresist pattern (green pattern in Fig. 1a) is then transferred to the nitride layer using reactive ion etching, which is subsequently used as a protective layer for silicon anisotropic wet etching with potassium hydroxide at 90 °C during 17 minutes. The geometry of the resulting V-grooves depends on silicon crystalline orientation, and we tested (100) and (110) oriented wafers. Then, an aluminium layer of 100 nm is evaporated (yellow coating in Fig. 1a), and 1000 nm of SiO₂ is deposited to avoid aluminium oxidation. The bottom dimension of the resulting V-shaped mirrors spans from 10 to 100 μm (Fig. 1b, upper panel), and the depth ranges from 3.6 μm to 36 μm , or 7 μm to 70 μm for (110) or (100) wafers, respectively. Finally, inlets and outlets are drilled in the silicon wafer using an ultrasound Disk Cutter, and the device is sealed with a glass coverslip coated with partially reticulated polydimethylsiloxane¹² (pink layer in panel 5 and 6 of Fig. 1a). Fluids can be conveyed in the V-grooves of the device, which thus serve as fluidic as well as optical components (Supplementary Movie 1).

3D particle tracking

When fluorescent beads are introduced in the Lab-on-Chip, two reflections through the mirrors appear on each side of the particle (Fig. 2a). Due to the tilt of the mirrors (Fig. 2a), reflections can be considered as stereo-images, *i.e.* views of the scene observed from a different vantage, and used to reconstruct the scene in 3D. Vertical displacements of the particle, which are difficult to trace with bright field microscopes,¹³ are indeed projected along the *y*-axis on the reflected images (Fig. 2a). Thus, our goal is to reconstruct the 3D picture based on stereoscopic views projected on the (*Oxy*) plane, as defined in Fig. 2. The 3D reconstruction scheme is purely geometrical and depends on one single parameter, namely the angle of V-shaped mirrors, which is defined by silicon crystallographic structure and hereafter denoted α (Fig. 2a).

^aCNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse, France

^bUniversité de Toulouse, UPS, INSA, INP, ISAE, LAAS, F-31077 Toulouse, France. E-mail: abancaud@laas.fr

^cUniversité de Toulouse, UPS, Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, F-31062 Toulouse, France

^dCNRS, LBME, F-31000 Toulouse, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Supplementary material which includes two movies. See DOI: 10.1039/b909016a

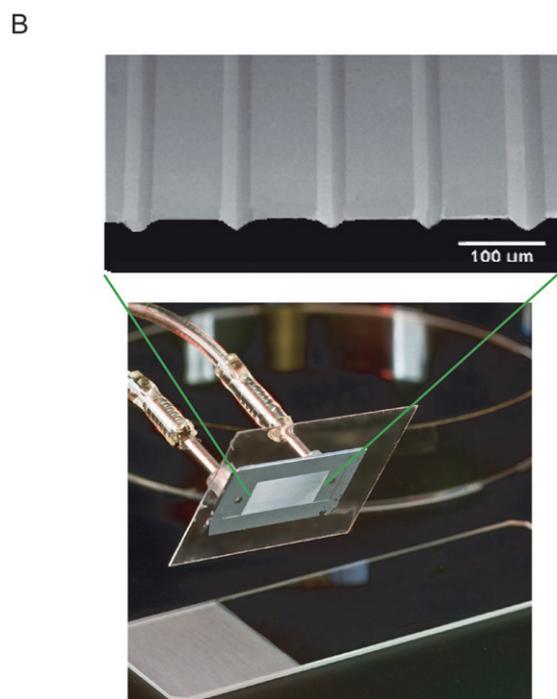
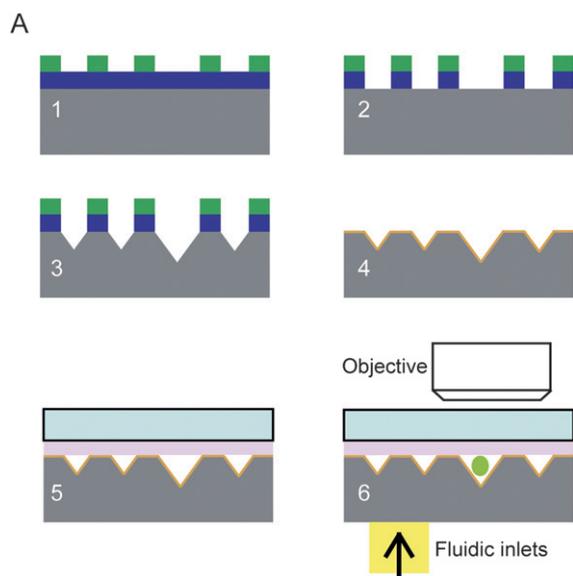


Fig. 1 Lab-on-Chip for 3D particle tracking. (a) Representation of the different technological process steps for V-shaped micro-mirrors fabrication. Panels 5 and 6 describe the integration of the system in order to use it with standard upright microscopes. Fluorescent specimens (light green spheroid) are conveyed in the grooves by fluidic actuation. Note that fluidic via are located at the extremities of the channels. (b) The upper panel represents a scanning electron micrograph of silicon V-grooves (scale bar = 400 μm). In the bottom panel, the integrated Lab-on-Chip, including fluidic inlets and outlets, is photographed. The microscope slide at the bottom of the picture serves as a scale (dimensions = 75*25 mm).

To solve the problem, it is convenient to introduce $\beta = \pi/2 - 2\alpha$. First, we compute the distance δy^1 along the y -axis between the two left hand side reflections of A1 and A2 as a function of the real separation Δy between A1 and A2:

$$\delta y^1 = \Delta y \sin(\beta) \quad (1)$$

Applying the same procedure to A1 and A3, which are separated by Δz and located on the same y coordinate, the distance δy^2 along the y -axis between their two reflections reads:

$$\delta y^2 = \Delta z \cos(\beta) \quad (2)$$

Eqs. 1 and 2 can be combined to solve the general situation of two points A1 and B separated by Δy and Δz :

$$\delta y^{total} = \delta y^1 + \delta y^2 = \Delta y \sin(\beta) + \Delta z \cos(\beta) \quad (3)$$

Thus, the vertical distance Δz between A1 and B is directly proportional to the lateral distance between their reflections:

$$\Delta z = \frac{\delta y^{total} - \Delta y \sin(\beta)}{\cos(\beta)} \quad (4)$$

The same computation can be carried out for the right hand side reflection, or for the left and right reflections (see Supplementary Material),[†] and, at each time point, three z -measurements are obtained, and their comparison provides a quantitative evaluation of their consistency.

System optimisation

Based on this consistency assay, we tested two micromirrors geometries obtained with (100) and (110) oriented wafers, and associated to $\alpha = 35.4^\circ$ and 54.7° , respectively. Fluorescent particles freely diffusing in the channels were observed, and their z -position was measured over time (Fig. 2b). The random nature of this movement enables us to sample nearly every configuration in the V-grooves, and thus to deduce the optimal 3D tracking conditions that were reached with 54.7° mirrors (Fig. 2c). High magnifications and high numerical apertures (NA) also improved 3D tracking consistency (Fig. 2d), and the discrepancy between the 3 z -measurements was minimized to 60 nm with a 100 X, NA = 1.3 objective. Notably, the decreased focal depth of high NAs lenses leads to dim reflected images in comparison to the object (Fig. 2d, upper panel). After this optical optimization of the Lab on a Chip, we used it for intracellular particle detection using a 100X objective with a numerical aperture of 1.0, which appeared to be a good compromise between high intensity reflections and accurate 3D tracking.

Application to intracellular imaging

Budding yeasts provide a powerful system to investigate chromatin dynamics *in vivo*, because specific chromosomal sites are easily tagged with bacterial operator sequences and visualised using GFP fused to the associated repressor protein.^{14,15} We focused on one of the smallest yeast chromosomes, Chr3, and compared the response of the HM loci, which are near the left and right telomeres, to the MAT locus, which is found midway along the longer right arm (Fig. 3a). Using our faceted micromirrors technology, chromatin dynamics were probed in 3D with maximum inter-frame intervals as fast as 10 ms. The bleaching rate is 2.1 fold increased in comparison to standard 2D imaging without mirrors because fluorophores are illuminated from

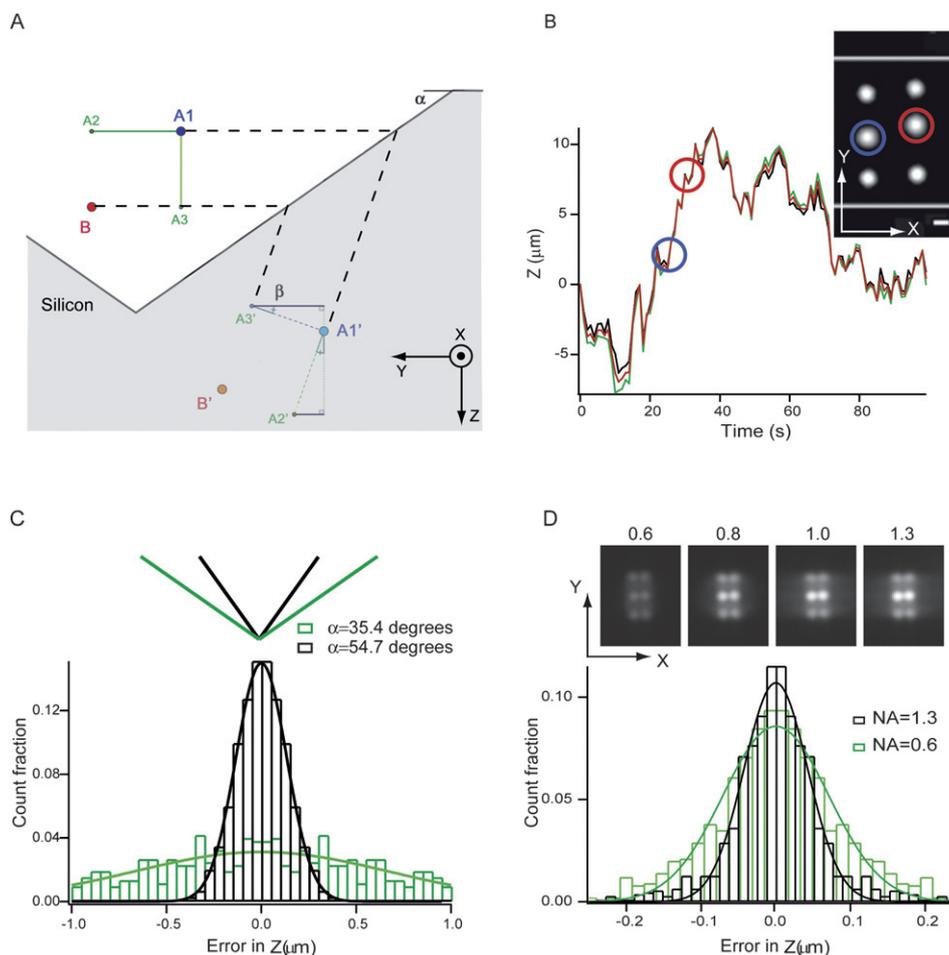


Fig. 2 3D reconstruction and optimization *in vitro*. (a) A model scene with two points A1 and B is represented. The geometry is defined as follows: (Ox) is parallel to the mirrors longitudinal axis, (Oy) belongs to wafer surface, and (Oz) is perpendicular to the wafer surface. Micro-mirrors, which are characterized by the angle α , are represented by solid black lines. 3D reconstruction is obtained by monitoring the distance along the (Oy) axis between the reflected images of A1 and B, which is proportional to their spacing in z (see Eq. 4). Note that we demonstrate in (Supplementary Fig. S1)† the accurate 3D reconstruction of a model scene defined by particles non-specifically adsorbed to the bottom surface of the fluidic channels. (b) The plot represents the z position over time of a $1\ \mu\text{m}$ fluorescent particle diffusing inside the Lab-on-Chip observed with a $20\times$ objective, as inferred from the relative position of the bead and its right side reflection, the bead and its left side reflection, and the left side and right side reflections (green, black and red curves, respectively). Note that 3D tracking can be performed for displacements along the z -axis as large as $\sim 15\ \mu\text{m}$ without moving any mechanical part of the microscope. The inset shows the fluorescent particle with its lateral reflections at two different moments, which are indicated by blue and red circles on the plot. The vertical lines correspond to the limits of the mirrors (scale bar = $5\ \mu\text{m}$). (c) Using a $20\times$ objective, the consistency of the z measurement is compared using 54.7° or 35.4° mirrors by plotting histograms of the difference between the 3 measurements obtained at each time point. Solid curves are Gaussian fits to the data, and their widths are $133\ \text{nm}$ ($n = 757$) for 54.7° and 35.4° micromirrors, respectively. (d) The upper panel shows a fixed fluorescent particle observed with a $100\times$ objective and numerical apertures of 0.6, 0.8, 1.0 and 1.3. The graph represents histograms of the difference in z measurements obtained with the $100\times$ objective and numerical apertures of 0.6 ($n = 1113$) and 1.3 ($n = 1189$), and their corresponding Gaussian fits associated to widths of $60\ \text{nm}$ and $87\ \text{nm}$, respectively (green and black curves).

two different directions due to the reflection of the mirrors (Supplementary Fig. S2).†

Approximating the nuclear volume to a sphere, the position of these three loci was scored relative to the nuclear periphery, showing an accumulation of HM loci close to the nuclear membrane (50% in region I, Fig. 3b) in agreement with previous analyses and the fact that heterochromatic loci tend to position near the nuclear periphery.^{16,17} In contrast, the MAT locus was mostly found in the nuclear lumen (61% in region III, $n = 18$), in concordance with recent studies.^{17,18}

Next, HM loci mobility was analysed with an inter-frame interval of 200 ms (Fig. 3c, left panel), and quantified based on

their mean square displacements (MSD), which indicates how far the gene travelled in a given time interval (Fig. 3c). For normal diffusion, the MSD increases linearly with time and the slope is proportional to the diffusion coefficient.¹⁹ A departure from this response, showing a power-law dependence of the MSD with time and referred to as anomalous sub-diffusion (see legend of Fig. 3), has been recently reported,² and this model appeared to accurately fit HM response in the 0.2–4 s time scale (green and red datasets in Fig. 3c). Anomalous coefficients γ of 0.34 ± 0.03 and 0.28 ± 0.03 in region 1 and 3, respectively, were obtained. We could also evaluate the apparent diffusion coefficient at short time points, *i.e.* the slope of the MSD onset, and we obtained

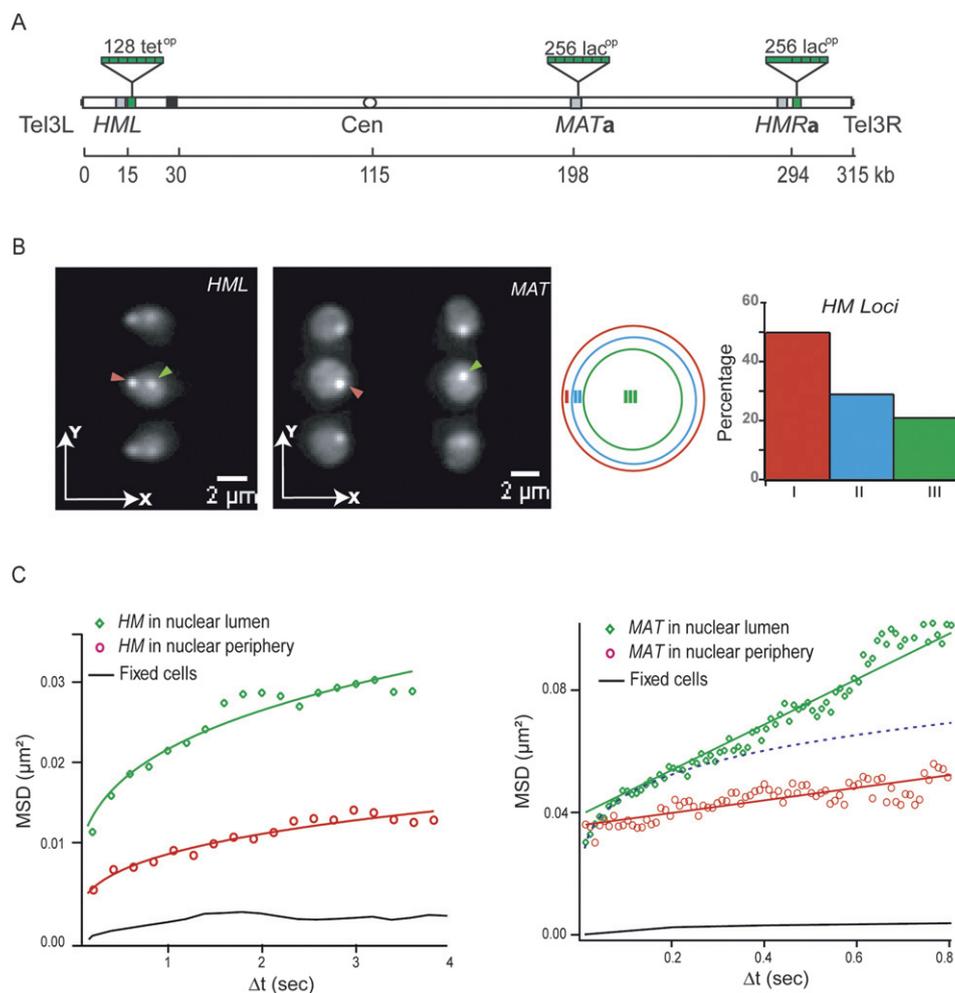


Fig. 3 3D chromatin dynamics observed in living budding yeasts. (a) Two strains have been used in which one or two chromosome loci have been tagged in chromosome 3 with TetO and LacO repeats (see Supplementary Material for details[†]). (b) Microscope image of budding yeast nuclei in which HML and HMR or MAT have been fluorescently tagged (left and right pictures, respectively). The nucleus is divided into three equal volumes compartments to characterize the preferred localization of these loci: Zone III is a sphere of diameter $0.693 \cdot R$, Zone II lies between $0.693 \cdot R$ and $0.874 \cdot R$, and Zone I is the peripheral volume of diameter larger than $0.874 \cdot R$. The histogram represents HM loci spatial distribution. Arrowheads in left images are color-coded according to the compartments in which loci diffuse. (c) MSD plot of HM loci when the locus is positioned in region I and region III (red and green datasets, respectively). The corresponding fits are obtained using an anomalous sub-diffusion model, *i.e.* $MSD \sim \Delta t^\gamma$ with γ the anomaly parameter that was ~ 0.4 for GAL genes.² In fixed cells, the motion of chromatin was nearly static (black dataset), and the y intercept of the MSD plot provides an estimate of the experimental tracking error,^{19,23} which was 27 nm per axis. MSD plot of MAT when the locus is positioned in region I and III (red and green datasets). In the nuclear lumen, MAT response is anomalous at short times (dashed line), and normal for $t > 200$ ms (solid green line), and it is linear throughout the time domain when loci are close to the nuclear membrane (solid red curve). Note that the measurement error is larger when MAT is close to the nuclear periphery because the nuclear envelope is stained, reducing the locus signal to noise ratio. For a visual comparison between HM and MAT dynamics, the fixed cells response is represented.

$1.0 \pm 0.6 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ and $0.5 \pm 0.2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ in region 1 and 3, in good agreement with previous studies.¹⁷

The response of MAT was highly dynamic, and its movement was recorded with inter-frame intervals of 10 ms (Supplementary Movie 2).[†] For time scales larger than 200 ms, the MSD was linear, and the diffusion coefficient was $14 \pm 1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ in the nuclear lumen and $3.3 \pm 1.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ close to the nuclear envelope (green and red datasets in Fig. 3c, right panel), thus ten-fold greater than the MSD recorded for HM loci. Interestingly, the movement of the tagged locus residing at the interior of the nucleus exhibited a non-linear departure for $t < 200$ ms associated to an anomalous coefficient of 0.21 ± 0.02 (dashed line in

Fig. 3c, right panel), which shows that large displacements occur for very small time lags. Because genomic transactions are mostly driven by diffusion in the chromatin context, this result indicates that chromatin is highly dynamic in a timescale relevant for molecular recognition events. This non-linear response was only observed in mammalian cells with 2D 2-photon microscopy and inter-frame intervals of 30 ms, which proved to be a powerful technique due to its low bleaching rate and high signal to noise ratio.²⁰ Its interpretation is reminiscent of universal behaviors observed in entangled polymer solutions, in which polymer chains diffuse by reptation.²¹ Due to the constraint imposed by the surrounding matrix, polymers adopt a tube conformation

and their motion resembles that of a snake crawling in a maze. Monomer motion is then characterized by anomalous subdiffusion associated to $\gamma = 0.25$ at short times scales, and by normal diffusion at longer timescales, *i.e.* $\gamma = 1$. This result hence suggests that fast 3D particle tracking can be used to assay chromatin fiber structure and dynamics at the molecular level *in vivo*, this question remaining one of the most challenging for the genome research community.

Conclusions

In this study we have designed a novel fully integrated Lab-on-Chip technology based on microfabricated mirrors that shows a great potential for 3D microscopy. In contrast to other 3D methods, it is readily adapted to track particles over large focal depth. Additionally, it is readily adapted to standard bright field microscopes and does not necessitate any modification of the optical light path. We demonstrate its performance for investigating nuclear organization in yeasts, unraveling the non-linear response of chromatin dynamics in yeasts at very short timescales. We believe that our technology will be useful for future 3D microscopy studies in yeasts, but also in other biological systems such as bacteria, for which 3D microscopy remains a technical challenge.²²

Experimental

Imaging set-up

We used an Olympus BX-51 upright microscope equipped with a 100 W mercury lamp, and a dichroic filter adapted to GFP observation (XF305-1-BX23). Note that fluidic access holes are drilled through the silicon in order to minimize the steric hindrance of our device in the microscope. Different microscope objectives were tested, including one air 20X (NA = 0.45), one air 50X (NA = 0.8) and one oil immersion 100X (NA = 0.6–1.3). Note that because high intensity reflections are required for 3D particle tracking in living yeasts, and optimal imaging settings were obtained with a numerical aperture of 1.0. All experiments were carried out at room temperature.

Images were captured with an Andor EM-CCD camera (DU-897), and optimal inter-frame intervals were reached by cropping regions of interest with the Andor iQ imaging software. Video sequences were subsequently treated with the open source software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Fluid flows were controlled using a pressure controller (Fluigent). For *in vitro* single particle tracking experiments, 1 μm fluorescent particles (Fluospheres) diluted 1000-fold in water were used, and time samplings were set to 100 or 200 ms. Note that our apparatus is readily adapted to parallel imaging since many objects, *i.e.* beads or cells, can be observed simultaneously in one V-groove of the device, as well as in the multiple parallel grooves that are etched in silicon.

Cell culture

Strains were grown to an early exponential phase of growth ($\sim 1 \times 10^6$ – 0.5×10^7 cells/ml) in YPD medium or YNB at 30 °C,

starting from a fresh overnight culture. Just prior to the experiment, they were washed once to reduce the autofluorescence of the media. Extreme care must be given to ensure that cells are at approximately equal stages of growth upon visualization and to differentiate stages of interphase. Cells were fixed using a 4% paraformaldehyde solution during 10 minutes, subsequently rinsed with phosphate buffer (pH = 7.4), and loaded into the device. Notably, fluorescent loci were heterogeneously stained in fixed cells, and we only selected bright loci because the tracking spatial accuracy is strongly dependent on the brightness of the fluorescent object.²³

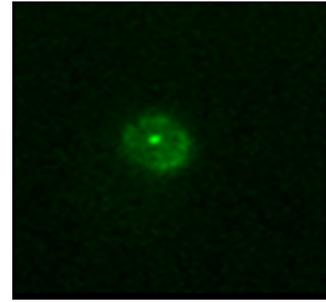
Acknowledgements

H. H. and I. L. acknowledge the French ministry of research for fellowships. We are grateful to Jan Ellenberg for critical comments, to David Villa for photographs, and to LAAS-CNRS clean room facility. This work was partly funded by the grant CNRS – Prise de Risque.

References

- 1 D. Gerlich and J. Ellenberg, *Nat. Cell Biol.*, 2003, **Suppl:S14–9**.
- 2 G. G. Cabal, A. Genovesio, S. Rodriguez-Navarro, C. Zimmer, O. Gadal, A. Lesne, H. Buc, F. Feuerbach-Fournier, J. C. Olivo-Marin, E. C. Hurt and U. Nehrbass, *Nature*, 2006, **441**, 770–773.
- 3 K. Bystricky, T. Laroche, G. van Houwe and S. M. Gasser, *J. Cell Biol.*, 2005, **168**, 375–387.
- 4 S. C. Xu, H. Cang, D. Montiel and H. Yang, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 32–35.
- 5 K. McHale, A. J. Berglund and H. Mabuchi, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 3535–3539.
- 6 G. A. Lessard, P. M. Goodwin and J. H. Werner, *Appl. Phys. Lett.*, 2007, **91**, 224106.
- 7 E. Toprak, B. Hamza, B. H. Blehm and P. R. Selvin, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 2043–2045.
- 8 H. P. Kao and A. S. Verkman, *Biophys. J.*, 1994, **67**, 1291–1300.
- 9 K. T. Seale, R. S. Reiserer, D. A. Markov, I. A. Ges, C. Wright, C. Janetopoulos and J. P. Wikswo, *J. Microsc.*, 2008, **232**, 1–6.
- 10 M. D. McMahon, A. J. Berglund, P. Carmichael, J. J. McClelland and J. A. Little, *acsNANO*, 2009, **3**, 609–614.
- 11 K. T. Seale, C. Janetopoulos and J. P. Wikswo, *acsNANO*, 2009, **3**, 493–497.
- 12 S. K. Sia and G. M. Whitesides, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 3563–3576.
- 13 M. Wu, J. W. Roberts and M. Buckley, *Exp. Fluids*, 2005, **38**, 461.
- 14 A. F. Straight, A. S. Belmont, C. C. Robinett and A. W. Murray, *Curr. Biol.*, 1996, **6**, 1599–15608.
- 15 P. Heun, T. Laroche, K. Shimada, P. Furrer and S. M. Gasser, *Science*, 2001, **294**, 2181–2186.
- 16 M. Gotta, T. Laroche, A. Formenton, L. Maillet, H. Scherthan and S. M. Gasser, *J. Cell Biol.*, 1996, **134**, 1349–1363.
- 17 K. Bystricky, H. Van Attikum, M. D. Montiel, V. Dion, L. Gehlen and S. M. Gasser, *Mol. Cell Biol.*, 2009, **29**, 835–848.
- 18 S. Nagai, K. Dubrana, M. Tsai-Pflugfelder, M. B. Davidson, T. M. Roberts, G. W. Brown, E. Varela, F. Hediger, S. M. Gasser and N. J. Krogan, *Science*, 2008, **322**, 597–602.
- 19 W. F. Marshall, A. S. Straight, J. F. Marko, J. Swedlow, A. Dernburg, A. F. Belmont, A. W. Murray, D. A. Agard and J. W. Sedat, *Curr. Biol.*, 1997, **7**, 930–939.
- 20 V. Levi, Q. Ruan and E. Gratton, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 2919–2928.
- 21 M. Doi and S. F. Edwards, *The theory of polymer dynamics*, Oxford University Press, New York, 1987.
- 22 M. Thanbichler and L. Shapiro, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, **6**, 28–40.
- 23 D. S. Martin, M. B. Forstner and J. A. Käs, *Biophys. J.*, 2002, **83**, 2109–2117.

Chapitre III



Optimisations des conditions d'imagerie

III.1. Introduction

Dans ce chapitre sont décrites les démarches d'optimisation des conditions d'imagerie dans le but d'atteindre de grandes cadences d'acquisition en microscopie de fluorescence de cellules vivantes, et ainsi développer un outil d'étude quantitatif des processus biologiques *in vivo*. Dans la première partie, nous revenons sur les différents composants optiques utilisés en microscopie de fluorescence, puis nous explicitons comment chaque élément a été optimisé dans le contexte de l'observation des mouvements de la chromatine dans des levures vivantes.

III.2. La microscopie de fluorescence

III.2.1. Historique

La microscopie de fluorescence a été inventée il y a près d'un siècle, lorsque les microscopistes ont réalisé des expériences avec la lumière ultraviolette pour augmenter leur résolution spatiale. Les premières observations ont été limitées aux spécimens qui sont naturellement fluorescents. Rapidement, des colorants fluorescents pour la coloration des tissus et des cellules ont été étudiés. Mais il a fallu attendre les années 1950 pour que la microscopie à fluorescence devienne populaire, quand Coons et Kaplan [89] ont présenté une technique de marquage des anticorps avec un colorant fluorescent pour étudier les interactions anticorps-antigène.

Dans les années 1960, Osamu Shimomura débute l'étude de la méduse bioluminescente "Aequorea victoria" sans se douter de la révolution scientifique que cela va provoquer. Trente ans plus tard en 1994, Martin Chalfie concrétisera l'idée de réaliser des protéines de fusion fluorescentes en rendant fluorescents la bactérie *Escherichia coli* et le ver *Caenorhabditis elegans* [90]. Aujourd'hui, les scientifiques sont capables d'étudier de nombreux processus biologiques grâce aux travaux de Roger Y. Tsien, obtenus par mutation de gène de la GFP. Le bleu, le cyan et le jaune viennent ainsi compléter le vert naturel de la GFP de la méduse. Une autre protéine naturelle, DsRed, rougeâtre comme son nom l'indique, est ensuite découverte chez un organisme marin. Le prix Nobel de chimie 2008, décerné aux découvertes de protéines fluorescentes, atteste d'une manière évidente l'importance de ce travail. Au final, l'ensemble des protéines fluorescentes offre aujourd'hui la possibilité d'observer de manière directe dans une cellule vivante et en temps réel plusieurs partenaires impliqués dans une transaction biologique. Dans la suite, nous reprenons quelques éléments concernant la microscopie de fluorescence, et sur les techniques de suivi de particules uniques. Puis, nous montrerons comment nous avons optimisé les paramètres de notre microscope pour sonder la dynamique de la chromatine sur une large gamme temporelle.

III.3. Notions sur la physique de la fluorescence

Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée par un photon incident caractérisé par une énergie en résonance avec une transition électronique, elle bascule vers un niveau énergétique S_1 d'énergie supérieure à l'état S_0 (Figure III. 1). La durée de vie de l'état excité est de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-10} s. Pendant cette période une partie de l'énergie est dissipée à cause des relaxations d'énergie vibrationnelle. La transition donnant naissance à un photon de fluorescence va donc se faire à partir d'un niveau d'énergie S_1' inférieur à S_1 vers l'état S_0 . Du fait de ces pertes d'énergie, les photons émis par fluorescence ont une énergie inférieure à celle des photons incidents, et donc selon une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière d'excitation.

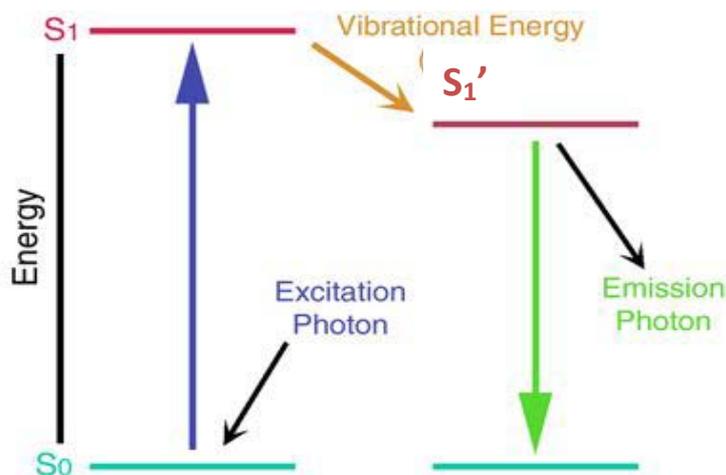


Figure III. 1: un photon absorbé induit le basculement de la molécule fluorescente vers un état électronique d'énergie plus grande (flèche bleue), et elle relaxe vers son état fondamental en émettant un photon d'énergie inférieure, qui est capté sélectivement avec des filtres optiques.

Un fluorophore excité par de la lumière bleue émet par exemple dans le vert (décalage de Stokes). En réalité, comme on le voit sur la figure Figure III. 2, il existe une gamme de longueurs d'onde où l'on peut exciter la molécule (spectre d'excitation), et la fluorescence émise est également distribuée sur un spectre large de longueurs d'onde (spectre d'émission).

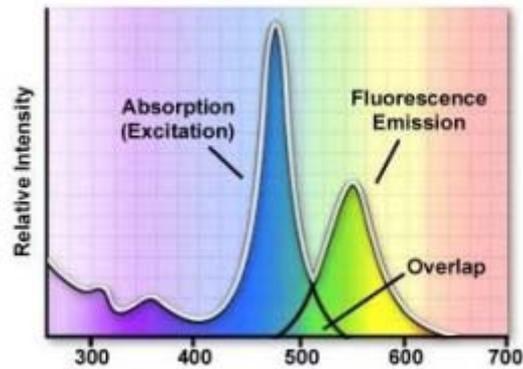


Figure III. 2 : Profil caractéristique des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule. L'émission a lieu à une longueur d'onde plus élevée.

III.4. Composants du microscope à fluorescence

III.4.1. Principe des cubes dichroïques

Un composant essentiel des microscopes à fluorescence est le cube dichroïque, qui permet d'observer sélectivement la lumière de fluorescence en s'affranchissant de l'excitation. La lumière d'excitation est envoyée depuis une source vers l'échantillon (Figure III.3). Si la source n'est pas monochromatique, on sélectionne une partie de son spectre par un filtre d'excitation. Cette lumière filtrée est ensuite réfléchiée vers l'échantillon par le miroir dichroïque, qui a pour rôle de séparer les chemins des lumières d'excitation et de fluorescence.

Les miroirs dichroïques sont caractérisés par une longueur d'onde λ_0 , qui correspond à une transmission de 50 %. Le miroir reflète la lumière de longueurs d'onde inférieure à λ_0 et transmet au-dessus, et, idéalement, λ_0 est choisie à l'intersection des spectres d'excitation et d'émission. Notons toutefois qu'un miroir dichroïque n'est pas aussi performant qu'un filtre optique dans la mesure où sa sélectivité en réflexion ou en transmission atteint au mieux 95 %.

Aussi, il est essentiel d'utiliser un filtre, dit d'émission, devant le capteur optique afin de collecter spécifiquement la lumière de fluorescence. Remarquons au passage que le filtre d'excitation et le filtre d'émission ont des propriétés spectrales

opposées, car il est nécessaire de couper les basses longueurs d'onde à l'excitation, et de ne garder que les hautes longueurs d'onde à l'émission, le miroir dichroïque étant situé entre ces deux barrières spectrales.

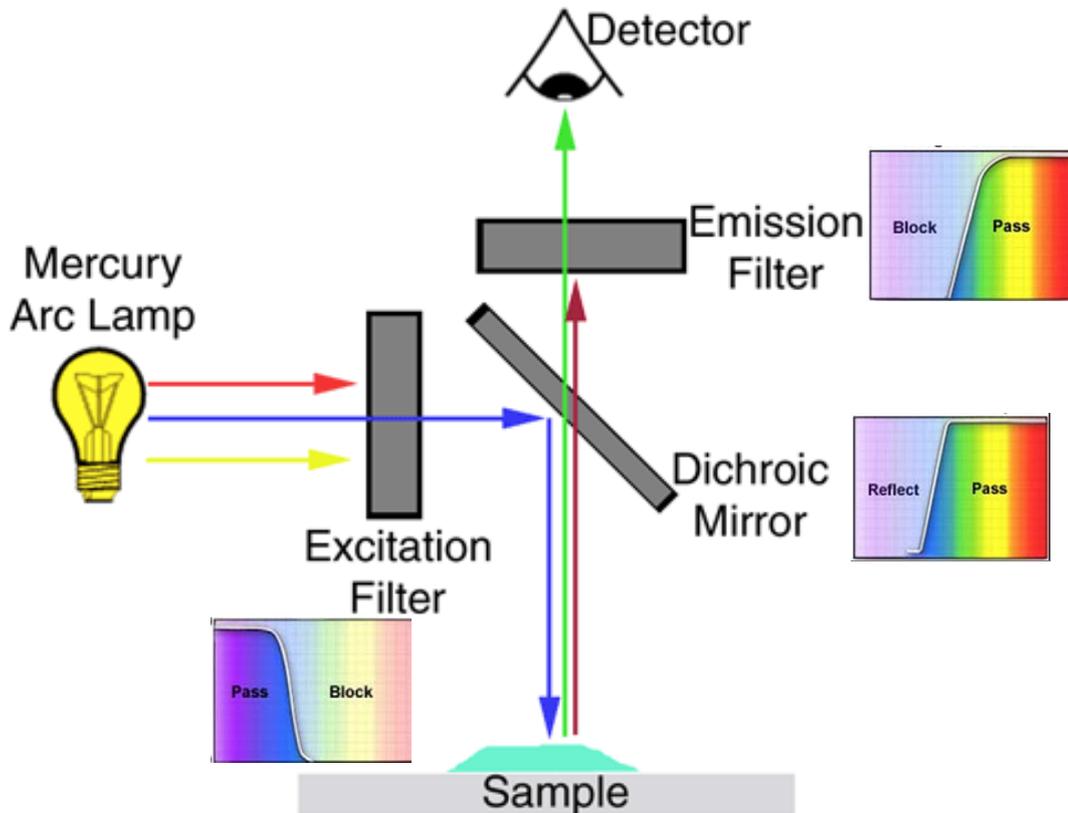


Figure III. 3: un microscope comprend une source lumineuse dont le rayonnement est filtré en longueur d'onde par le filtre d'excitation. Ce faisceau est dévié vers l'échantillon par un miroir. Ce rayonnement émis est sélectionné ensuite par un filtre d'émission avant d'arriver à un détecteur. Schéma des caractéristiques spectrales d'un filtre d'excitation, d'émission et d'un miroir dichroïque, l'ensemble permettant de sélectionner la lumière de fluorescence émise par l'échantillon.

III.5. Microscopes optiques à fluorescence

Les microscopes optiques à fluorescence en champ large comportent, en plus du cube dichroïque, un jeu de lentilles de collimation intégré afin d'envoyer une lumière homogène sur l'échantillon, et de faire l'image de l'objet sur une caméra/œil (Figure III.3). Un objectif de microscope permet de zoomer avec plus ou moins de précision sur l'objet d'intérêt, et il renvoie la lumière de fluorescence «à l'infini», c'est à dire

que l'on peut changer de cube dichroïque sans avoir à changer les réglages optiques des lentilles de collimation. Ainsi, plusieurs cubes dichroïques sont intégrés sur un même appareil afin d'observer différents fluorophores ciblés.

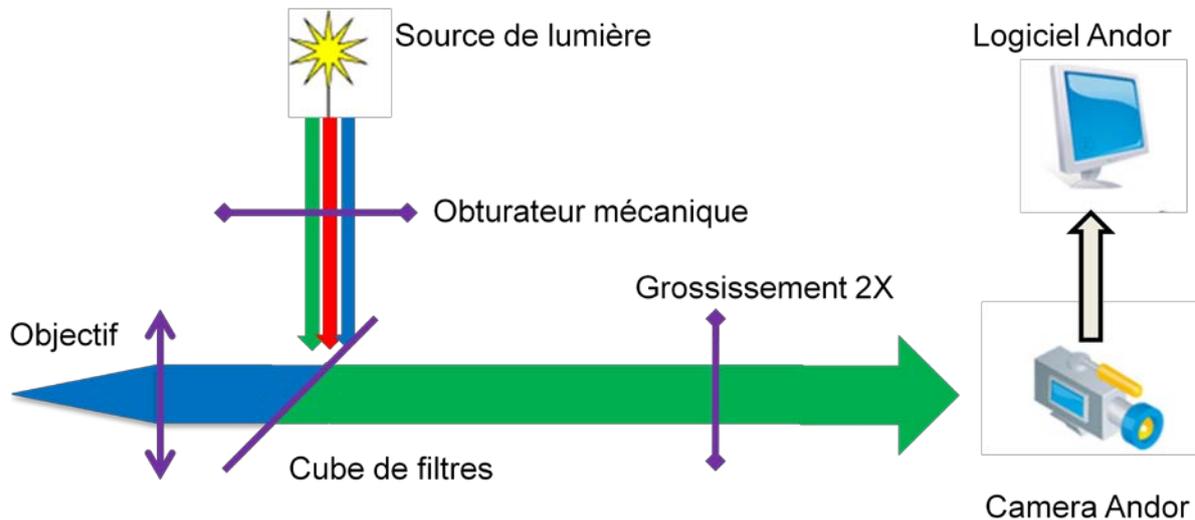


Figure III. 4 : Schéma montrant toutes les parties du microscope à épifluorescence et les points qu'on peut modifier pour optimiser les conditions d'imagerie.

On peut simplifier le montage optique en décrivant les différents éléments essentiels d'un microscope optique : la source, l'optique de collimation en entrée, le miroir dichroïque, l'objectif, l'optique de collimation en sortie, et la caméra (Figure III. 4). Dans la suite, nous détaillons les composants sur lesquels nous avons fait un effort expérimental pour optimiser la vitesse d'acquisition de notre microscope.

III.6. Optimisation des conditions d'imagerie pour le suivi de particules

Revenons d'abord sur la notion du critère d'Abbe, qui définit la résolution spatiale en imagerie classique (Figure III. 5). En caractérisant la tâche de diffraction de deux objets, Abbe a en effet montré qu'ils ne sont pas discernables dès lors que leur distance inférieure à $\lambda/2NA$ où NA est l'ouverture numérique de l'objectif et λ la

longueur d'onde. Dans notre cas, le pic d'émission de la GFP est à 520 nm, et l'ouverture numérique de notre objectif est de 1,4. Le critère d'Abbe donne une résolution de 185 nm. Les techniques d'imagerie de particules individuelles permettent toutefois de largement dépasser ce critère. En effet, un objet individuel isolé se présente sous la forme d'une tache de diffraction, souvent assimilée à une gaussienne, que l'on peut positionner avec une précision bien inférieure à la taille du pixel de la caméra.

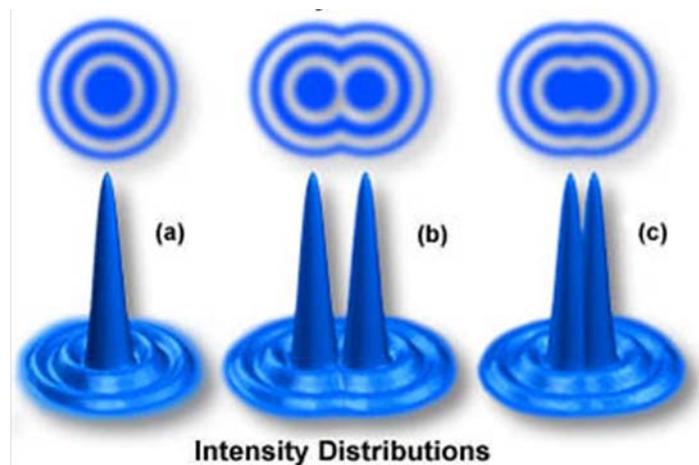


Figure III. 5: a) En effet, du fait de la diffraction, l'image d'un point n'est pas un point, mais une tache (la tache d'Airy ou plus généralement la fonction d'étalement du point – PSF). b) l'image de deux points distincts mais voisins auront pour images deux taches. c) ces deux points ne seront plus distingués, dès lors que leur distance est inférieure à $\lambda/2NA$.

Pour parvenir à de telles performances, il est nécessaire de développer un banc optique performant afin de collecter le plus grand nombre de photons issus de la cible fluorescente, et d'améliorer le rapport signal/bruit. Pour définir la meilleure façon d'optimiser la résolution spatiale de notre système, revenons sur deux travaux ayant évalué la limite théorique de précision de positionnement.

III.6.1. Limite de résolution pour une particule unique

III.6.1.a. Approche de Thompson

En approchant la tâche de diffraction PSF par une gaussienne en deux dimensions, une approche statistique fondée sur la méthode des moindres carrés a permis d'extraire une approximation analytique décrivant l'erreur de localisation d'un point fluorescent [91].

$$\langle (\Delta x^2) \rangle = \frac{s^2}{N} + \frac{a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \quad \text{Équation III.1}$$

où Δx désigne l'écart-type des estimations de la position de la cible, s l'écart-type de l'image diffractée de la cible, a est la taille effective d'un pixel du détecteur, N le nombre total des photons collectés, et b l'écart-type du bruit de fond. La première information essentielle de cette équation est que la précision de positionnement varie comme l'inverse du nombre de photons collectés. Cette équation précise en outre que la taille des pixels d'une caméra doit être judicieusement sélectionnée pour précisément localiser un objet. Evidemment, la maximisation du nombre de photons collectés ne peut être atteinte qu'au prix d'acquisitions les plus longues possibles, car le taux d'émission d'un fluorophore n'est pas infini. Ainsi, Chu et collaborateurs ont réalisé des acquisitions de 500 ms sur une seule molécule de Cy5, et ils ont collecté $1,7 \cdot 10^5$ photons et obtenu une résolution spatiale de 0,3 nm [92].

III.6.1.b. Approche d'Ober

En 2004, Ober et al ont développé une méthode théorique de localisation qui traite la PSF comme une fonction d'Airy (au lieu d'une gaussienne) et utilise un estimateur statistique de Fisher pour évaluer la position la plus vraisemblable d'un objet [93]. Cette stratégie semble être mieux adaptée lorsque le régime de collection des photons suit une distribution de Poisson. Ils ont montré que la limite de précision de localisation est donnée par

$$\langle (\Delta x^2) \rangle = \frac{\lambda_{em}}{2\pi N_a \sqrt{\gamma A t}} \quad \text{Équation III.2}$$

où λ_{em} désigne la longueur d'onde d'émission de la molécule, N_a l'ouverture numérique de l'objectif, γ l'efficacité du système optique, A le taux d'émission de la molécule unique, et t le temps d'acquisition. Cette équation met en avant qu'une grande précision optique est atteinte au prix de longs temps d'acquisition, en ayant optimisé l'ouverture numérique des optiques et la transmission de lumière à travers le système optique.

A partir de là, revenons en suivant le chemin optique de la lumière sur les différents éléments de notre montage tels qu'ils sont décrits dans la Figure III.4.

III.6.2. Source de lumière

Une lampe à mercure de puissance 100 watt a été utilisée pour l'essentiel de nos expériences. L'intensité d'excitation à 470 nm est de $7,53 \cdot 10^{-7} \text{ W}/\mu\text{m}^2$, 100 fois plus petite que la valeur avec laquelle les cellules poussent normalement [58]. Cette solution n'est pas optimale dans la mesure où la puissance d'émission est faible à 470 nm (courbe grise dans la figure III.6), et que l'on ne peut pas asservir simplement la puissance débitée. Une solution plus performante a été mise en œuvre à la fin de notre travail de thèse fondée sur une technologie à diode laser (LED), dont la puissance à 470 nm est commandée et nettement plus grande (courbe cyan dans figure III.6).

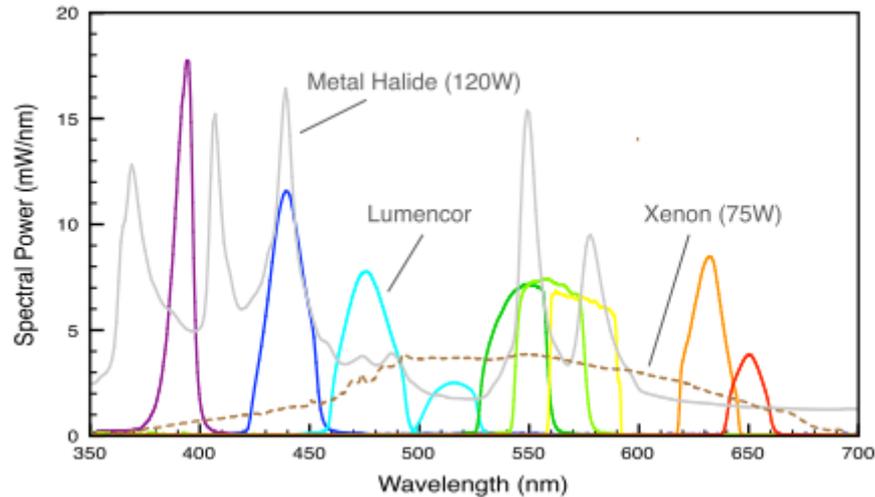


Figure III. 6 : Comparaison de trois sources de lumière d'excitation. A noter qu'avec les nouveaux systèmes à Led, on peut éclairer avec une puissance de 350 mW, ce qui est comparable avec les sources laser.

III.6.3. Obturateur mécanique

Pour l'acquisition de films « lents », c'est à dire avec des temps d'acquisition au-delà de 200 ms, nous avons utilisé un smart shutter de « Sutter instruments » pour éviter les problèmes de photoblanchiment et photosaturation. Cet obturateur est synchronisé avec la caméra d'acquisition.

III.6.4. Filtres

Nous avons constaté qu'il s'agit d'un point clé pour améliorer l'efficacité du débit de lumière sur le microscope. Dans notre cas, l'EGFP a un pic d'excitation théorique à 490 nm et d'émission à 510 nm. Dans la levure, l'absorbance est décalée vers 470 nm, et nous avons choisi un filtre d'excitation dont le pic est à 470 nm avec une bande de 40 nm et un filtre d'émission avec un pic à 525 nm et a une bande de 25 nm. Le dichroïque a une valeur de transition de 495 nm. Ce cube est le set 38 HE de chez ZEISS (Figure III. 7).

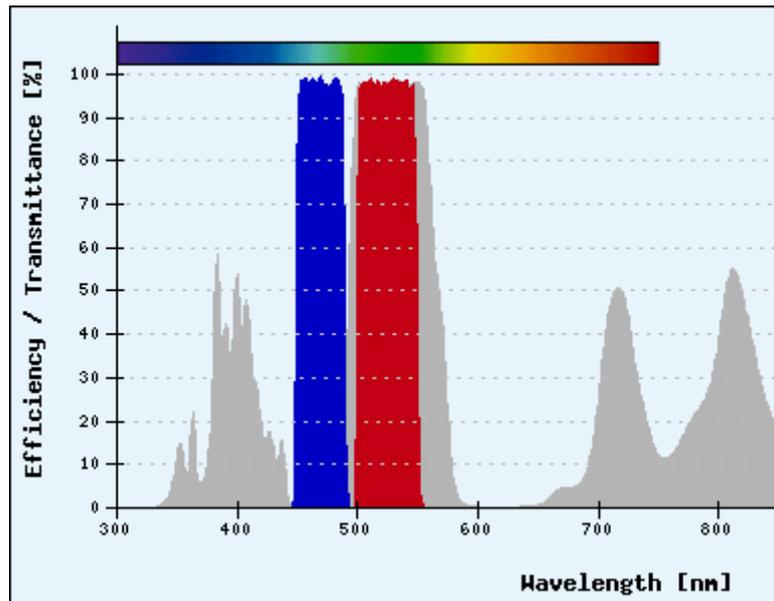


Figure III. 7 : Cube de filtres : en bleu ce sont les longueurs d'excitation qui arrivent à l'échantillon, en rouge ce sont les longueurs d'ondes d'émissions qui sont émises par l'échantillon et pourraient être détectées par la caméra.

III.6.5. Ouverture numérique et le grossissement

L'efficacité de la collection de la luminosité par un objectif est proportionnelle à l'ouverture numérique NA et au grossissement M selon $E \propto NA^4/M^2$ [94]. Ainsi, les lentilles de haute NA sont cruciales, du fait de l'évolution en puissance 4 de la luminance. Cette augmentation affecte d'ailleurs le paramètre N dans l'équation 1 et NA dans l'équation 2, ce qui résulte en une diminution de l'erreur de localisation. Nous avons utilisé un objectif de 100 X avec ouverture numérique de 1.4 pour collecter plus de photons et diminuer l'erreur de localisation.

Notons qu'une lentille de grossissement variable de 1, 1.25, 1.6 et 2 a été ajoutée avant la caméra. Même si l'ajout de ce composant, qui n'est pas parfaitement transparent optiquement, ne peut que réduire la quantité de lumière reçue par la caméra, il nous est apparu utile pour l'accélération des cadences d'acquisition.

III.6.6. Caméra EMCCD

Nous avons choisi la technologie EMCCD pour la caméra. Les EMCCD sont actuellement les meilleures solutions pour détecter de faibles flux lumineux, du fait de l'intégration d'un registre de multiplication analogique sur le capteur. Un capteur CCD est composé d'une zone active d'imagerie (photodiode carré) et d'un registre de lecture. La photodiode est formée d'un capteur de lumière en silicium, qui stocke les électrons dans des puits de potentiel. A la fin de l'acquisition, les photoélectrons accumulés dans les pixels sont transmis de manière séquentielle, ligne par ligne, dans le registre de lecture. Cette dernière étape est lente, et constitue la principale limitation des caméras EMCCD. Notons que l'intégration d'un registre de gain dans les EMCCD permet de multiplier le signal par un gain M sans augmenter le bruit.

Nous avons utilisé un modèle Andor « Du 885 » refroidi à une température de -70 °C. Cette caméra a une efficacité quantique, la probabilité de détecter un photon d'une longueur donnée, de 65 % et la taille de pixel est de $8*8 \mu\text{m}^2$. Nous avons testé un nouveau mode d'acquisition pour l'imagerie rapide développé par Andor appelé le "cropped mode" (Figure III. 8), qui consiste à masquer l'essentiel du capteur CCD et à transférer très spécifiquement les photons ciblés avec une perte de temps minimale de rafraîchissement du capteur. Nous avons comparé nos résultats avec une caméra CMOS nouvelle génération de Photron. Ces deux dispositifs nous ont permis de faire des films avec des acquisitions de 1 ms avec un signal sur bruit médiocre. Aussi, nous avons constaté qu'il n'était pas pertinent avec les technologies actuelles de viser des grandes vitesses supérieures à ~ 10 ms.

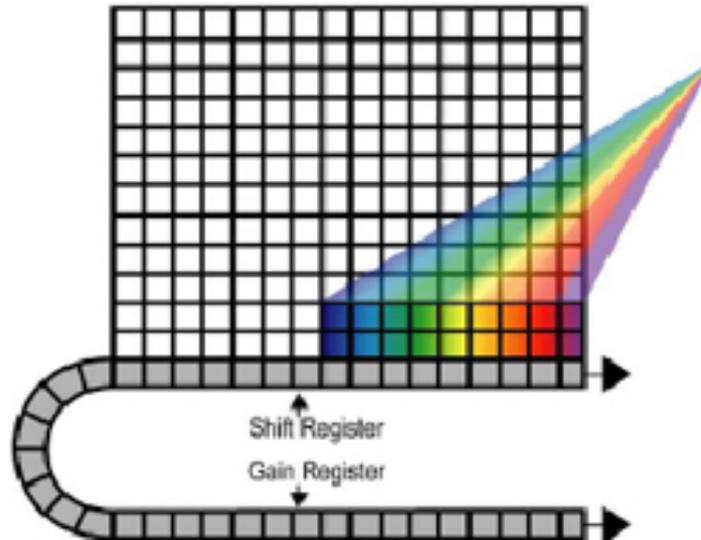


Figure III. 8: *Cropped sensor mode est une méthode efficace pour augmenter le temps d'acquisition des films avec de l'imagerie rapide.*

III.6.7. "Binning"

Le "binning" est le processus de fusion de la charge collecté des pixels adjacents dans un CCD au cours de lecture. Ce processus est effectué avant la numérisation et l'amplification du signal dans les circuits par le contrôle des registres à décalage série et parallèle. Les deux principaux avantages du "binning" sont un meilleur rapport signal/bruit (SNR) et la capacité d'augmenter la fréquence des trames, mais au détriment de la résolution spatiale réduite, dans le cas des caméra CCD.

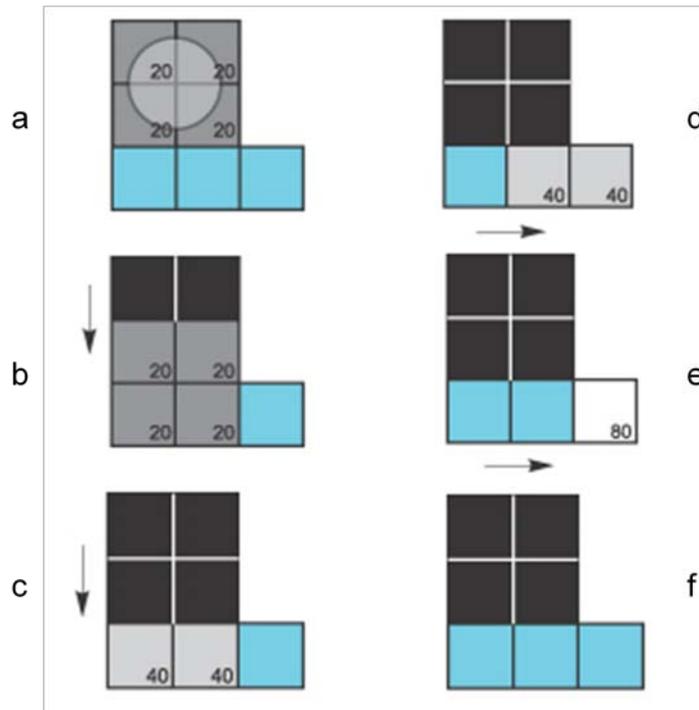


Figure III. 9: a) schéma illustrant le "binning", a) suite à une exposition de quatre pixels du CCD à la lumière il y aura la création de 20 électrons dans chacun des quatre pixels. b) un transfert vertical en bas des charges vers le registre de lecture. c) un nouveau transfert des charges en bas d'où on aura 40 électrons. d) un transfert horizontal des 40 électrons du registre en série vers l'amplificateur de lecture. e) un nouveau transfert horizontal vers l'amplificateur de lecture des 40 électrons restants pour en avoir 80 électrons, la somme des 4 pixels de 20 électrons. f) ensuite, cette charge est transférée du registre de série vers l'amplificateur de sortie où il est converti à une tension avant d'être numérisé.

Dans l'exemple de "binning" 2*2 (Figure III. 9), la zone de quatre pixels adjacents est combinée en un seul pixel et la vitesse est deux fois plus rapide. Le rapport signal / bruit a été multiplié par un facteur quatre, mais la résolution de l'image est diminuée de 50 %.

Le "binning" est principalement utile pour augmenter le signal sur bruit en réduisant la durée d'exposition qui peut endommager les cellules en causant du photoblanchiment. Parce qu'il augmente le rapport signal/bruit, le "binning" est intéressant pour des applications à faible niveau lumineux dans des cas où la résolution est peu importante.

III.6.8. Taille du pixel

Dans l'équation (III.1), « a » représente la taille effective d'un pixel qui signifie la taille du pixel de la caméra CCD divisée par le grossissement. Le changement du grossissement en utilisant la même caméra affecte la taille du pixel. Dans l'article [95], les auteurs ont comparé plusieurs tailles des pixels et ont trouvé qu'une taille inférieure à 100 nm est requise pour une bonne précision. Dans notre cas, on utilise le "binning" 2*2 qui augmente la taille du pixel à 162,6 nm. Grâce à la lentille de grossissement intermédiaire réglée à 2X, la taille de pixel effectif est 81,3 nm, qui est en concordance avec l'article précédent.

III.6.9. Logiciel Andor

L'utilisation de la caméra Andor, qui comporte 1024*1024 pixels, est limitée par un temps de lecture vers l'ordinateur à 32 ms. En plus du "binning", nous avons optimisé les paramètres du logiciel d'Andor IQ pour gagner des millisecondes en vitesse d'acquisition. Le mode d'acquisition « fast time » et des compromis entre gain et temps d'exposition étaient pris en considération pour chaque expérience.

III.7. Evaluation des performances en imagerie 2D

Dans le but de remonter à des informations concernant la dynamique de la chromatine aux petites échelles, il est nécessaire de sonder les fluctuations à haute vitesse. Suite à nos optimisations, nous sommes arrivés à réaliser des acquisitions de films dans des levures vivantes avec une vitesse très rapide de 5 ms qui est 200 fois plus rapide que dans la littérature [49, 96] et un très bon signal/bruit (Figure III. 10). Nous pensons que notre système va aider à la compréhension de la dynamique des chromosomes et à définir des paramètres physiques qui restent toujours un sujet mal élucidé en biologie moderne.

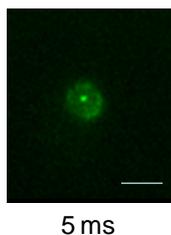
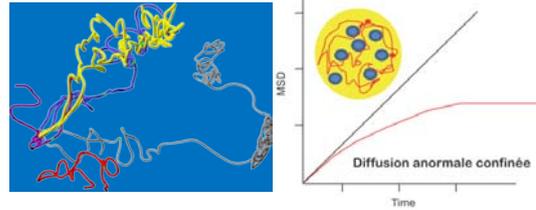


Figure III. 10: Image du noyau de la levure montrant la bonne qualité de nos films avec des acquisitions de 5ms. échelle=2 μ m

III.8. Conclusion

Les phénomènes cellulaires se déroulent à l'échelle de la milliseconde d'où l'importance d'augmenter la cadence d'acquisition des images dans des cellules vivantes. Le suivi en temps réel avec une précision de l'ordre du nanomètre dans les cellules vivantes est possible grâce à des protéines fluorescentes. Les deux paramètres cadence et précision sont majeurs dans l'acquisition des images. Nous rappelons que dans les conditions d'imagerie normale avec une caméra EMCCD mais sans les optimisations apportées par le "binning", la lentille de grossissement et le "cropped mode", le temps d'acquisition est à l'alentour de 50 ms. Dans ce contexte, nous avons optimisé les conditions d'imagerie tout le long de la chaîne d'acquisition pour développer un système qui peut acquérir des films avec un temps d'acquisition de 5 ms, une vitesse qui est 200 fois plus rapide que dans la littérature. Ce dispositif va être utilisé dans la suite pour étudier la dynamique de la chromatine dans des cellules vivantes.

Chapitre IV



Dynamique de la chromatine

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous revenons d'abord sur quelques informations clés concernant la structure de la chromatine d'une cellule eucaryote, et nous décrirons l'état des connaissances sur l'organisation des chromosomes dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Nous nous intéresserons ensuite à la dynamique de la chromatine et aux questions encore ouvertes à ce propos. Enfin, nous exposerons nos travaux sur l'analyse de la dynamique de la chromatine par vidéo-microscopie de fluorescence à partir de plusieurs sites marqués sur les Chromosomes III, IV, VI, XII et XIV de *S. cerevisiae* à la fois dans des cellules sauvages, mais aussi dans des mutants où une protéine impliquée dans la structure de la chromatine est déplétée. Notre travail a été guidé par des méthodes d'analyse physique quantitative des trajectoires des gènes, et s'inspire d'un modèle physique, dit de reptation, décrivant la dynamique des polymères dans une solution concentrée.

IV.2. Quelques rappels sur la chromatine

IV.2.1. Introduction

Le matériel génétique dans le noyau d'une cellule eucaryote est organisé en une structure nucléo-protéique complexe appelée chromatine (Flemming, 1882), issue de l'interaction de quatre protéines « les histones » avec l'ADN. Du fait de la taille de génome (12.7 millions de pb d'ADN chez la levure et 9 milliards de pb d'ADN chez l'humain), un repliement très hiérarchisé et ordonné de l'ADN est requis pour pouvoir le compacter dans un noyau de $\sim 4 \mu\text{m}^3$ chez la levure [97]. La structure de la chromatine est souvent représentée par une succession de niveaux d'architecture discrets (Figure IV. 1), qui sont toujours mal connus.

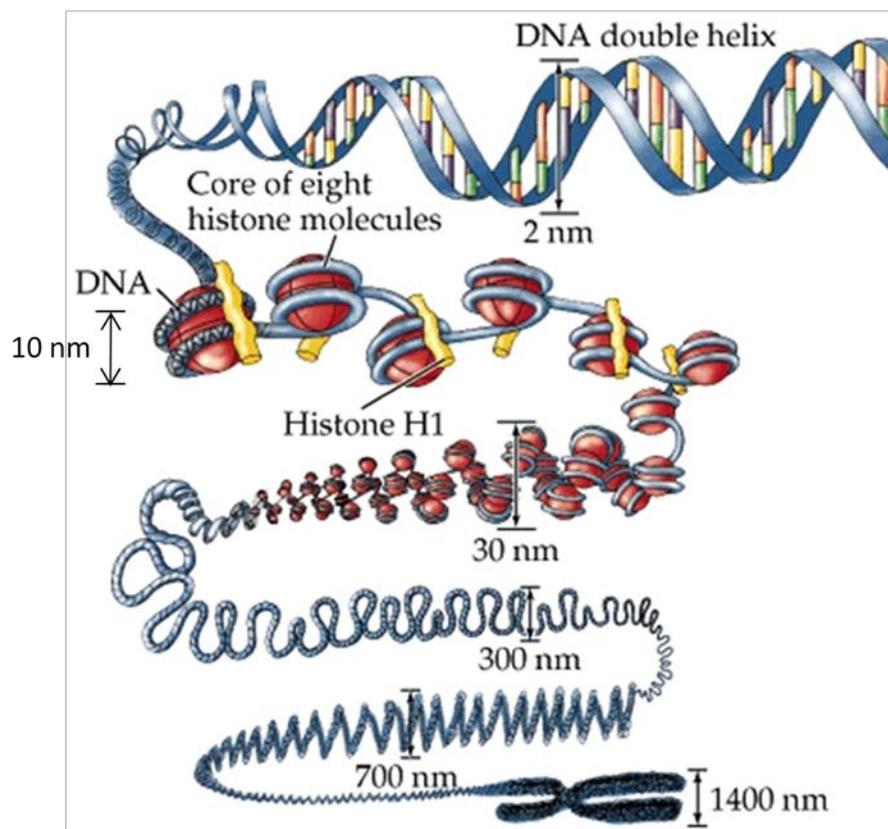


Figure IV. 1 : De l'ADN au chromosome : les enroulements successifs de 2 nm d'ADN à la formation du fibre de 30 nm en se basant sur l'unité de base le nucléosome de 10 nm et arrivant à la fin à la structure du chromosome de 1400 nm.

IV.2.2. Le nucléosome, premier niveau d'organisation de la chromatine

IV.2.2.a. ADN (2nm)

A la suite de l'élucidation de sa structure par Franklin [98] et Watson et Crick en 1953 [99], l'ADN a été considéré comme le support unique et universel de l'information génétique [100]. Aujourd'hui toutefois, le panorama est plus contrasté puisque l'on ne sait toujours pas répondre à la question primordiale de savoir où se trouve l'information permettant de contrôler l'expression des gènes. En d'autres termes, il reste difficile de savoir ce qui détermine la transcription ou l'extinction d'un gène. La plupart des connaissances récentes pointent pour des régulations non pas à l'échelle de l'ADN, mais au niveau de la chromatine, et des protéines qui lui sont associées, à savoir les histones.

IV.2.2.b. Histones

La découverte des histones remonte à 1884 par Kossel. Ces protéines sont parmi les mieux conservées au cours de l'évolution chez les eucaryotes [101]. Il existe cinq types principaux d'histones H2A, H2B, H3, H4 et H1. La structure de ces histones est constituée d'un domaine central structuré et de queues non structurées N- et C-terminales de longueur variables [102].

Les quatre histones dites de cœur (H2A, H2B, H3, H4) ont des caractéristiques de structure et de séquences similaires qui suggèrent qu'elles possèdent une origine commune. Leur masse moléculaire est environ 14 kDa, et leurs extrémités N-terminales sont caractérisées par une fraction Arginine/Lysine importante (charges positives). L'histone de liaison H1 se distingue par une masse moléculaire plus grande que 21 kDa et une charge positive nette plus importante.

IV.2.2.c. Nucléosome (10nm)

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est chargé négativement du fait des groupements phosphate de son squelette, qui induisent une forte répulsion

électrostatique entre les régions adjacentes d'ADN, ce qui se traduit par sa grande longueur de persistance de 50 nm, à comparer au diamètre de 2 nm [103-104]. Cette longue chaîne d'ADN est enroulée autour d'octamères d'histones [105] et maintenu grâce aux interactions électrostatiques entre la charge négative de l'ADN et la charge positive des histones. Le complexe formé est le nucléosome qui est connu comme l'unité de base de la chromatine.

Cette particule est formée d'un cœur central de 150 pb d'ADN enroulées en deux tours et demi autour d'un noyau octamère d'histones constitué de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. Sa structure a été révélée avec 2.8 Å de résolution (Figure IV.2) [106], puis plus récemment 1,9 Å [107-108] par cristallographie aux rayons X.

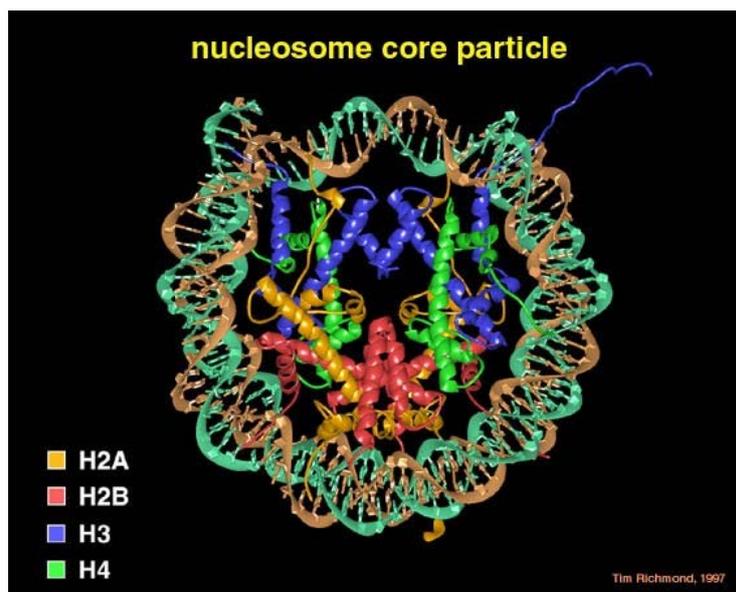


Figure IV. 2: Structure d'un nucléosome. Cristal de la particule cœur du nucléosome à 2.8 Å [106]. Le ruban d'ADN avec 146 bp est représenté en couleur brune et turquoise, et les huit protéines d'histones sont décrites avec H2A en jaune, H2B en rouge, H3 en bleu et H4 en vert.

En raison de leur présence universelle dans le génome des eucaryotes, les nucléosomes ont toujours été soumis à beaucoup d'études visant à révéler leur rôle dans le contrôle et la régulation génétique. Ces travaux ont rapidement montré que le nucléosome est une structure polymorphe, qui peut subir des modifications chimiques

dites post-traductionnelles sur les histones, ou avoir sa « personnalité » propre lorsque des variants d'histones remplacent les histones classiques [109]. Notons également que le nucléosome est une structure dynamique du point de vue des interactions qui y ont lieu, comme en témoigne l'interaction transitoire de l'histone de liaison au niveau des ADN entrée-sortie du nucléosome pour former un motif en forme de tige [110]. La particule formée par le nucléosome et l'histone de liaison est nommée "chromatosome" [111].

IV.2.3. Fibre de 30 nm (niveau d'organisation supérieur)

IV.2.3.a. Introduction

En l'absence de conclusions claires à la suite de l'examen morphologique de noyaux et de chromosomes *in situ* par microscopie électronique, de nombreux chercheurs se sont intéressés à la chromatine isolée. Grâce à l'utilisation de nucléases qui coupent l'ADN de liaison entre les nucléosomes, il est possible d'isoler et d'étudier les propriétés des polynucléosomes de grandeur ajustable avec les techniques de la biologie moléculaire. Les premiers travaux ont établi que l'état de compaction de polynucléosomes est fortement dépendant du milieu ionique. L'ADN nu est très fortement chargé négativement, ce qui se traduit par une forte auto-répulsion en milieu peu salin inférieure à 5 mM et la formation de structure en « collier de perles » [112-113]. La chromatine est elle-aussi chargée négativement parce que la charge négative de l'ADN n'est pas entièrement neutralisée par les histones. En augmentant la force ionique, une structure plus compacte caractérisée par un rayon de 30 nm a été détectée par microscopie électronique [114]. Ce résultat a été conforté grâce aux techniques de sédimentation analytique qui consistent à mesurer la vitesse de sédimentation de biomolécules, qui est caractérisée par le rapport du poids moléculaire d'une structure divisée par sa friction visqueuse (en Sverdberg) :

$$S \sim \frac{\text{masse moléculaire}}{6\pi\mu R}$$

où R est le rayon dynamique et μ est la viscosité. En effet, le nombre S augmente lorsque la concentration en sel augmente, mais il est difficile de corréler ce comportement à des caractéristiques microscopiques de la fibre de chromatine [115].

Notons que le facteur de compaction de la fibre de chromatine peut aussi être régulé par des protéines associées à la chromatine, en témoigne par exemple les clichés de microscopie électronique obtenus avec des polynucléosomes mis en présence de Sir3p, une protéine impliquée dans l'extinction de l'expression des gènes [116]. De plus, une étude de Dorigo et al. [117] sur des polynucléosomes dans lesquelles les queues N-terminales de H4 ont été supprimées a montré leur rôle essentiel pour la compaction de la chromatine. Il est aussi établi que la suppression de H1 conduit à une désorganisation et une décondensation dans la structure de la chromatine [118].

Malgré un grand nombre de résultats expérimentaux, l'arrangement des nucléosomes et de l'ADN dans les fibres de 30 nm reste un problème très mal compris et controversé. De grandes améliorations ont été récemment apportées en utilisant des ADN dont la séquence est super-positionnante pour le nucléosome [119]. Une réalisation majeure de cette approche a été la cristallisation et la détermination de la structure par diffraction des rayons X d'une fibre de tetranucleosomes [120]. Bien que ce résultat soit très artificiel car obtenu avec des séquences très particulières, il démontre un arrangement en zigzag des nucléosomes, avec des contacts entre deux nucléosomes successifs via des interactions entre H2B et H3 et entre H2A et H4 (Figure IV. 3 coté gauche). Cette structure n'a toutefois pas fait l'unanimité car un modèle en solénoïde proposé par Robinson et al [121] a été proposé sur la base d'observations par microscopie électronique de nucléofilaments contenant l'histone H1 (Figure IV. 3 coté droite).

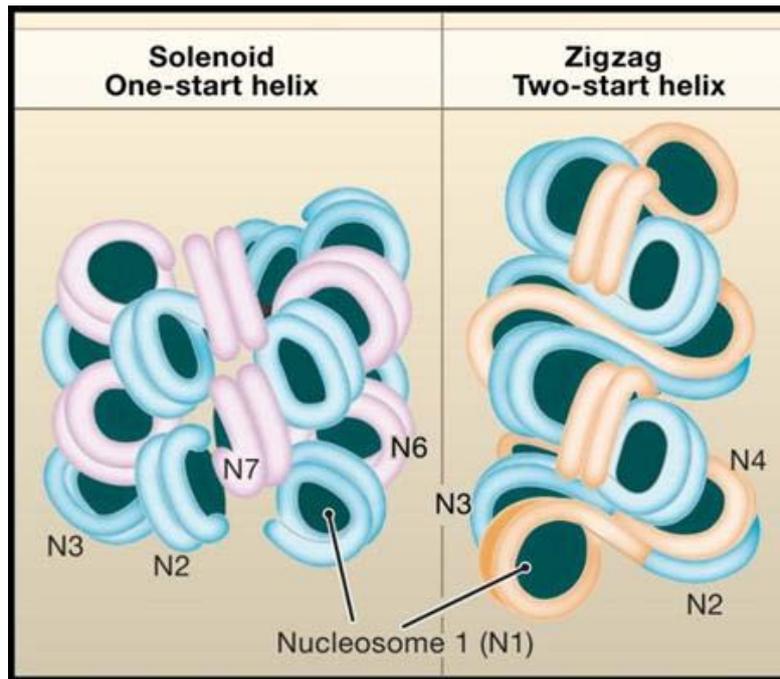


Figure IV. 3: Modèle solénoïde de la chromatine de 30 nm de fibres (à gauche) proposé par Rhodes et ses collègues [121], la fibre est formé des hélices qui sont colorés en bleu et magenta. Dans le modèle proposé par zigzag (À droite) Richmond et ses collègues [120], la fibre est une double hélice qui commence par l'ADN de liaison de passage entre les rangées adjacentes de nucléosomes [122].

IV.2.4. Fibre de 30 nm *in vivo*

L'existence de la fibre de 30 nm *in vivo* reste beaucoup discutée : bien qu'il y ait un manque de preuves que la fibre 30 nm existe chez les eucaryotes supérieurs, la capacité à assembler cette structure *in vitro* et l'extraire à partir de noyaux font valoir que la fibre de 30 nm est une structure secondaire. Des expériences de mesure de distance entre sites chromatiniens *in vivo* réalisées par Bystricky et al. 2004 ont indiqué la présence d'une fibre de 30 nm *in vivo* dans les levures [123]. Ils ont déterminé une longueur de persistance de la fibre de chromatine de 170-220 nm et une fibre de 30 nm durant l'interphase. A partir des données de la technique 3C (Capture de Conformation de Chromosomes) et de modélisation, Dekker a suggéré que la chromatine de levure est plus étendue qu'une fibre canonique de 30 nm. Il a déterminé une longueur de persistance de 66-134 nm avec une densité de 11 nm/kb [124].

IV.3. Organisation nucléaire de *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme largement utilisé par les scientifiques de la biologie cellulaire et moléculaire. Cette levure possède l'organisation cellulaire d'un eucaryote avec l'avantage d'être simple à maintenir en laboratoire et à manipuler génétiquement. En outre, c'est un bon système pour étudier les transactions moléculaires *in vivo*, sachant que sa machinerie cellulaire est proche de celle des eucaryotes supérieurs. Son génome de 16 chromosomes se compose de 12.7 millions de paires de bases [125] et de 6 275 gènes.

IV.3.1. Existence des compartiments hétéro- et eu-chromatiniens

Depuis la fin du XIXe siècle, de nombreuses hypothèses ont été émises quant à l'existence ou non d'une architecture organisée et contrôlée de la chromatine pendant l'interphase. Ces conjectures ont ensuite évolué en fonction des techniques disponibles pour les vérifier. L'existence d'une organisation nucléaire bi-partite de la chromatine associée à deux compartiments appelés euchromatine, qui est enrichi en gènes transcrits, et hétérochromatine, qui est plus compacte et peu transcrite, a été constatée dès 1928 (Heitz, 1928). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'hétérochromatine est formée de télomères (les extrémités terminales des chromosomes) et des locus silencieux pour la transcription, qui sont regroupés en amas situés à la périphérie du noyau [126]. Les techniques de microscopie ont permis de montrer que les 32 télomères d'une levure haploïde sont regroupés en 2-8 foyers [127-128]. Ces foyers semblent jouer un rôle essentiel dans l'architecture spatiale du noyau puisqu'ils contribuent à définir la position des télomères et donc des chromosomes dans le noyau, comme en atteste la formation de boucles dans le cas des chromosomes courts III et VI [49].

IV.3.2. Organisation des chromosomes

Carl Rabl a montré la conformation repliée de chromosomes dans l'anaphase chez les larves de salamandre. Les chromosomes des levures sont disposés dans une configuration pseudo-Rabl. Les centromères des chromosomes (le centre du chromosome) sont en effet groupés à moins de 200 à 300 nm du corps polaire du fuseau (SPB, Spindle Pole Body) et à l'opposé du nucléole (Figure IV. 4). Les télomères sont liés à la périphérie du noyau. Les cassettes silencieuses du type sexuel *HMR* et *HML* sont localisés à côté des télomères du chromosome III et forment l'hétérochromatine. Il est intéressant de noter que cette association des centromères induit une organisation à grande échelle dans le noyau[129].

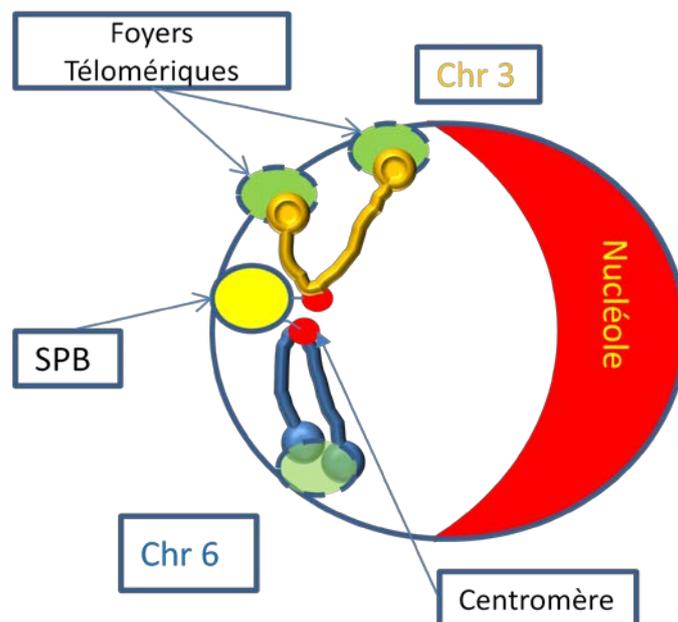


Figure IV. 4 : Configuration pseudo Rabl dans le noyau de la levure.

L'organisation des télomères a été un des problèmes les mieux étudiés chez la levure. Les protéines Rap 1 et les protéines yKu70/80 recrutent le complexe des protéines Sir2, Sir3 et Sir4 qui se propagent ensuite le long du chromosome du fait de l'interaction des protéines Sir3 et Sir4 avec les nucléosomes, et participent à la répression de la transcription au niveau de l'hétérochromatine [130]. De même, la

protéine ESC1, qui est distribuée dans des parcelles le long de la membrane nucléaire interne [131-133], semble assurer l'ancrage des télomères à l'enveloppe nucléaire (NE).

Schober et al [134] ont montré que les télomères du mêmes chromosome ont tendance à interagir plus fréquemment s'il a les longueurs du bras chromosomique qui sont égales.

D'autre part, Berger et al (2008) ont ajouté le marquage du nucléole comme second point de référence pour améliorer la localisation des loci chromosomiques et ainsi réaliser une carte 2D de la distribution statistique de la chromatine dans un noyau de levure. Ces cartes ont permis d'établir que la distribution des gènes est confinée dans des territoires géniques dans lesquels chaque gène est statistiquement présent dans la plupart de temps. Avec une grande résolution spatiale, ils ont montré que le volume des territoires géniques dépend de la position du gène sur les chromosomes et pour certains de leur niveau d'expression.

Avec cette approche, Therizols et al [133] ont analysé à haute résolution la plupart des 32 régions subtélomériques, et ont trouvé qu'elles sont positionnées de façon non aléatoire à la périphérie du noyau, en fonction de la taille du bras génomique de leurs chromosomes, de l'attachement du centromère à SPB, et du volume du nucléole. Les bras chromosomiques de longueur ~ 300 kb n'explorent pas tout le nucléoplasme et sont confinés à un territoire proche de SPB.

Enfin, Duan et al [135] ont fourni le premier modèle tridimensionnel du génome de la levure, en utilisant une méthode dérivée de la technique 4C (Coupling Chromosome Conformation Capture-on-chip), qui consiste à caractériser à l'échelle d'une population de levures les points d'interaction intra- et inter-chromosomique dans un génome. Leurs observations identifient l'existence de la configuration Rabl des chromosomes de la levure tandis que le Chromosome XII avec les répétitions ADN_r s'étend vers le nucléole. Après avoir quitté le nucléole, le reste de celui-ci interagit avec le bras long du chromosome IV. Les bras des chromosomes de petite taille sont entassés dans une zone proche du SPB, rendant ainsi des contacts fréquents avec d'autres chromosomes. En revanche, les bras des chromosomes plus longs occupent un

terrain relativement peu fréquenté, impliquant moins de contacts avec d'autres chromosomes (Figure IV. 5).

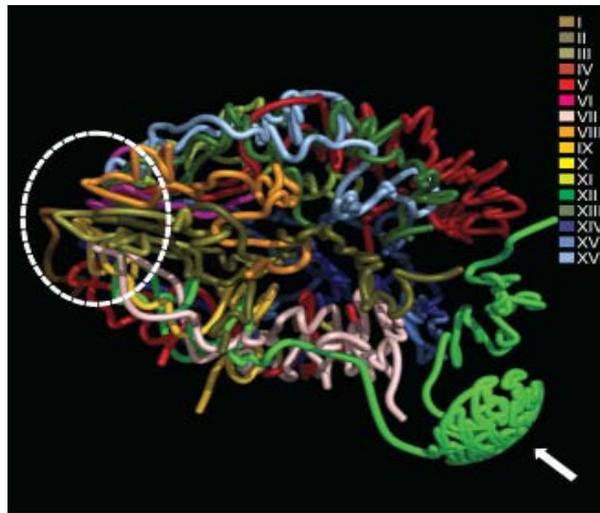


Figure IV. 5 : modèle en 3D du génome de la levure. Tous les chromosomes forment un amas via centromères à un pôle du noyau (la zone au sein de l'ovale en pointillés). Le chromosome XII s'étend vers l'extérieur dans le nucléole, qui est occupée par les séquences répétées ADN_r (indiqué par la flèche blanche).

IV.4. Description de notre méthode expérimentale

IV.4.1. La culture cellulaire

Les souches ont été cultivées à une phase précoce de croissance exponentielle $0.2-0.4 \times 10^7$ cellules/ml dans un milieu de culture YPD ou YNB à 30° C, à partir d'une culture fraîche préparée le soir. Juste avant l'expérience, les cellules ont été lavées une fois pour réduire l'autofluorescence du milieu. Un soin extrême doit être apporté afin d'assurer que les cellules sont à des étapes égales de la croissance pour la visualisation et de différencier les stades de l'interphase.

IV.4.2. Marquage d'un site chromosomique

Une percée importante dans le domaine a été le développement d'une nouvelle approche pour le marquage spécifique de séquences d'ADN dans des cellules vivantes

à l'aide de protéines fluorescentes (prix de Nobel en chimie 2008). Le marquage de ces sites a été fait par intégration d'un plasmide linéarisé contenant, outre des marqueurs de sélection et des séquences nécessaires à son amplification, des répétitions d'opérateurs de l'opéron lactose (LacO) et une séquence de 400-600 bp homologue à la région d'insertion souhaitée. L'homologie créée par cette séquence génomique sur le plasmide dirige celui-ci au locus génomique désiré, qui s'intègre alors par recombinaisons homologue. Par ailleurs, la séquence codant le répresseur de l'opéron lactose (lacI) fusionnée à une séquence codant une protéine fluorescente (la GFP par exemple) est également insérée dans la cellule via un plasmide. Les protéines de fusion LacI-GFP vont venir se fixer sur les répétitions LacO pour apparaître comme une particule fluorescente sur le site cible (Figure IV. 6). Cette particule peut être suivie par microscopie à fluorescence et, en analysant sa trajectoire, des informations importantes sur la dynamique de la fibre chromatinienne sont déterminées. Cette technique est devenue commune pour visualiser des sites chromosomiques dans le génome des bactéries jusqu'aux cellules eucaryotes [136]. Straight et al [137] ont été les premiers à montrer la possibilité d'intégrer 256 répétitions de LacO dans le génome de la levure sans affecter la croissance de la cellule.

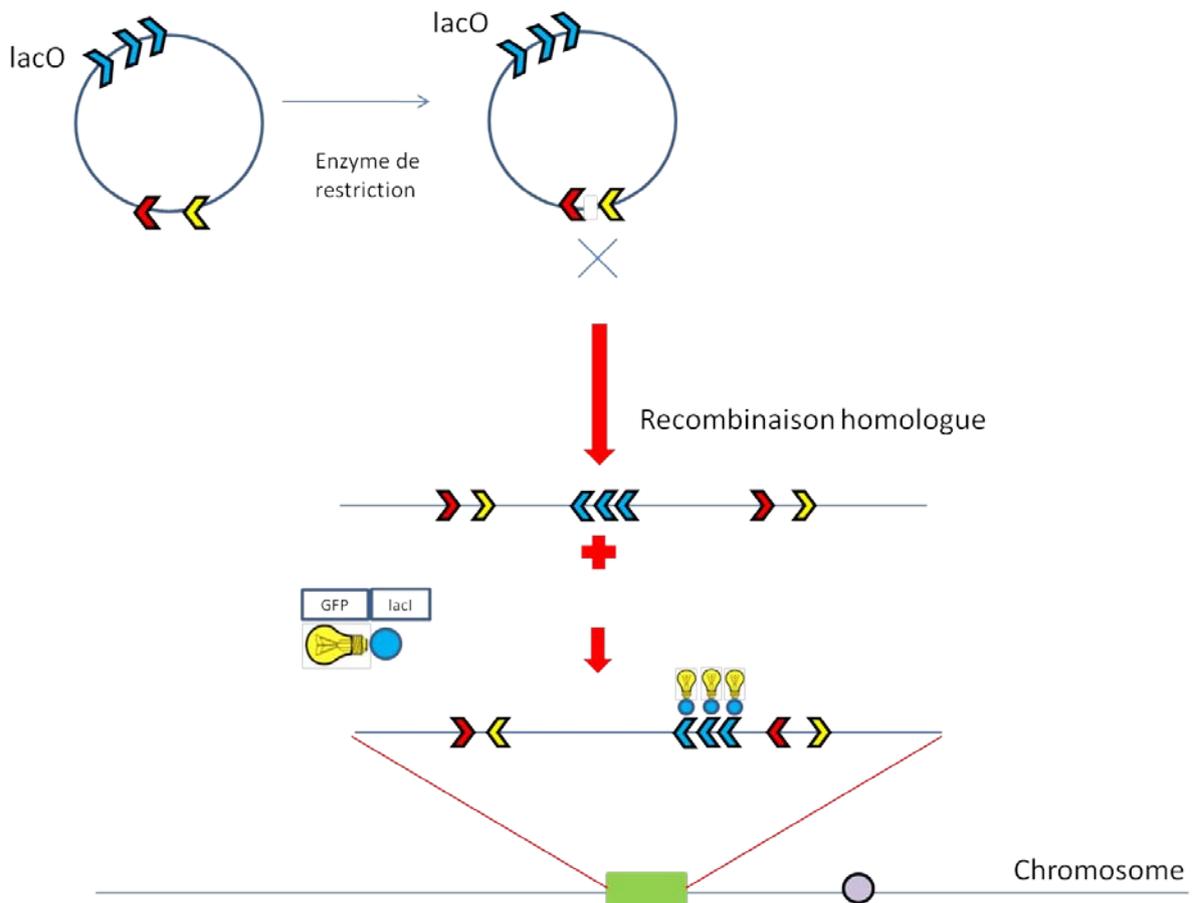


Figure IV. 6 : Le marquage d'un site sur le chromosome par intégration des opérateurs LacO. Le plasmide est linéarisé par une enzyme de restriction avant d'être intégré dans le génome par recombinaison homologue. L'interaction de la protéine de fusion LacI-GFP avec les séquences répétées de LacO créent un point fluorescent.

IV.4.3. Déplacement quadratique moyen

Le comportement des sites chromosomiques est révélé par l'analyse du déplacement quadratique moyen (MSD). Pour étudier le comportement des sites chromosomiques nous avons divisé la cellule en deux zones, l'une proche de l'enveloppe nucléaire et l'autre située au milieu du noyau (Figure IV. 7). Nous nous sommes ensuite concentrés sur les loci localisés au milieu de noyau (Zone I), c'est à dire loin de l'ancrage avec les télomères ou centromère au SPB qui contraint physiquement le mouvement de la chromatine (Figure IV. 4). L'analyse du MSD à différentes échelles de temps pour les loci donne une idée sur leur comportement

diffusif et, s'il est corrélé à un comportement physique connu, à des informations sur la physique du chromosome.

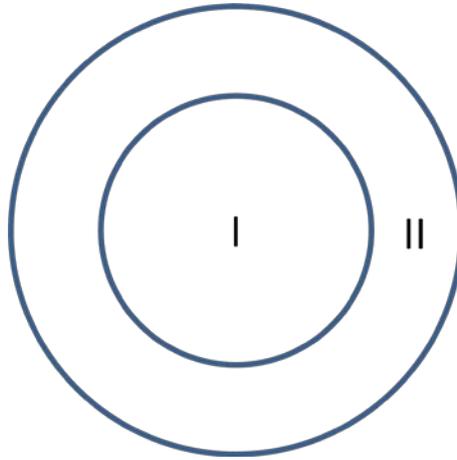


Figure IV. 7: Le noyau de la levure est divisé en trois zones de surfaces égales, nous nous sommes intéressés particulièrement à la zone I qui correspond au centre du noyau. Dans cette figure, la région II correspond aux zones II et III dans les articles de Gasser, voir par exemple [135].

Le calcul d'un MSD nécessite de mesurer les positions des locus dans chaque image d'un film, puis les trajectoires sont analysées pour extraire des informations quantitatives concernant le mouvement [138]. En 3D l'équation de MSD s'écrit :

$$\text{MSD}(\tau) = \{ [x(t) - x(t + \tau)]^2 + [y(t) - y(t + \tau)]^2 + [z(t) - z(t + \tau)]^2 \}$$

où x , y et z sont les coordonnées de la particule et τ est le décalage dans le temps.

Le MSD mesure le déplacement quadratique moyen pour un intervalle de temps donné dans une trajectoire. Dans le cas de particules isolées, l'agitation thermique anime les molécules d'un mouvement incessant et aléatoire appelé mouvement Brownien. Ce mouvement diffusif est caractérisé par une variation linéaire du MSD en fonction du temps selon :

$$\text{MSD}(t) = 6 D t$$

où D est le coefficient de diffusion microscopique. La diffusion n'est pas normale lorsqu'elle se déroule dans un milieu fluide complexe, avec par exemple des obstacles aléatoires ou fractals (Figure IV. 8. B), ou que l'objet diffusant est déformé par le mouvement brownien. Le comportement de la MSD suit alors un comportement anormal (Figure IV. 8. D) :

$$\text{MSD}(t) = \Omega t^\alpha$$

où Ω est un coefficient et α est l'exposant de diffusion anormale. Dans le cas d'un comportement sous-diffusif $\alpha < 1$, et dans le cas d'une diffusion linéaire $\alpha = 1$.

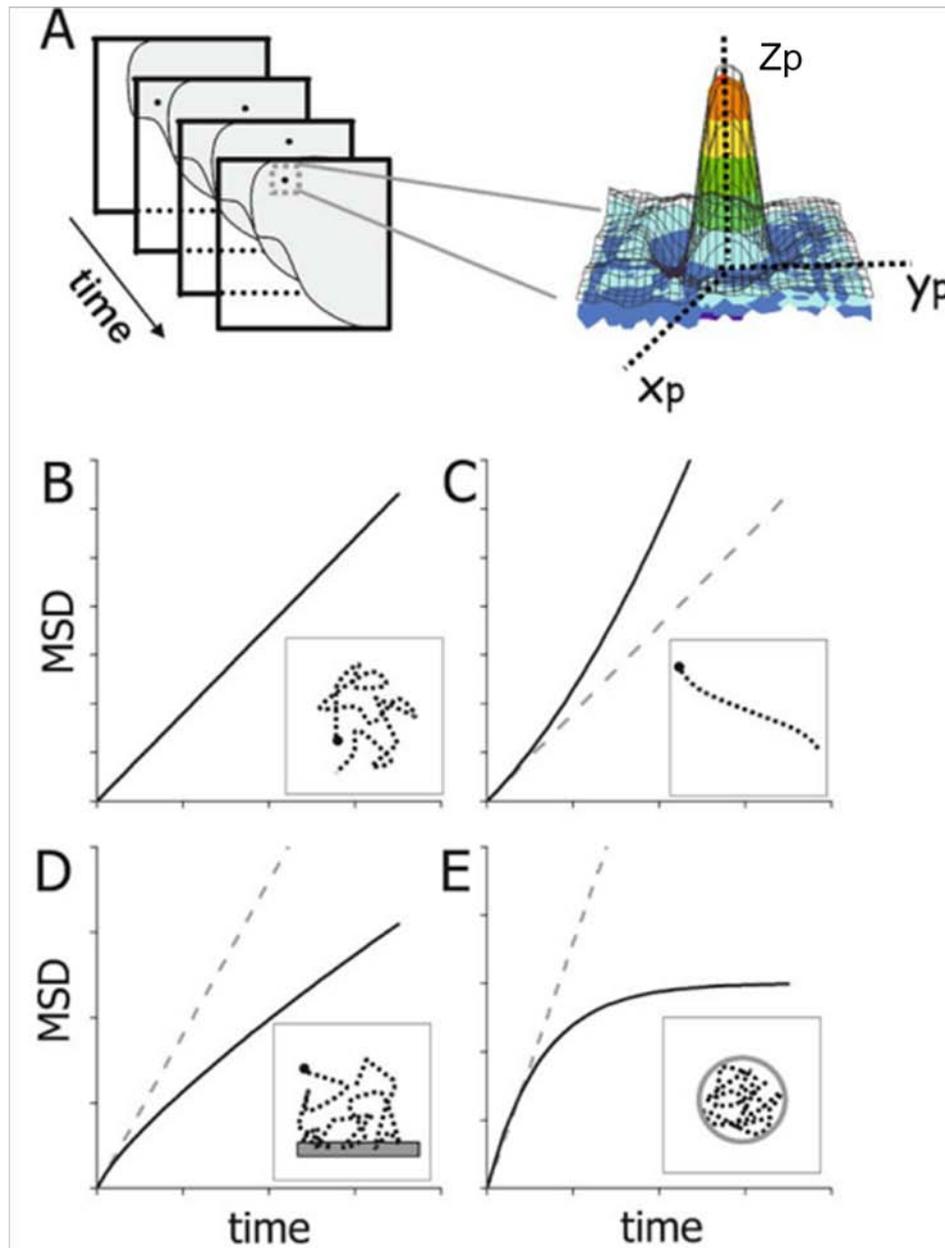


Figure IV. 8: courbes théoriques des MSD des particules en fonction de temps. A) Détermination de la trajectoire des particules par l'analyse du mouvement d'une particule dans une série d'images au cours du temps. B) d'un mouvement aléatoire. C) d'un transport actif. D) d'une sous-diffusion anormale. E) d'une diffusion confinée. Les lignes en pointillés dans chaque cadre représentent le comportement diffusif standard [139].

IV.4.4. Méthodes de fixation des levures

Dans le but d'éviter les mouvements de la cellule durant l'acquisition des films, qui rajoutent des erreurs de mesure sur le mouvement du locus lui-même, nous avons

développé plusieurs techniques d'immobilisation des cellules dans les miroirs pour la visualisation en 3D et pour l'observation classique en 2D.

IV.4.4.a. Introduction

La qualité des images réfléchies par les miroirs dépend de la position des cellules dans une zone limitée par une distance (d) entre le fond du miroir et la lamelle. Le cas idéal est obtenu lorsque les levures sont proches du sommet des miroirs comme indiqué dans la Figure IV.9 car cette configuration permet de visualiser au mieux l'objet et ses deux images réfléchies.

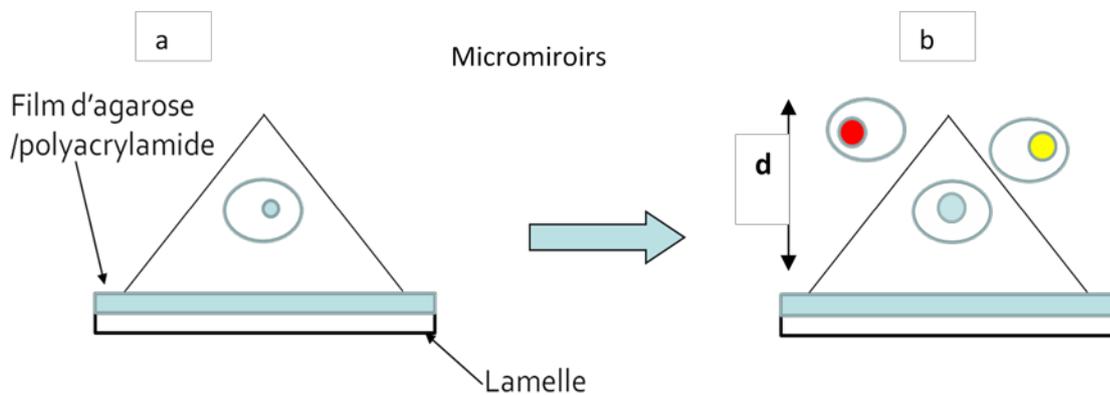


Figure IV. 9 : a) Un film d'agarose ou de polyacrylamide est déposé sur une lamelle de microscope puis les cellules sont déposées sur ce film. b) Ce film sert à pousser les cellules dans les sillons de miroirs et ainsi il y a l'apparition de la cellule avec ses images réfléchies.

Dans le système intégré que nous avons développé, l'étanchéité des miroirs est assurée par un scellement des canaux avec une couche de PDMS (couche bleu ciel dans Figure IV.9). Cette stratégie, bien que très efficace, ne permet pas d'assembler rapidement le système et de tester la qualité des souches cellulaires. Aussi, nous avons développé une technologie plus simple pour assembler les miroirs. Cette stratégie repose sur un assemblage par contact des miroirs avec les lamelles de microscopes. Nous avons donc fait usiner un support d'assemblage constitué de 2 pièces (Figure IV.10) : un support pour poser la lamelle de microscope, et une pièce pour reporter les miroirs sur la surface.



Figure IV. 10: Photos des supports en aluminium

La souplesse des lamelles de microscope, qui ne mesurent que $160\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, s'est toujours traduite par un fléchissement du verre, qui empêche le maintien des levures dans les miroirs. Il nous est apparu pertinent de greffer des couches de polymère hydrophile entre le verre et les miroirs pour minimiser les déformations du verre et forcer l'entrée des levures dans les miroirs.

IV.4.4.b. Fabrication de films de poly-acrylamide

Les gels de polyacrylamide sont préparés à partir du monomère acrylamide et d'un agent de réticulation généralement bis-acrylamide. Le bis acrylamide est l'équivalent de 2 monomères d'acrylamide liés par un groupement méthyl. Il est utilisé comme agent pontant. La préparation d'un gel de polyacrylamide nécessite d'utiliser un système d'amorçage, en général TEMED (NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine) et persulfate d'ammonium (APS). Le TEMED catalyse la décomposition des ions persulfates pour donner un radical libre.

Nous avons utilisé un mélange commercial d'acrylamide:Bis-acrylamide à 29:1, et une concentration massique de 40 %, qui est dilué avec de l'eau DI pour aboutir à différentes concentrations : 2 %, 4 %, 10 %, 20 % et 40 %. Les deux concentrations adaptées à notre application sont 4 % et 10 % (Tableau IV. 1 pour la formulation), les autres étant très mous ou très durs. Il faut noter que le TEMED et l'APS sont très fortement cytotoxiques, et il est nécessaire de rincer abondamment les gels après leur réticulation.

	Monomère	H ₂ O	TEMED	APS
4%	100	900	3	10
10%	250	750	3	10

Tableau IV. 1: Quantité de liquide en μL des différents constituants pour la fabrication du gel de polyacrylamide à 4 % et 10 %.

La fabrication des gels consiste à déposer un volume de 70 μl sur une lamelle de dimensions 22*22 mm^2 , à déposer une autre lamelle par dessus, et à attendre environ 2 minutes que la réaction de polymérisation ait lieu. L'épaisseur du gel est de l'ordre de 100 μm , et on laisse l'eau s'évaporer pendant 5 minutes jusqu'à obtenir un gel plus fin (le gel sec a une épaisseur de 5 μm).

A ce stade, nous avons décrit le protocole pour réaliser un film de polyacrylamide. Nous avons souhaité améliorer le procédé de manière à réaliser un greffage physique du gel à la surface. Dans ce dessein, nous avons modifié les lamelles de microscopes avec un silane réactif avec les monomères d'acrylamide. Ce traitement consiste à greffer de manière covalente une molécule organique, dit silane, comprenant un groupement Si-OCH₃ sur une surface présentant des groupes Si-OH (Figure IV.11). Le silane comprend une autre fonction sur laquelle des étapes de chimie peuvent avoir lieu, en particulier la croissance de chaîne de polymères (pour plus d'information voir l'annexe B).

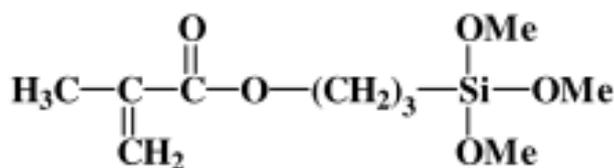


Figure IV. 11: Formule chimique de molécule de 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate. La double liaison C-C est réactive et s'associe avec les monomères d'acrylamide pendant la réaction de polymérisation.

Le protocole de silanisation comprend les étapes suivantes :

- Mettre les lamelles dans une solution de soude à 0.5 N durant une demi-heure avec une agitation continue, afin de nettoyer et d'activer la surface.

- Mettre les lamelles dans l'acide chlorhydrique à 1.0 N sur l'agitateur pendant une demi-heure pour neutraliser la soude restant sur le verre. Puis, les lamelles sont rincées suivant l'ordre : EDI, éthanol, et trichloroéthylène (3 fois chacun).
- Silanisation : le silane (3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate), est dilué dans un solvant organique (trichloroéthylène) (solvant organique) à 1 %. La solution de silanisation agit pendant une nuit à une température ambiante.

Après la silanisation, un rinçage des lamelles est réalisé avec du trichloroéthylène, de l'éthanol, et de l'EDI (3 fois pour chaque solvant aussi), et puis un séchage des lamelles en étuve à 120 degrés pendant une heure.

IV.4.4.c. Collage direct des levures sur les miroirs

Nous avons presque exclusivement utilisé un microscope droit pour notre travail. Dans cette géométrie, les forces gravitationnelles forcent les levures à descendre au fond des sillons des miroirs, ce qui est optimal pour leur observation. Toutefois, dans le cadre de nos collaborations (LBME, Institut Pasteur), nous avons été amenés à développer un protocole pour observer les levures avec notre technologie sur un microscope inversé. Dans ce cas, il faut lutter contre la gravité qui fait sédimenter les levures loin des miroirs. Nous avons donc souhaité attacher les cellules avec de la polylysine ou du polyéthylèneimine (PEI) adsorbé sur les surfaces des miroirs.

Le principe de l'interaction entre ces polymères et les surfaces vient des charges polycationiques de la polylysine ou de PEI, qui sont à la fois fortement adsorbées aux surfaces de verre chargées négativement, et qui interagissent avec les sites anioniques sur la surface des cellules. En 1975, Daniel Maza [140] et al ont attaché des cellules pour utilisation en microscopie électronique avec de la polylysine. Le PEI et la polylysine à 0.01 % ont aussi été utilisés pour attacher des bactéries pour l'observation par l'AFM [141-143]. Nous avons essayé deux méthodes d'attachement avec de polyéthylèneimine PEI (0.2 %) et de la polylysine (0.01 %). Le protocole inclut plusieurs étapes:

- On prépare un gel polyacrylamide sur des lamelles, qui sont lavées avec de l'eau désionisé.

- On effectue un rinçage du gel dans un milieu de culture YNB pour que les cellules trouvent de la nourriture durant l'expérience.
- Concernant les miroirs, ils seront plongés dans une solution de PEI/ à 0.2 % pour 2 h avec une agitation horizontale ou dans une solution de la polylysine à 0.01 % pour 4 h.
- Après un rinçage abondant à l'eau, et on les laisse sécher.
- On pose 4 μ l des levures sur les miroirs.
- On laisse les cellules sédimenter quelques secondes puis on rince avec de l'EDI (les levures non collées sont ainsi éliminées).
- Le miroir est déposé en poussant sur le polyacrlamide gel.
- Observation au microscope

Nous avons essayé de déposer une couche de Concanavalin A qui est souvent utilisé pour attacher les levures, mais nous n'avons pas eu de meilleurs résultats qu'avec le PEI ou de la polylysine. Nous avons testé la toxicité de ces deux produits en regardant si les cellules se divisent normalement après 1 h, 2 h, 3 h par rapport à des cellules déposée sur du verre nu sans voir de différence. A noter que nos expériences ne durent pas plus de 15 minutes.

IV.4.5. 2D versus 3D

Dans le 2^{ème} chapitre, nous avons décrit notre nouvel outil d'imagerie quantitative en 3D pour l'imagerie rapide fondé sur les microtechnologies et couplé à un dispositif de microfluidique. Cette méthode d'imagerie originale nous a permis de visualiser le mouvement de loci chromosomiques sur le Chromosome III en 3D avec un intervalle de temps d'acquisition de 20 ms avec une erreur de positionnement de 27 nm [82].

Dans le but d'étudier le comportement des chromosomes de manière plus exhaustive, nous nous sommes d'abord posé la question de la nécessité de notre technologie d'imagerie 3D, et nous avons comparé les résultats obtenus avec les miroirs ou avec un système d'imagerie classique en 2D. Dans ce cadre, nous avons

d'abord suivi des billes fluorescentes diffusant dans l'eau en 2D et 3D avec une cadence d'acquisition de 25 ms et nous avons comparé les MSD (Figure IV. 12). L'analyse du MSD de ces deux billes donne un coefficient de diffusion $0.46 \mu\text{m}^2/\text{s}$ en 2D et $0.68 \mu\text{m}^2/\text{s}$ en 3D, soit un rapport de 1.48 entre les deux mesures. Cet écart est précisément attendu puisque un préfacteur dans le comportement temporel du MSD diffère en 2D ou 3D suivant $\text{MSD} = 4Dt$ et $\text{MSD} = 6Dt$, respectivement.

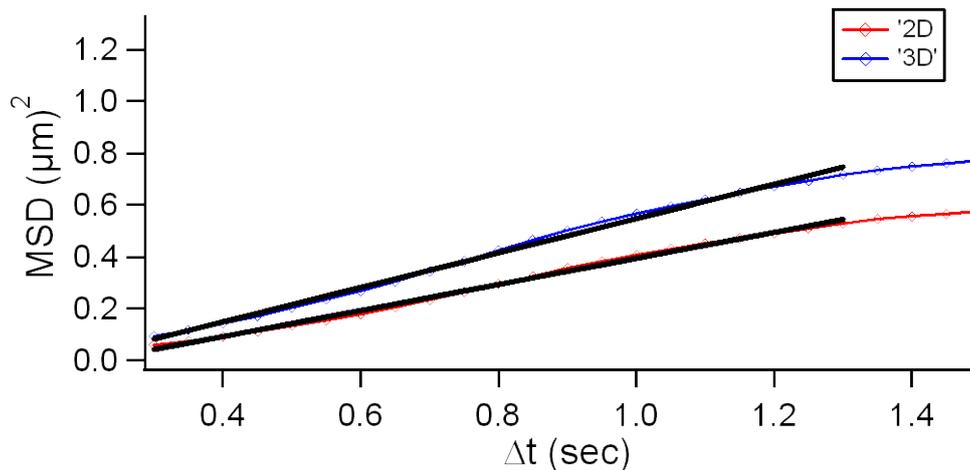


Figure IV. 12 : les déplacements quadratiques moyens de billes fluorescentes de $1\mu\text{m}$ en 2D (rouge) et 3D (bleu) suivent une loi linéaire en temps, qui est ajustée avec une droite (en noire). Les coefficients de diffusion sont de $0,46 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $0,69 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les courbes en 2D et 3D respectivement.

Nous avons appliqué la même méthode pour les levures avec une cadence d'acquisition plus lente de 750 ms (Figure IV. 13). Comme le comportement diffusif d'un chromosome n'est pas forcément linéaire en temps (voir la suite pour les détails), nous avons simplement comparé les graphes 2D et 3D de MSD à des temps courts. Les courbes sont très semblables. Aussi, les miroirs n'apportent pas d'informations essentielles pour notre approche de suivi dynamique, et comme les expériences sont plus rapides à mettre en œuvre en 2D, et que des cadences d'acquisition nettement plus rapides sont atteignables, ces résultats nous ont suggéré de travailler sans les miroirs et en 2D.

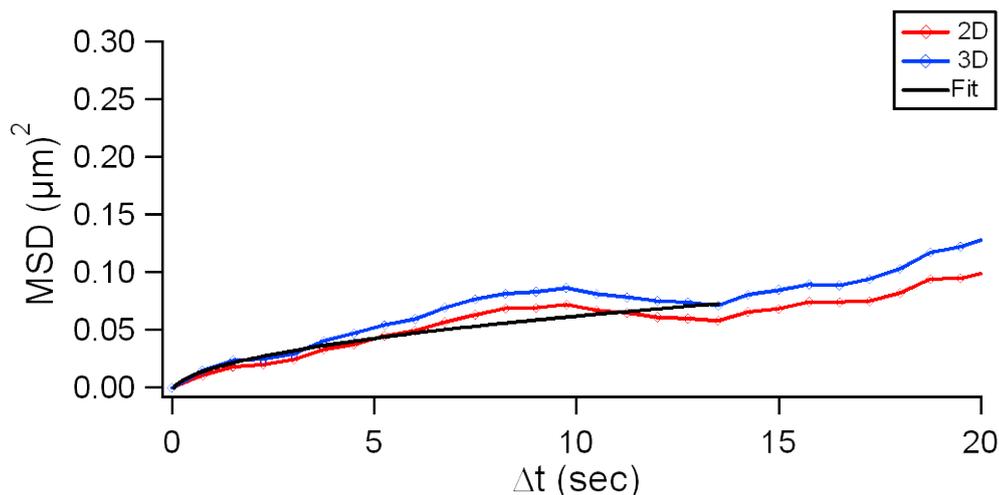


Figure IV. 13: Dans des levures vivantes le déplacement quadratique des locus en 2D (rouge) versus 3D (bleu) sont très semblables.

IV.5. Dynamique de la chromatine

L'importance de disposer d'informations précises sur la structure, la dynamique de la chromatine et l'organisation des chromosomes n'est plus à démontrer d'autant que notre niveau de compréhension de ces problèmes est encore très faible. La structure du génome de la levure a été récemment décrite par Duan [127] par 4C sur une population de 10^8 cellules, fournissant une image moyennée qui ne décrit que très indirectement les paramètres physiques de la chromatine *in vivo*. Or, tous les processus nucléaires (expression génique, réplication, réparation et recombinaison de l'ADN) sont régulés par l'organisation spatiale des chromosomes et leur dynamique intrinsèque. Aussi, le développement d'un outil d'étude du comportement dynamique des chromosomes fondé sur les nouvelles technologies de microscopie à fluorescence favoriserait grandement notre compréhension de l'environnement nucléaire.

IV.6. Etat de l'art concernant la diffusion des chromosomes

IV.6.1. Résultats indiquant une diffusion libre confinée

Marshall et al [144] ont suivi un locus étiqueté près du centromère du chromosome III dans la levure. Cette étude a montré que la chromatine est soumise à un mouvement brownien et qu'elle est confinée dans un rayon de $R = 0,3 \mu\text{m}$, qui est plus petit que le noyau de la levure $\sim 2 \mu\text{m}$. Ce rayon passe à $0,7 \mu\text{m}$ en dépolymérisant les microtubules par nocodazole. Aussi, les microtubules semblent jouer un rôle dans le confinement de la diffusion suite à l'ancrage du centromère au SPB.

Plusieurs études de la dynamique des locus sur les chromosomes ont ensuite été menées dans le laboratoire de Susan M. Gasser. En 2001, Heun et al [96] ont marqué quatre sites chromosomiques avec la GFP dans des cellules haploïdes sur des échelles de temps allant de 1.5 s à 150 s. Cette étude a montré que les sites chromosomiques non centromériques sont très dynamiques et que leur dynamique dépend du cycle cellulaire (G1 ou S), de manière indépendante des microtubules. Des mouvements rapides de grande amplitude ($> 0,5 \mu\text{m}$ en 10 s) sont fréquemment observés pour certains locus pendant la phase G1. Le mouvement de la chromatine est diminué au cours de la phase S, probablement à cause des contraintes dues à la réplication de l'ADN. L'analyse quantitative des résultats montre que la dynamique de la chromatine est caractérisée par une diffusion libre confinée comme l'ont proposé Marshall et al. [144]. Pour les sites centromériques et télomériques, les mouvements sont plus confinés, suite à l'ancrage à la périphérie par hétérodimère yKu70/80 ou par le Sir4 pour les télomères (*Silent information regulator*) [49], et à l'ancrage des centromères au SPB par les microtubules [96].

Bystricky et al [49] ont trouvé que les télomères 6L et 6R sont associés dans un même amas, et leur dynamique a été analysée avec un modèle de diffusion linéaire lente. Ce comportement n'est pas général puisque les télomères de Chromosome V sont plus dynamiques. La suppression des protéines d'ancrage à la paroi nucléaire yKu

ou Sir4 change la dynamique des télomères du Chromosome VI, qui présentent alors une dynamique semblable à celle télomère du Chromosome V.

Gartenberg et al ont examiné le mouvement des différents loci avant et après l'excision d'un site spécifique, et ils ont analysé la dynamique d'un locus dans un contexte chromosomique ou libre dans le noyau [61].

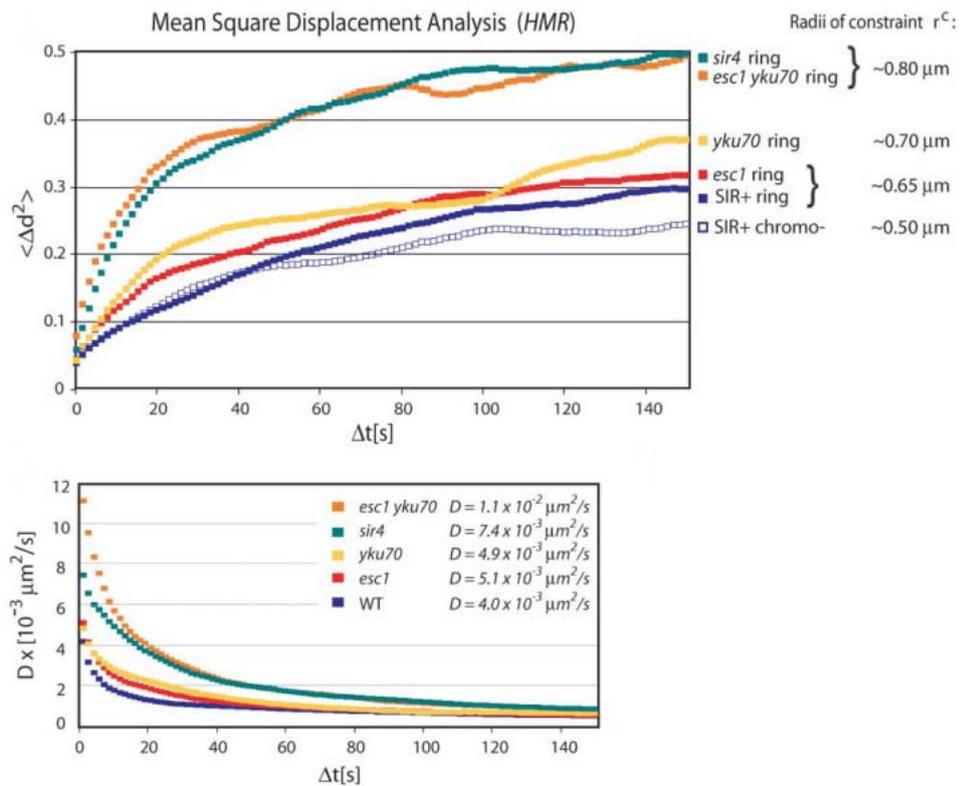


Figure IV. 14: MSD du locus HMR avec et sans excision de l'HM (pris de l'article de Gartenberg[61]).

Dans ce travail comme dans ceux de l'équipe de S. Gasser, les analyses des courbes de MSD sont traitées comme dans l'exemple dans la Figure IV. 14. Le coefficient de diffusion déduit à partir des courbes de MSD semble varier à toutes les échelles de temps. Ce comportement peut être modélisé soit avec un modèle de sous-diffusion anormale, soit avec une diffusion normale et un plateau de confinement. Notons que ces deux modèles reviennent à ajuster les courbes avec deux paramètres ajustables. A ce jour, il est surprenant de constater qu'il n'y a jamais eu de discussions complètes sur la pertinence des modèles d'ajustement des MSD. Il résulte de ce manque d'approfondissement qu'à ce jour, seuls des paramètres très

phénoménologiques de la chromatine ont été mesurés à partir des expériences de suivi de mouvement de chromosomes.

IV.6.1.a. Sous diffusion :

IV.6.1.a.1. Dans les levures

Cabal et al [48] ont regardé les mouvements du locus GAL1 (268kb) en 3D sur le Chromosome II en condition de répression ou d'activation. Dans ces deux situations, l'étude des mouvements du locus montre un régime de sous-diffusion anormale associée à un coefficient de diffusion anormale de 0,4 pour une gamme de temps comprise entre 4 s et 90 s.

IV.6.1.a.2. Dans les cellules mammifères

Plusieurs travaux ont été menés pour comprendre les mouvements de la chromatine dans les cellules de Drosophile [144-145], et ils ont révélé une sous diffusion confinée. Les cadences d'acquisition les plus rapides de 32 ms ont été atteintes par microscopie à deux photons sur les cellules HeLa [146], et ont montré une dynamique complexe caractérisée par des sauts de 150 nm pour des temps de 0,3 à 2 s. Deux régimes sont observés, une diffusion confinée avec des mouvements rapides à des temps courts (moins de 0,6 s) qui pourraient refléter des oscillations locales dans la structure chromatinienne et une diffusion linéaire avec des mouvements longs qui pourraient refléter l'interaction à grande échelle avec les structures du noyau.

Récemment, Bronstein et al [147] ont travaillé sur les télomères des cellules humaines. Ils ont montré un passage d'une sous diffusion anormale à une diffusion normale à des échelles de temps longues (Voir le Tableau IV. 2 ci-dessous).

		Types cellulaires
Diffusion libre confinée	Marshall et al [144]	S.cervisiae
	Heun et al [96]	S.cervisiae
	Bystricky et al [49]	S.cervisiae
	Gatenberg et al [61]	S.cervisiae
	Levi et al [146]	HeLa
	Bronstein et al [147]	Humaines
Sous diffusion anormale	Cabal et al [48]	S.cervisiae
	Marshall et al [144]	Drosopholie
	Levi et al [146]	HeLa
	Tahkar et al [145]	Drosopholie
	Bronstein et al [147]	Humaines

Tableau IV. 2 : Synthèse des différents modèles utilisés pour l'analyse des régimes de diffusion pour la chromatine dans différents types cellulaires.

IV.7. Enjeu de notre travail

IV.7.1. Sites chromosomiques étudiés

Cette analyse bibliographique montre les différences d'analyse des résultats, ainsi que les différences de gamme temporelle traitées. Si des informations biologiques sur la dynamique de la chromatine ont déjà été obtenues (interaction avec le SPB, rôle du cycle cellulaire), les modèles mécanistiques n'ont pas encore été correctement validés. Aussi, nous avons décidé d'étudier la dynamique de la chromatine dans *S. Cerevisiae* avec une gamme temporelle étendue 20 ms à 100 s, en profitant de la grande collection des souches marquées qui existe déjà dans les laboratoires de nos collaborateurs. Pour tester l'effet de grandeurs physiques sur la dynamique, nous avons choisi une gamme des sites chromosomiques insérés dans des chromosomes de

longueurs différents III, IV, VI, XII et XIV, et des sites sur le même chromosome à des endroits différents. La cartographie de ces sites marqués est représentée dans la Figure IV. 14, le positionnement de ces sites a été représenté dans la carte issue des données de Duan [82] (

Figure IV. 15), montrant ainsi que l'on a « échantillonné » une grande variété de position dans le noyau de la levure.

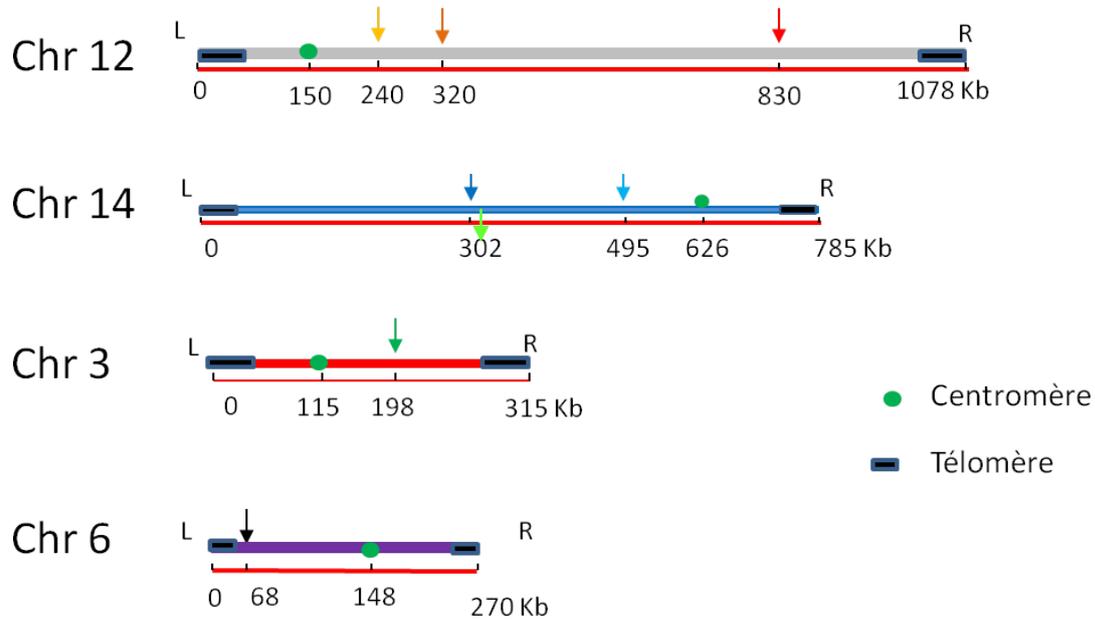


Figure IV. 14: schéma des sites marqués sur les chromosomes donnant une idée sur les diverses positions choisies. Ces sites sont loin du centromère et du télomère.

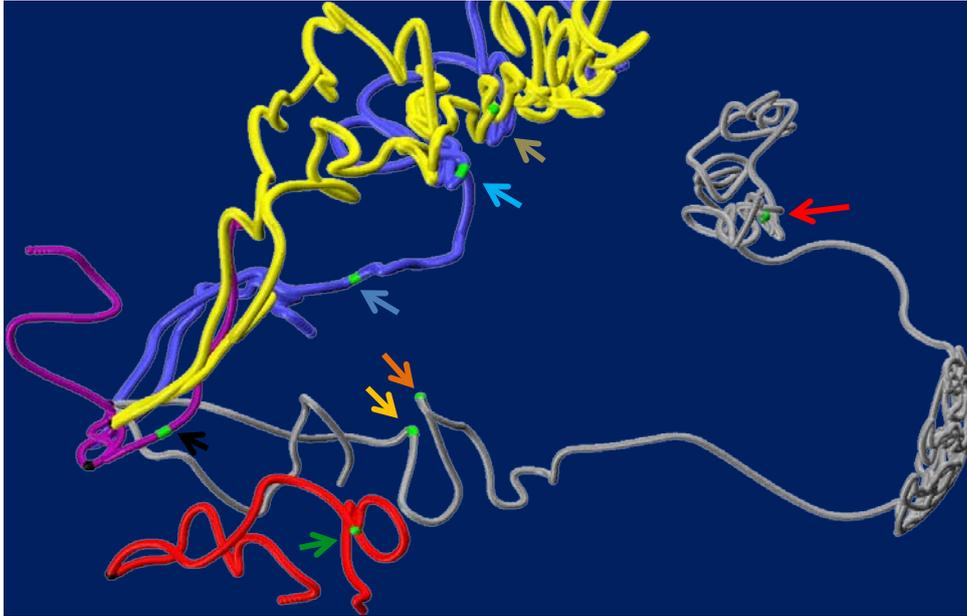


Figure IV. 15 : carte 2D des sites chromosomiques marqués (couleur vert) sur les chromosomes III, IV, VI, XII et XIV qui sont en rouge, jaune, mauve, gris, bleu.

IV.7.2. Etude basée sur la dynamique des polymères

Dans notre étude, nous avons été guidés pour l'interprétation du mouvement des chromosomes par des modèles de diffusion de chaînes des polymères proposés par De Gennes [148]. Le mouvement de polymère dans une solution concentrée est contraint par les effets stériques entre chaînes, ce qui conduit à une configuration étirée, et une diffusion comme un serpent contraint dans un réseau d'obstacles, qui est appelé mouvement de reptation. Notons que le modèle de reptation indique des dépendances précises vis-à-vis de la longueur de la chaîne de polymère, ce qui justifie notre choix d'utiliser une collection de chromosomes avec différentes longueurs. En outre, ce modèle ne décrit pas les interactions physiques entre deux polymères dans un réseau, ce qui caractérise les insertions localisées à côté d'un centromère ou d'un télomère. Nous avons donc focalisé notre étude sur les loci situés au milieu de bras chromosomiques, sachant qu'ils sont caractérisés par des dynamiques plus grandes [96, 130]. Nous avons regardé les MSD de sites chromosomiques sur de grandes échelles de temps allant de 20 ms à 50 s en utilisant une approche d'acquisition rapide

en mode continu, et une acquisition en saccade – pour éteindre l'exposition lumineuse entre deux images – pour les temps plus longs.

IV.7.3. Interprétation des résultats

IV.7.3.a. Chromosome XII (longueur 1078 kb)

Nous avons regardé trois locus sur le chromosome XII. Ce chromosome est un des plus longs, et il comporte les séquences d'ADN ribosomique impliqué dans la génèse du ribosome au niveau du nucléole. Les télomères droit et gauche du Chr 12 n'interagissent pas entre eux et une partie du Chr 12 sortant du nucléole interagit avec le bras droit long du Chr IV [135]. Les trois loci sont 240 kb, 320 kb et 830 kb, les deux premiers loci se trouvent à 55% (n=123) et le dernier à 63% (n=113) dans la zone I. La dynamique de ces loci suit une sous diffusion anormale (MSD avec une couleur rouge foncé (830kb) et orange (320 kb) respectivement dans les Figure IV. 16. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**a et b et Figure IV. 17.a et b qui ressemble largement à celle du *MAT* du chromosome III.

IV.7.3.b. Chromosome XIV (longueur 785 kb)

Nous avons observé la dynamique de deux sites sur le chromosome XIV, un à 302 kb (MSD avec une couleur bleu foncé dans les **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**c et Figure IV. 17.c) qui se trouve dans le centre avec un pourcentage de 62 % (n=146) et l'autre à 495 kb (MSD avec un couleur bleu clair dans les Figure IV. 16.d et Figure IV. 17.d) avec un pourcentage de 53 % dans la zone I (n=152). Ces deux locus ont une sous diffusion anormale. Notons que sur le même chromosome le site (ARS 1413) situé à 240 kb du télomère gauche a été étudié, indiquant une dynamique très rapide avec des larges déplacements $> 0,5 \mu\text{m}$ en moins de 10 secondes dans la phase G1 [96].

IV.7.3.c. Chromosome III (longueur 315 kb)

Le premier site marqué (*MAT*) se trouve sur le bras droit du chromosome III (198 kb) (MSD avec une couleur vert foncé dans les Figure IV. 16.e et Figure IV. 17.e). Ce locus a un pourcentage de 65 % ($n = 159$) dans la zone I, l'analyse de son MSD à des échelles de temps court et long montre une dynamique rapide associée à sous diffusion anormale, en accord avec une étude montrant qu'il a un rayon de confinement de 0.65 μm à 100 secondes [149]. Notons que nous avons déjà étudié le mouvement de ce site en 3D avec des cadences de 10 ms et que l'on a trouvé qu'il est très dynamique par rapport aux télomères [82].

Remarquons également que des événements de relocalisation rapide vers la paroi nucléaire ont été observés durant l'acquisition (19%). Cette dynamique particulière pourrait être expliquée par l'observation de Duan [135] sur les chromosomes courts qui ont une forte propension à interagir avec les autres chromosomes. Dans le même article, ils ont observé que deux régions du Chromosome III (positions de 30-90 kb et de 105-185 kb) ont beaucoup d'interactions entre elles.

IV.7.3.d. Les mutants :

Ensuite, nous nous sommes intéressés à des souches mutantes Δsir3 et Δsir4 , dans lesquelles les contraintes d'ancrage télomérique à la paroi nucléaire sont au moins partiellement déstabilisées et nous avons analysé les mouvements du télomère droit de chromosome III dans des souches mutantes et sauvages. Dans la littérature, il est connu que ce locus est délocalisé dans la zone I et qu'il a une dynamique plus importante [61]. Nos résultats ont montré que le locus se trouve à 63 % ($n = 112$) dans la zone I, ce qui est un grand pourcentage par rapport au sauvage dans lequel 30 % des loci sont périphériques [149]. En dépit de ce changement structural, nos résultats préliminaires montrent qu'une dynamique temporelle similaire du télomère dans les souches sauvage lorsque le locus est situé au milieu et ΔSir , et cette dynamique temporelle est beaucoup moins rapide que pour tous les autres sites au centre des bras chromosomiques (Figure IV. 16.f et Figure IV. 17.f). Autrement dit, la délétion ΔSir ne change pas les comportements dynamiques intrinsèques des régions télomériques, mais seulement leur distribution spatiale. Nous réalisons maintenant le même travail

avec un mutant ΔSir sur un autre télomère du Chromosome XIV, et nos résultats préliminaires semblent indiquer une réponse comparable, toutefois associée à une dynamique plus importante de ce télomère lorsqu'il est situé au centre du noyau. Ces interprétations sont résumées dans le Tableau IV. 3.

IV.7.3.e. Chromosome VI (longueur 270 kb)

On a regardé un point à 148 kb sur le chromosome VI. Ce locus localisé seulement à 22 % dans la zone I ($n = 60$), ses MSD analysés révèlent que ce locus a une dynamique plus lente que les autres chromosomes (MSD avec un couleur noir dans les Figure IV. 18 et Figure IV. 19), et semblable à un télomère (MSD avec un couleur mauve dans les Figure IV. 18 et Figure IV. 19). A noter que ce chromosome a une longueur < 300 kb, et, selon la proposition de Therizols et al, il reste dans une zone limitée à la proximité de la SPB [133]. En outre, les télomères du Chr VI gauches et droites sont juxtaposés et ont un mouvement confiné [49, 135], ce qui doit accroître les effets de confinement, même en milieu de chaîne.

IV.7.4. Chromosome IV (longueur 1531 kb)

Récemment nous avons reçu un nouveau site (ARS4-908), situé à 908 kb du télomère gauche du Chromosome IV, ce locus a été déjà étudié par Heun et al [96]. Dans cette étude, ils ont montré qu'il a une dynamique très rapide avec des larges déplacements $> 0,5 \mu\text{m}$ au moins de 10 secondes dans la phase G1. Le comportement dynamique de ce locus est en cours, et nous sommes particulièrement intéressés par ce chromosome « le plus long » qui va rajouter des éléments expérimentaux à intégrer dans notre modèle physique.

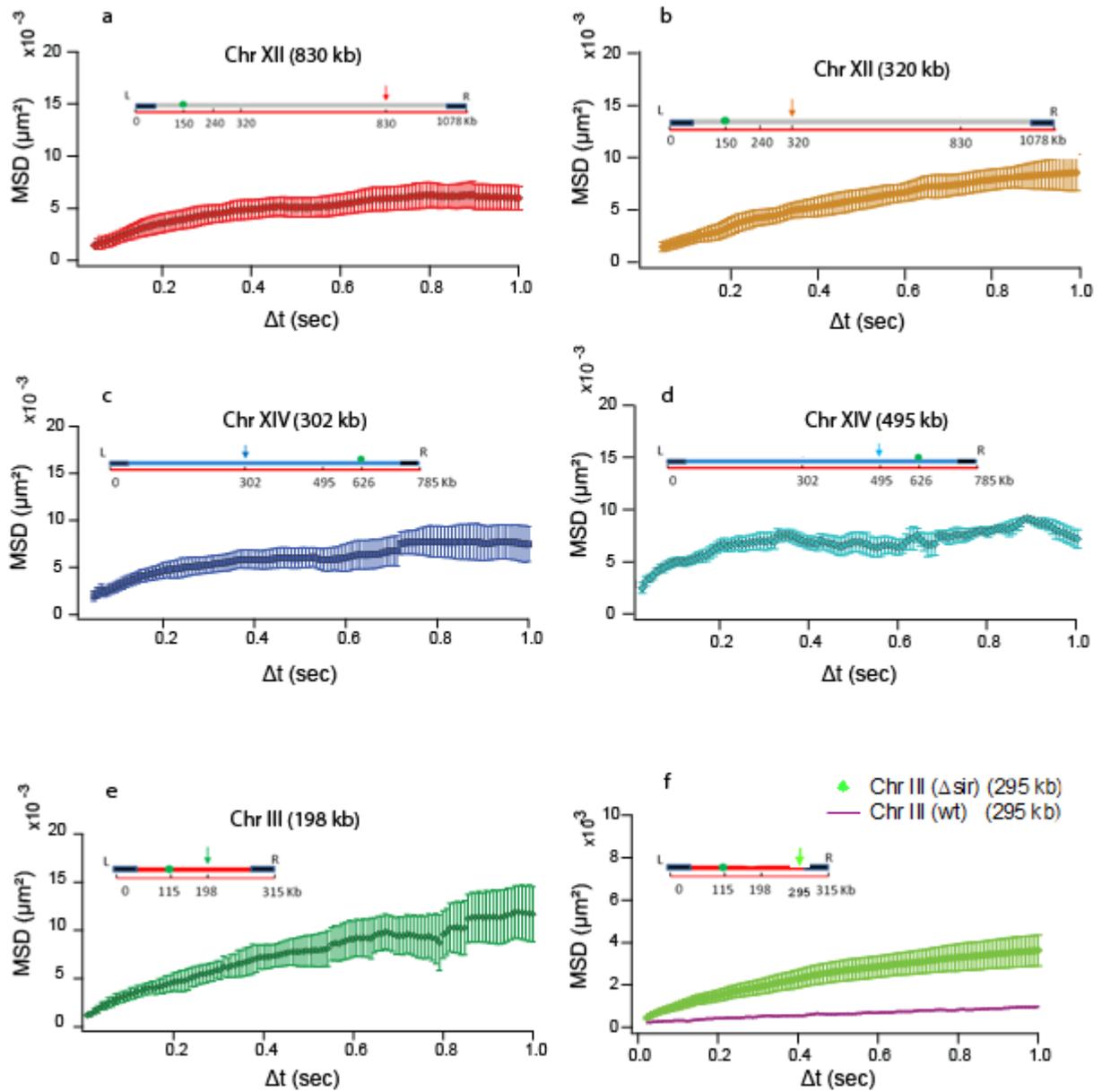


Figure IV. 16: MSD des loci chromosomiques analysés sur une gamme temporelle de 20 ms à 1 s.

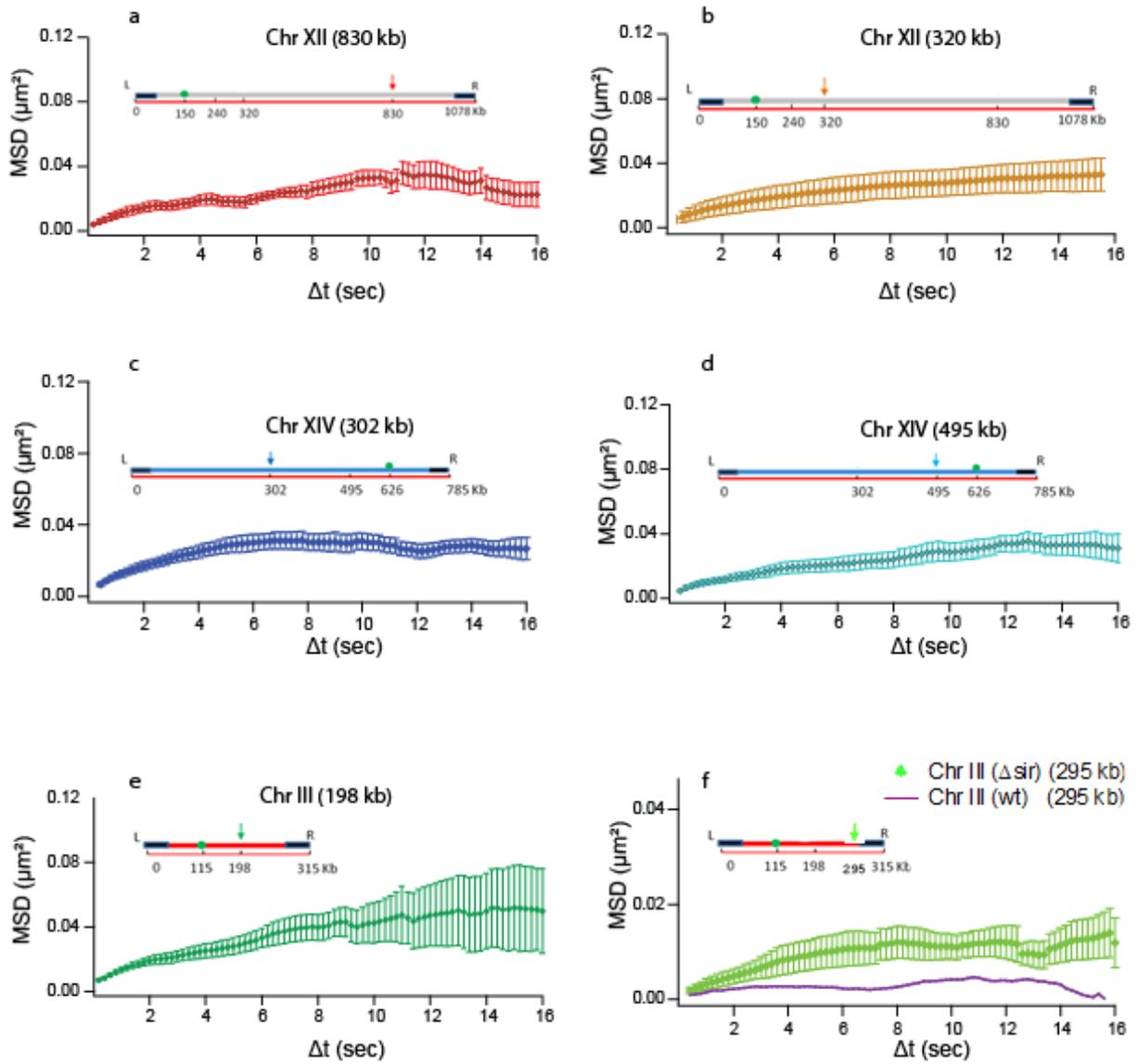


Figure IV. 17 MSD des loci chromosomiques analysé sur une large gamme temporelle de 200 ms à 16 s.

Chr	Longueur (kb)	Distance en (kb)		% zone I	Source	Gamme temporelle	Interprétation	α
		du Cent	du Tel					
XII	1078	90	240	55%	Nous	20 ms - 20 s	Sous diffusion anormale	0,53
XII	1078	170	320	55%	Nous	20 ms - 20 s	Sous diffusion anormale	0,49
XII	1078	680	248	63%	Nous	20 ms - 20 s	Sous diffusion anormale	0,48
XIV	785	324	302	62%	Nous	20 ms - 20 s	Sous diffusion anormale	0,53
XIV	785	131	290	53%	Nous	20 ms - 20 s	Sous diffusion anormale	0,46
XIV	785	386	240	NC	Heun 2001	1,5 s-150 s	Diffusion normale	1
III	315	83	117	63%	Nous	20 ms - 20 s	Sous diffusion anormale avec présence de locus en relocalisation	0,57
III	315	240	20	65%	Nous	20 ms - 20 s	Sous diffusion anormale mutant <i>Asir3 et Asir4</i>	0,53
VI	270	80	68	22%	Nous	200 ms - 20 s	Sous diffusion anormale	NC
II	800	42	268	57%	Cabal 2006	4 s - 15min	Sous diffusion anormale	0,4
IV	1531	523	623	NC	Heun 2001	1,5 s-150 s	Diffusion normale Nous souhaitons étudier ce locus	1

Tableau IV. 3: Tableau donnant un résumé pour les interprétations

IV.8. Premiers éléments quantitatifs

Le noyau peut être décrit comme une organelle encombrée contenant un maillage des bras des chromosomes qui sont organisés à grande échelle en raison de la présence de fonctions sous-compartiments (nucléole) et d'ancrages. Nos résultats préliminaires indiquent que le centre du noyau peut être décrit comme une solution des polymères enchevêtrée, dont le comportement dynamique a été largement étudié en physique des polymères théoriquement et expérimentalement [148, 150]. Le modèle de travail est appelé reptation ("tube model"). C'est un modèle dont les lois de comportement ne dépendent pas de la structure microscopique du polymère. Il est caractérisé par quatre régimes de diffusion, dont deux sont valables dans le contexte de la levure. Les segments du polymère diffusent sans rencontrer les contraintes stériques du milieu,

selon une loi générique en physique des polymères, appelée dynamique de Rouse et associée à un exposant de diffusion anormale de 0,5. Le polymère va ensuite « sentir » les contraintes stériques des autres chaînes, et subir une diffusion confinée associée à une loi d'exposant en 0,25. Notons que dans ces deux régimes, l'amplitude des fluctuations dépend de la viscosité du milieu et des caractéristiques physiques du polymère (longueur de persistance), mais pas de la longueur totale du bras chromosomique. Aussi, dans l'hypothèse où les propriétés mécaniques sont les mêmes pour tous les chromosomes et où la dynamique est déterminée principalement par les forces browniennes, nous nous attendons à des réponses similaires en termes de MSD pour tous les chromosomes. Le graphe de l'ensemble des MSD des sites chromosomiques étudiés montrent effectivement une dynamique semblable sur la gamme temporelle (20 ms à 2 s) suivant une sous diffusion anormale avec un exposant de 0,5 (en noir est la courbe ajustée dans Figure IV. 18 et Figure IV. 20). Ces données montrent aussi que la dynamique des loci en milieu de bras chromosomiques est plus grande que la dynamique du télomère (Figure IV. 18, Figure IV. 19 et Figure IV. 20) à l'exception site du chromosome VI qui révèle une dynamique proche d'un télomère (voir l'interprétation plus haut liée à la courte longueur de ce chromosome). A plus grande échelle temporelle, nos résultats semblent indiquer un MSD à croissance temporelle non linéaire et suivant un exposant de $\sim 0,5$ (en noir est la courbe ajustée Figure IV. 20), en accord avec les mesures de [48, 151]. Cet exposant inférieur à la dynamique observée aux temps courts est cohérent avec le modèle de reptation, mais la valeur de l'exposant n'est pas comprise de manière quantitative.

Dans la suite de notre travail, nous souhaitons compléter notre étude à la fois dans les souches sauvage, et dans des souches où des protéines chromatiniennes sont délétées pour affiner nos conclusions, et étoffer la valeur prédictive de notre modèle physique.

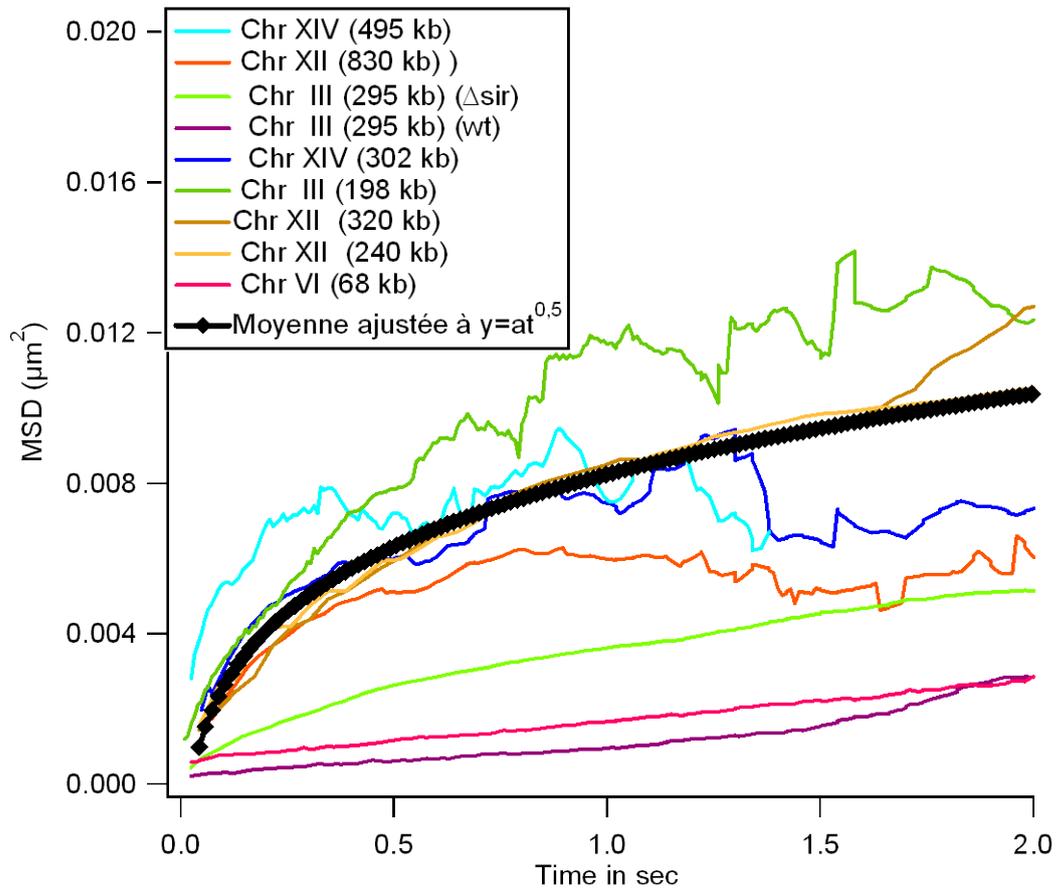


Figure IV. 18 : Représentation de l'ensemble des MSD moyennées pour des échelles de temps rapides. Les positions des insertions chromosomiques sont précisées dans l'insert.

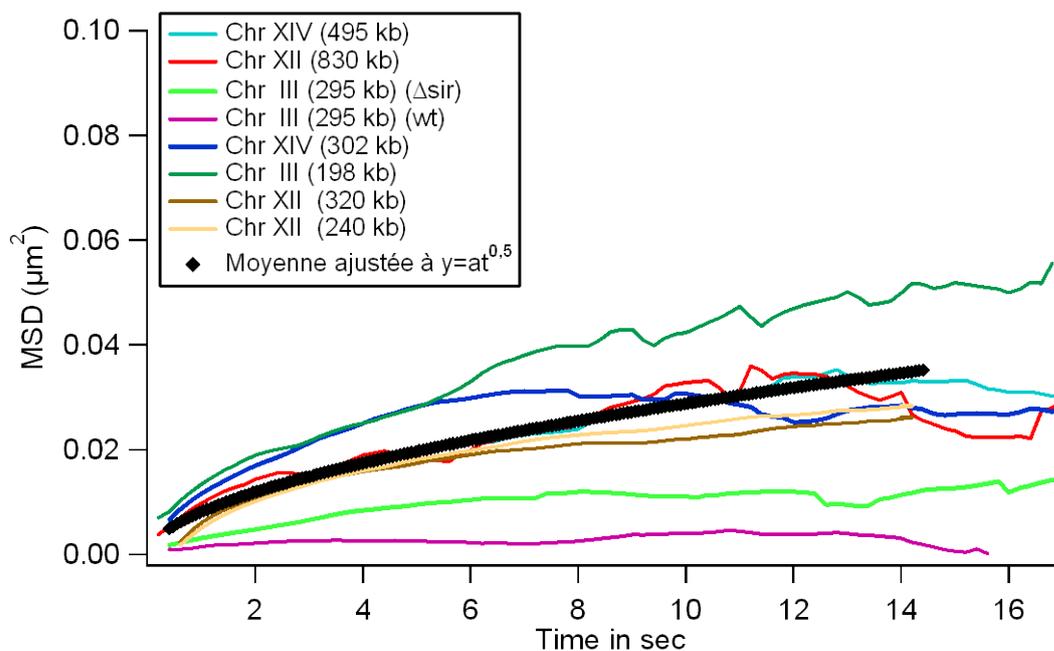


Figure IV. 19 : Représentation de l'ensemble des MSD moyennées pour des échelles de temps longues. Les positions des insertions chromosomiques sont précisées dans l'insert.

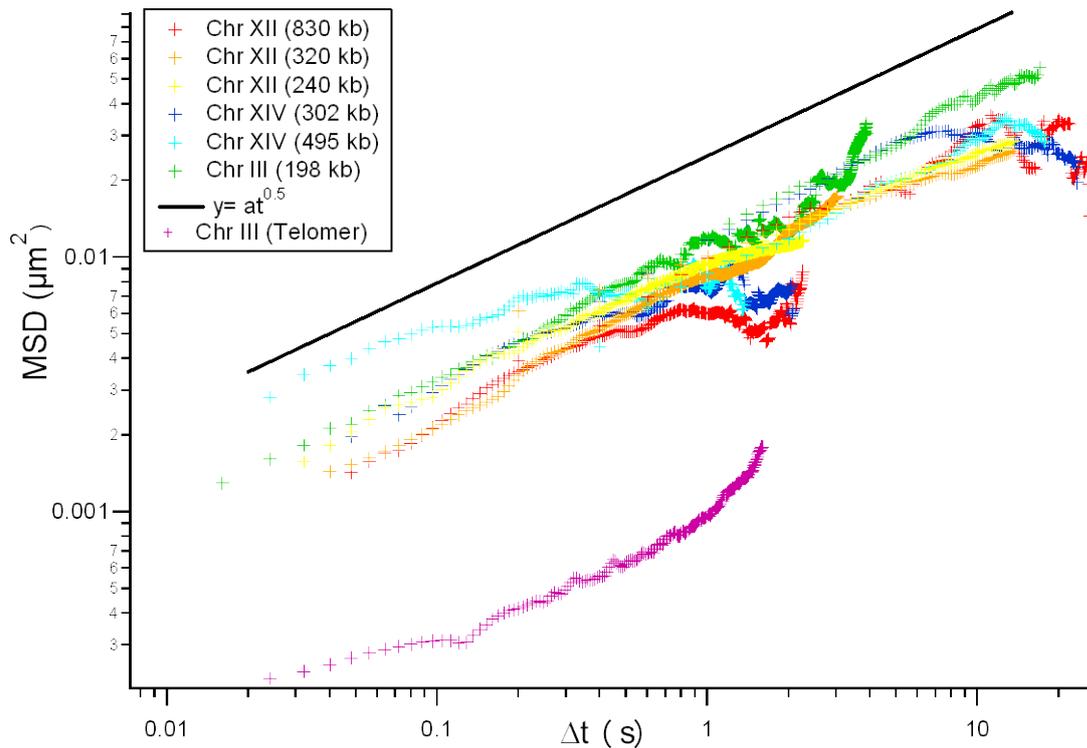


Figure IV. 20 : Représentation de l'ensemble des MSD en échelle logarithmique pour tous les locus situés en milieu de bras chromosomique. Les positions des insertions chromosomiques sont précisées dans l'insert.

IV.9. Conclusion

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est replié avec des protéines en chromatine qui forme une fibre dont le repliement est caractérisé *in vitro*, mais encore très mal décrite *in vivo*. Ayant constaté que les mouvements de cette structure sont encore très mal compris alors que la dynamique et l'organisation de la chromatine constitue un élément régulateur pour l'initiation et le déroulement de processus vitaux comme la transcription, la réplication et la réparation, nous avons développé des protocoles spécifiques pour l'imagerie rapide de la chromatine en tirant parti de nos développements instrumentaux décrits dans les chapitre II et III. Nous avons analysé la dynamique de la chromatine à travers ses déplacements quadratiques moyens au niveau de plusieurs sites distribués sur différents chromosomes avec de grandes

échelles de temps allant de 20 ms à 50 s. Nos résultats préliminaires, encore en cours d'analyse quantitative, semblent être en cohérence avec les prédictions du modèle de reptation, ce qui ouvre la voie à une interprétation rigoureuse des phénomènes de déplacement ayant lieu dans le contexte chromatinien.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif dans cette thèse est de développer de nouvelles technologies de microscopie en 3D adaptées à l'observation de cellules vivantes. En cours de route, nous avons identifié un problème scientifique non élucidé, à savoir la dynamique de la chromatine dans les levures, et nous avons voulu y répondre avec nos outils. En d'autres termes, deux axes principaux ont été développés au fil de cette thèse. Le premier, plus biotechnologique, a consisté à développer et optimiser une nouvelle méthode de microscopie 3D adaptée aux microscopes en champ large dans des cellules vivantes. Le second axe de travail, plus biophysique, vise à comprendre les phénomènes physiques déterminant la dynamique locale des chromosomes. Notons que l'originalité de ce travail a été remarqué par la communauté scientifique internationale, puisqu'il a retenu l'attention des média scientifiques (couverture de Lab-on-Chip, article dans le journal international du CNRS, article dans Highlights in Chemical Biology).

Sur le volet technologique, après la validation fonctionnelle du dispositif, nous avons fait un effort d'optimisation sur le volet des matériaux et sur le volet optique. Nous avons en particulier testé plusieurs substrats (110 et 100), et nous avons déposé divers matériaux des miroirs à forte réflectivité (Al, Or, Pt). Nos résultats nous ont conduits à privilégier des micromiroirs sur des substrats d'orientation (100) en déposant une couche réfléchissante d'aluminium. De plus, nous avons développé une seconde génération de miroirs présentant une seule facette au lieu de deux. Nous avons démontré que cette technologie améliore significativement les performances de nos miroirs : le facteur de photoblanchiment est divisé par deux, et les insertions chromatiniennes sont observées avec un meilleur contraste. Ces améliorations permettent de positionner les loci chromatiniens avec une précision spatiale accrue, et d'observer les cellules dans un bon état pendant de longues acquisitions. Ces nouveaux dispositifs nous semblent particulièrement utiles pour le suivi de multiples insertions chromatiniennes marquées en plusieurs couleurs, en particulier pour éviter le photoblanchiment rapide des fluorophores rouge, tel RFP.

Nous avons ensuite utilisé les miroirs « optimisés » pour observer les mouvements des chromosomes dans les levures vivantes en tirant parti des techniques d'ingénierie génétique pour le marquage ciblé dans le génome. Les outils actuels de visualisation en 3D dans la levure (microscopie en champ large, microscopie confocale, ou microscopie OMX) permettent d'atteindre des cadences d'acquisition de 1 s au mieux pour l'acquisition d'un seul fluorophore. Les performances de notre dispositif nous laissent atteindre une gamme temporelle à l'échelle de la dizaine de millisecondes en 3D, donc nettement supérieure à toutes ces technologies conventionnelles. Nos meilleurs résultats montrent que l'on peut suivre en 3D le mouvement de loci chromosomiques sur le Chromosome III avec un intervalle de temps d'acquisition de 20 ms avec une erreur de positionnement de 27 nm. En outre, notre technique est adaptée pour suivre en 3D deux insertions chromosomiques marquées avec la même couleur (GFP), mais aussi avec deux couleurs, et il nous semble pertinent d'étendre le potentiel de cette technologie vers d'autres types cellulaires, les mammifères, pour lesquels des résultats préliminaires ont été obtenus, et les bactéries.

Notons que pour aboutir à ces résultats expérimentaux, nous avons effectué un travail d'optimisation sur la chaîne d'acquisition d'imagerie de la levure. Nous sommes parvenus à suivre le mouvement chromatinien avec un temps d'acquisition de 5 ms, soit une vitesse 200 fois plus rapide que dans la littérature. Notons que ce travail d'optimisation a été fait de manière relativement empirique, et le travail en cours de l'étudiant en thèse Julien Mathon s'attèle à préciser de manière quantitative les meilleures conditions d'imagerie. Nous avons au passage constaté que les performances du système étaient significativement améliorées en utilisant une source de lumière à base de diodes laser (LED), dont la puissance est réglable sur plusieurs longueurs d'onde, ce qui ouvre la voie à des observations rapides de plusieurs fluorophores. Ce volet est important pour le long terme car nos collaborateurs biologistes ont développé des souches de levure dans lesquelles deux gènes sont marqués avec deux couleurs différentes. Or, à ce jour, l'analyse dynamique à deux couleurs en 3D est difficile. Dans ce cadre, nous avons développé un système à deux

caméras pour le suivi simultané de deux fluorophores (GFP/RFP, voir figure ci-dessous), et nos résultats préliminaires ont montré qu'il est possible de suivre simultanément deux loci avec des cadences d'acquisition de ~50 ms.

Enfin, nous avons mené un projet de biophysique dans lequel nous cherchons à comprendre les paramètres physiques déterminant les mouvements des chromosomes dans les levures vivantes. Nous nous sommes concentrés sur l'étude de la dynamique des chromosomes dans la levure « *Saccharomyces cerevisiae* » suivant des échelles de temps allant de 20 ms à 50 s. Quatorze sites chromosomiques ont été marqués sur différents chromosomes par nos collaborateurs, et nous avons analysé quantitativement leur dynamique. Les premières données montrent l'existence d'une sous diffusion anormale à des temps courts avec un coefficient de 0,5 qui n'a jamais été décrit auparavant. Nous avons en outre remarqué que les l'amplitude des mouvements pour les chromosomes III, XII, XIV sont semblables, alors qu'ils sont caractérisés par des longueurs différentes. Ce résultat peut être expliqué par un modèle classique de physique des polymères, le modèle de Reptation, qui nous permet d'entrevoir une mesure quantitative des paramètres dynamiques intrinsèques des chromosomes. A des temps plus longs, nous nous attendons à mesurer un coefficient de diffusion anormal plus petit, en accord avec les données de Cabal et al. ([48]), lié au fait que le polymère « subit » les contraintes stériques des autres chromosomes. Ce résultat n'a pas encore été clairement établi avec nos expériences, et nous travaillons dans cette direction en réalisant des acquisitions plus lentes.

Enfin, nous souhaitons compléter notre étude en analysant l'effet de la déplétion de protéines interagissant avec la structure des chromosomes. Nous avons ciblé 4 protéines, à savoir *Sir4* (une protéine impliquée dans l'ancrage des chromosomes aux parois nucléaires), *Hho1* et *Sin1* (deux protéines interagissant avec les nucléosomes et impliquées dans la compaction de la chromatine), et *Asf1* (une protéine impliquée dans l'assemblage des nucléosomes). Nos résultats préliminaires montrent que la délétion de la protéine Δ *Sir4* modifie la position des télomères dans le noyau, mais ne modifie pas la dynamique intrinsèque des télomères, qui est déterminée par les propriétés

intrinsèques de la chromatine. Avec cet ensemble de résultats, nous espérons pouvoir étoffer la valeur prédictive de notre modèle physique, d'extraire des paramètres physiques de la chromatine, et de comprendre comment la dynamique de la chromatine est régulée *in vivo*.

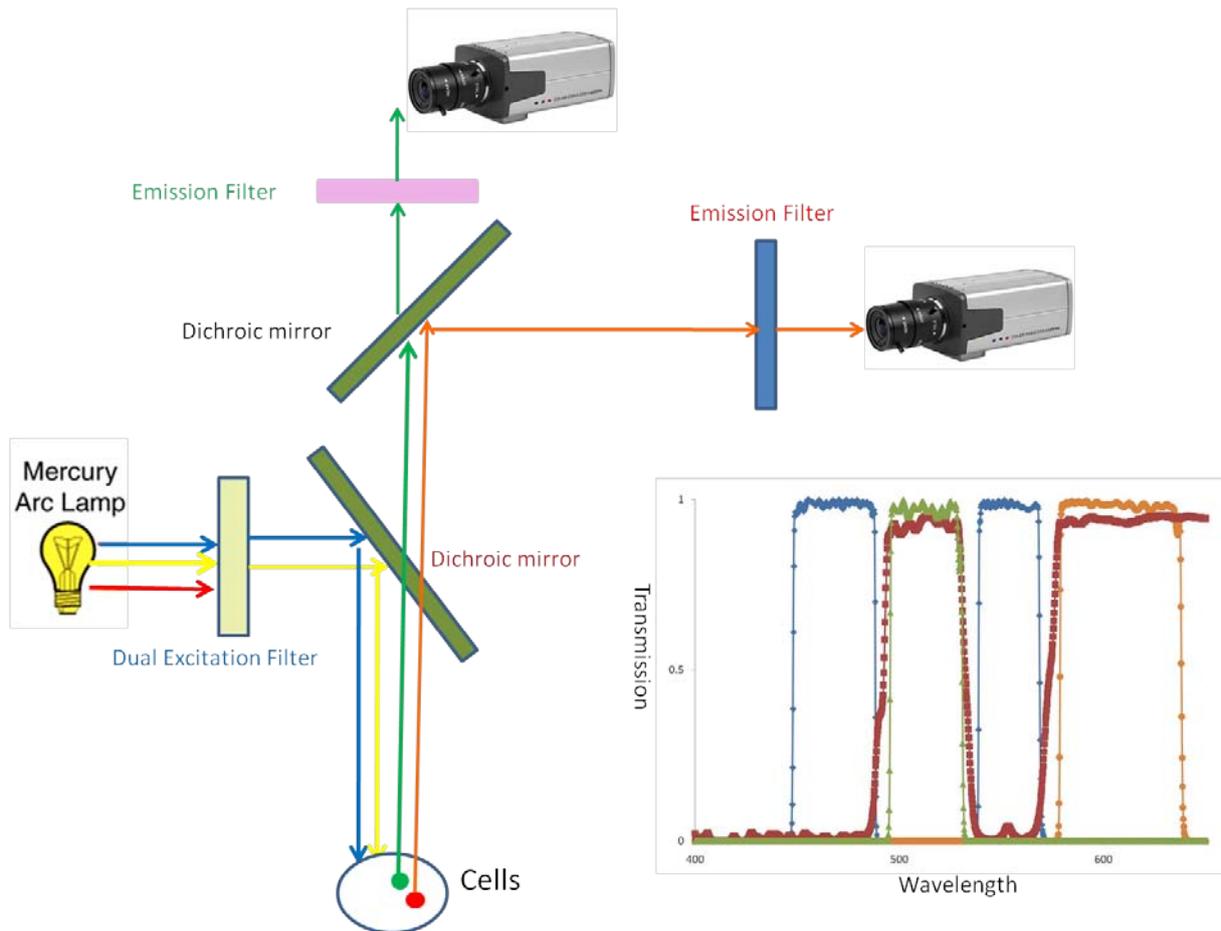


Figure 1: Schéma montrant le principe d'acquisition simultanée de deux fluorophores GFP et RFP. Un filtre à double excitation (couleur bleu dans les courbes à gauche) laisse passer la lumière d'excitation pour les fluorophores dans les cellules (GFP et RFP). La lumière d'émission traverse un miroir dichroïque (rouge foncé sur la courbe) ensuite ce faisceau sera divisé par un deuxième miroir dichroïque qui réfléchit une gamme des longueurs d'onde (RFP) et laisse passer une autre gamme (GFP). Après ces deux faisceaux seront envoyés vers deux caméras séparées.

Annexe A

✓ **Publications and proceedings**

1. H. Hajjoul, S. Kocanova, I. Lassadi et al., "Lab-on-Chip for fast 3D particle tracking in living cells," *Lab on a Chip* 9 (21), 3054-3058 (2009), Top ten. Impact factor 6.48.
2. Hajjoul, H., et al. "Novel Approach for 3d Live Cell Fluo-Rescence Microscopy Based on Microfabricated Mirrors". October 12_16, 2008; p 1B3. μ TAS 2008. San Diego.
3. H. Hajjoul, et al., "Novel lab on chip technology for fast 3D particle tracking in living yeasts based on micromirrors". MC2009, vol 2: Life sciences, p 88, Graz, Austria.
4. Qhe et al. Large scale directed assembly of micro and nanoparticles on micropatterned poly-acrylamide hydrogels submitted (*Advanced materials*).

✓ **Press release**

1. CNRS magazine, October 6, 2009, Lab on chip: micro-mirrors for viewing 3D movements of DNA.
2. CNRS International Magazine nb 16 January 2010, page 10.
3. Cover of the *Lab on Chip* journal, Volume 9, and Number 21.
4. Highlight in *Chemical Biology* September 2009.
5. CNRS report (Midi Pyrénées and France) for 2009 year, page 38.

✓ **Oral presentations**

1. Fast 3D Chromatin dynamics studied in living yeast using a novel Lab on Chip technology. European Biophysics Congress 2009, Genoa, Italy.
2. Novel lab on chip technology for fast 3D particle tracking in living yeasts

- based on micromirrors. MC2009, Graz, Austria. Invited Speaker.
3. Realization of a lab on a chip to study the dynamics of chromatin in 3D, GDR microfluidic, 2009, Bordeaux.
 4. Studying chromatin dynamics in living cells using fast time acquisition. Toulouse club noyau 2009.
 5. Live cell microscopy approaches to dissect chromatin dynamics in 3D at high temporal resolution. Colloque chromosomes Paris June 2010.

✓ **Posters**

1. 3D dynamic fluorescence microscopy based on fabricated V-shaped mirrors, JNTE 08, Toulouse.
2. Focus on chromatin dynamics, EMBO Nuclear structure and organization meeting, Ile sur la Sorghe, France (September 2009).
3. Realization and optimization of micromirrors for chromatin dynamics. GEET day 2010. **1^{er} Accessit: Best poster.**
4. 75th Cold Spring Harbor Symposium on Nuclear Organization, CSH laboratories, NY, (June 2010).

Annexe B

1. Suivi des particules

Cela fait près de 100 ans que Jean-Baptiste Perrin et ses étudiants ont mené leurs recherches dans le mouvement brownien de particules de gomme-gutte [152]. Sans utiliser un ordinateur, avec la main, ils avaient soigneusement et laborieusement suivi le mouvement des particules à travers une série des plaques photographiques. Heureusement, pour les chercheurs d'aujourd'hui le processus d'analyse de telles images peut être automatisé. Le suivi de particules à base de vidéo n'est pas nouveau à la science. Le domaine de la vélocimétrie par images de particules (PIV), où des petites particules sont utilisées pour déterminer le profil de vitesse des fluides en deux ou trois dimensions est parvenu avec des premiers documents ayant été publiés en 1984 [153-155]. Depuis, plusieurs algorithmes ont été développés pour permettre une analyse optimale de la trajectoire des particules.

La combinaison de nouvelles techniques de fluorescence comme l'étiquette des protéines spécifiques et l'augmentation de la vitesse des ordinateurs ont permis d'obtenir des données de haute qualité reflétant la position en fonction du temps de nombreux objets avec une résolution nanométrique dans des cellules vivantes. Dans ce contexte se situent de nombreuses utilisations, y compris, la détermination des constantes de diffusion des protéines dans les membranes cellulaires [156], les déplacements de billes attachés à des moteurs moléculaires [157-158], et le déplacement des fibres d'actine ou de microtubules conduit par des moteurs moléculaires [159].

1.1. Logiciels existants pour le suivi de particules

Plusieurs programmes adaptés pour le suivi des particules sont disponibles gratuitement dans le domaine public. Un logiciel sous IDL a été développé par John Crocker et David Grier en 1996 [160] pour le suivi des particules dans des séquences vidéo. Blair et Dufresne ont mis en œuvre un environnement de programmation MatLab [161], tandis que Levy [162] a abouti à une solution basée sur Java à l'aide

d'améliorations proposées en 2005 par Sbalzarini et Koumoutsakos [87]. Nous avons utilisé leur plugin « ParticleTracker » qui est développé dans le logiciel libre ImageJ.

1.1.1. Particle tracker sous imagej

Ce plugin a été utilisé avec succès pour différentes applications biologiques, y compris le suivi des virus et les trajectoires des particules de type viral sur ou dans les cellules vivantes [87, 163], l'examen des microdomaines membranaires individuels et leur relation avec le cytosquelette [164], l'analyse du mouvement des microtubules [165], le trafic de particules lors de la phagocytose [166], et la migration cellulaire [167].

Le point caractéristique de cet algorithme de suivi est qu'il emploie deux étapes principales : la détection des points caractéristiques de chaque image et le lien entre ces points avec des trajectoires. L'étape de détection est elle-même divisée en plusieurs étapes qui comprennent la restauration d'images, la réduction du bruit, l'estimation et le raffinement de l'endroit du point et la non-discrimination des particules. Cet algorithme est basé sur le travail de John Crocker [160].

Dans une première étape de restauration, les imperfections des images sont corrigées en appliquant un filtre gaussien pour éliminer les variations d'intensité et de bruit aléatoire qui se produisent lors de la numérisation de la caméra CCD et de l'acquisition d'images.

La deuxième étape du programme est de trouver l'intensité des maxima locaux dans l'image filtrée. Un pixel est considéré comme l'emplacement approximatif d'un point si l'intensité du pixel est plus grande que ses voisins et s'il se trouve dans le percentile supérieur des valeurs d'intensité de l'image. Ensuite, une dilatation en niveaux de gris de chaque image est effectuée afin d'établir lequel des pixels restants est le candidat optimal de positions.

Ensuite une troisième étape de raffinement de la position de la particule est réalisée pour avoir bonne estimation de son centre. Les particules peuvent être suivies latéralement avec une précision de 10 nm dans le plan focal. Finalement, une quatrième

étape de discrimination ayant pour but de rejeter les fausses particules telles que les détections de signaux non-spécifiques, la poussière ou des particules agrégats.

1.1.2. Lien des particules

L'algorithme de détection des particules est appliqué à chaque image de la vidéo puis il relie les points correspondants à la même particule physique en définissant une fonction coût qu'il s'agit de la minimiser pour sortir des trajectoires.

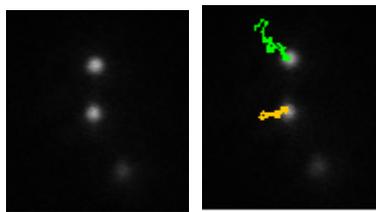


Figure 2 : Trajectoires de deux particules visualisées à l'aide de plugin du logiciel d'ImageJ.

Avec l'interface de ce plugin, l'utilisateur peut changer les paramètres qui sont nécessaires incluent la taille de rayon en pixels, le percentile qui est nécessaire pour déterminer la sensibilité de l'algorithme par rapport au fond et la concentration en particules sur l'image analysée. On peut déterminer le déplacement maximal d'une particule entre deux images, ainsi que la possibilité éventuelle d'une non-détection de cette particule pendant un certain nombre d'images. Un tri supplémentaire est assuré en filtrant les trajectoires qui sont détectées sur un nombre insuffisant d'images. Enfin, l'utilisateur contrôle les trajectoires détectées pour vérifier qu'elles correspondent réellement à celle des particules voulues.

Les autres méthodes utilisées pour le suivi des algorithmes consistent notamment à ajuster une courbe Gaussienne à l'objet [168] et la corrélation croisée [169].

Une étude comparative de l'efficacité de certains algorithmes gratuits et commerciaux, a été publiée par Carter et al [170]. Pour le suivi des particules fluorescentes, une étude quantitative et comparative a été effectuée par Cheezum et al [171].

2. Fabrication des gels en Polyacrylamide

Le réseau de polyacrylamide est formé par polymérisation de monomère d'acrylamide en présence du bis acrylamide (NN'méthylène-bisacrylamide). L'acrylamide se polymérise en longue chaîne. De temps en temps une molécule de bis acrylamide est incorporée dans le polymère. La polymérisation de l'acrylamide est un exemple de catalyse par radicaux libres initiée par l'addition de persulfate.

Le radical TEMED réagit avec une molécule d'acrylamide, formant un radical TEMED-Acrylamide. Le TEMED catalyse la décomposition des ions persulfates pour donner un radical libre R^\bullet (molécule avec un électron seul) :

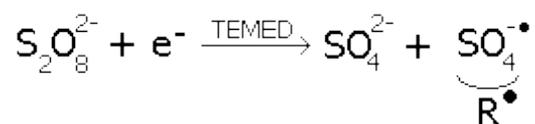
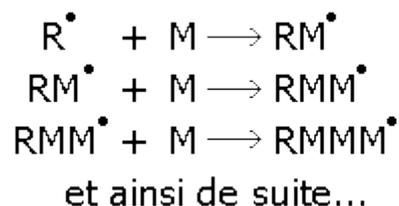


Figure 2 : Initiation de la polymérisation

Si on représente ce radical R^\bullet et M un monomère d'acrylamide, on peut alors représenter la polymérisation ainsi :



La polymérisation continue jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de monomère d'acrylamide (M) libre. Cette polymérisation incorpore des molécules de bis acrylamide comme si c'étaient des molécules d'acrylamide ; ceci ne change rien à la réaction de polymérisation en elle-même, mais permet de lier deux polymères d'acrylamide entre eux (Figure 2).

La première étape du processus de polymérisation est "l'initiation de la chaîne". Les prochaines étapes sont l'allongement de la chaîne, dont la chaîne polymère augmente en répétant les monomères d'acrylamide à la chaîne de plus en plus avec le terminus de radicaux libres. La Chaîne de ramification se produit quand une molécule de bis-acrylamide est ajoutée à la fin de la chaîne. La terminaison de la chaîne se

produit lorsque deux radicaux libres réagissent en donnant un composé stable avec des électrons appariés.

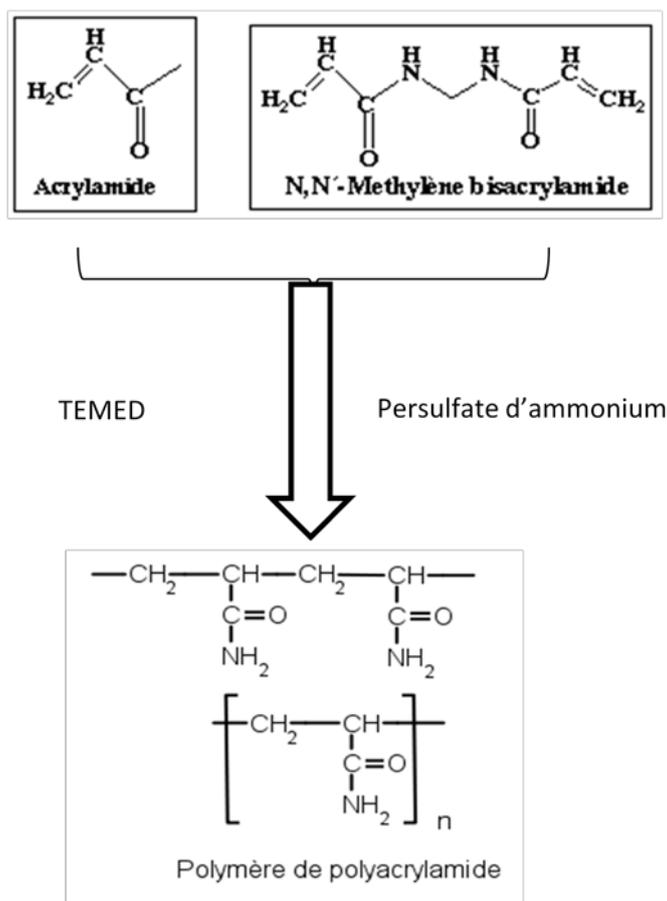


Figure 3: Réaction de polymérisation

Il existe une sorte de nomenclature relative à la composition des gels de polyacrylamide, qui est largement utilisée. Dans cette nomenclature, T représente le pourcentage exprimé en poids/volume des monomères acrylamide/bisacrylamide dans le gel. Le terme C exprime la part en pourcentage de l'agent bifonctionnel (bisacrylamide) dans le mélange de monomères. Exemple : un gel acrylamide / bisacrylamide à 8 %, 19:1 signifie que la valeur de T est de 8 % et celle de C est de 5 % ($1/19 = 5/100$). Le bisacrylamide représente donc 5 % du mélange acrylamide/bisacrylamide.

3. Montage caméra à deux couleurs



Références

1. R.N.Noyce, *Semiconductor Device-And-Lead Structure*. 1961, Google Patents: US Patent No. 2,891,877.
2. Jolly, R. and R. Muller, *Miniature cantilever beams fabricated by anisotropic etching of silicon*. *Journal of The Electrochemical Society*, 1980. **127**: p. 2750.
3. Nathanson, H., et al., *The resonant gate transistor*. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 1967. **14**(3): p. 117-133.
4. Tai, Y. and R. Muller, *IC-processed electrostatic synchronous micromotors*. *Sensors and Actuators*, 1989. **20**(1-2): p. 49-55.
5. Chen, P., R. Muller, and A. Andrews, *Integrated silicon PI-FET accelerometer with proof mass*. *Sensors and Actuators*, 1984. **5**(2): p. 119-126.
6. Chau, K., et al., *An integrated force-balanced capacitive accelerometer for low-g applications*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 1996. **54**(1-3): p. 472-476.
7. Zimmermann, L., et al., *Airbag application: a microsystem including a silicon capacitive accelerometer, CMOS switched capacitor electronics and true self-test capability*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 1995. **46**(1-3): p. 190-195.
8. Hanse, J.G. *Honeywell MEMS inertial technology & product status*. in *Position Location and Navigation Symposium*, 2004. PLANS 2004. 2004.
9. Kim, K., J. Ko, and Y. Cho, K Lee, Kwak BM and Park K 1995 *A skew-symmetric cantilever accelerometer for automotive airbag applications*. *Sensors Actuators*: p. 121-6.
10. Allen, R., J. Meyer, and W. Knight, *Thermodynamics and hydrodynamics of thermal ink jets*. *Hewlett-Packard J*, 1985. **36**(5): p. 21-27.
11. Fujino, Y., et al., *Development of Vehicle Intelligent Monitoring System (VIMS)*, in *Smart Structures and Materials 2005: Sensors and Smart Structures Technologies for Civil, Mechanical, and Aerospace*, Pts 1 and 2, M. Tomizuka, Editor. 2005. p. 148-157.
12. Davis, W., et al. *MEMS-based pico projector display*. 2008.
13. Tentzeris, M., J. Laskar, and asme, *RF system-on-package (SOP) development for compact low cost wireless front-end systems*. 2003: *Advances in Electronic Packaging* 2003, Vol 2. 19-24.
14. Sun, Y. and Y. Kwok, *Polymeric microfluidic system for DNA analysis*. *Analytica chimica acta*, 2006. **556**(1): p. 80-96.
15. Tegenfeldt, J., et al., *Micro-and nanofluidics for DNA analysis*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2004. **378**(7): p. 1678-1692.
16. Figeys, D. and D. Pinto, *Proteomics on a chip: promising developments*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(2): p. 208-216.
17. Lion, N., et al., *Microfluidic systems in proteomics*. *Electrophoresis*, 2003. **24**(21): p. 3533-3562.
18. El-Ali, J., P. Sorger, and K. Jensen, *Cells on chips*. *Nature*, 2006. **442**(7101): p. 403-411.
19. Tanaka, Y., et al., *Biological cells on microchips: new technologies and applications*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. **23**(4): p. 449-458.
20. Hatch, A., et al., *A rapid diffusion immunoassay in a T-sensor*. *Nature Biotechnology*, 2001. **19**(5): p. 461-465.
21. Lim, C. and Y. Zhang, *Bead-based microfluidic immunoassays: the next generation*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. **22**(7): p. 1197-1204.
22. Suzuki, S. and S. Honda, *Miniaturization in carbohydrate analysis*. *Electrophoresis*, 2003. **24**(21): p. 3577-3582.

23. Pipper, J., et al., *Catching bird flu in a droplet. Nature medicine*, 2007. **13**(10): p. 1259-1263.
24. Ziober, B., et al., *Lab-on-a-chip for oral cancer screening and diagnosis. Head & neck*, 2008. **30**(1): p. 111-121.
25. Dhoub, K., et al., *Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal X-ray analysis. Lab on a Chip*, 2009. **9**(10): p. 1412-1421.
26. Bancaud, A., et al., *Measurement of the surface concentration for bioassay kinetics in microchannels. Anal. Chem*, 2005. **77**(3): p. 833-839.
27. Zebda, A., et al., *Electrochemical performance of a glucose/oxygen microfluidic biofuel cell. Journal of Power Sources*, 2009. **193**(2): p. 602-606.
28. Gardeniers, J. and A. Van den Berg, *Lab-on-a-chip systems for biomedical and environmental monitoring. Analytical and bioanalytical chemistry*, 2004. **378**(7): p. 1700-1703.
29. Demello, A., *Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. NATURE-LONDON-*, 2006. **442**(7101): p. 394.
30. Haswell, S.J., *Chemical technology - All together now. Nature*, 2006. **441**(7094): p. 705-705.
31. Weigl, B., R. Bardell, and C. Cabrera, *Lab-on-a-chip for drug development. Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003. **55**(3): p. 349-377.
32. Sato, K., et al., *Determination of carcinoembryonic antigen in human sera by integrated bead-bed immunoassay in a microchip for cancer diagnosis. Anal. Chem*, 2001. **73**(6): p. 1213-1218.
33. Dorfman, K., et al., *Contamination-free continuous flow microfluidic polymerase chain reaction for quantitative and clinical applications. Anal. Chem*, 2005. **77**(11): p. 3700-3704.
34. deMello, A.J., *Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. Nature*, 2006. **442**(7101): p. 394-402.
35. Abgrall, P. and A. Gue, *Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review. Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2007. **17**: p. R15.
36. Mooney, D., M. Reed, and T. Fahmy, *Label-free biomarker detection from whole blood*. 2009.
37. Nagrath, S., et al., *Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. Nature*, 2007. **450**(7173): p. 1235-1239.
38. Saliba, A., et al., *Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(33): p. 14524.
39. Freire, S. and A. Wheeler, *Proteome-on-a-chip: Mirage, or on the horizon? Lab on a Chip*, 2006. **6**(11): p. 1415-1423.
40. Ramsey, J., et al., *High-efficiency, two-dimensional separations of protein digests on microfluidic devices. Anal. Chem*, 2003. **75**(15): p. 3758-3764.
41. Zamfir, A., *Recent advances in sheathless interfacing of capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A*, 2007. **1159**(1-2): p. 2-13.
42. Xu, G., et al., *A self-contained all-in-one cartridge for sample preparation and real-time PCR in rapid influenza diagnosis. Lab on a Chip*, 2010.
43. <http://www.abbottpointofcare.com/>.

44. Stybayeva, G., et al., *Lensfree Holographic Imaging of Antibody Microarrays for High-Throughput Detection of Leukocyte Numbers and Function*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(9): p. 3736-3744.
45. Tan, H., et al., *A lab-on-a-chip for detection of nerve agent sarin in blood*. *Lab on a Chip*, 2008. **8**(6): p. 885-891.
46. Jang, K.J. and K.Y. Suh, *A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells*. *Lab on a Chip*, 2010. **10**(1): p. 36-42.
47. Günther, A., et al., *A microfluidic platform for probing small artery structure and function*. *Lab on a Chip*, 2010. **10**(18): p. 2341-2349.
48. Cabal, G., et al., *SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope*. *Nature*, 2006. **441**(7094): p. 770-773.
49. Bystricky, K., et al., *Chromosome looping in yeast*. *The Journal of Cell Biology*, 2005. **168**(3): p. 375.
50. Kao, H. and A. Verkman, *Tracking of single fluorescent particles in three dimensions: use of cylindrical optics to encode particle position*. *Biophysical journal*, 1994. **67**(3): p. 1291-1300.
51. Huang, B., et al., *Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy*. *Science*, 2008. **319**(5864): p. 810.
52. Henriques, R., et al., *QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ*. *Nature Methods*, 2010. **7**(5): p. 339-340.
53. Sun, Y., et al., *Parallax: high accuracy three-dimensional single molecule tracking using split images*. *Nano Lett*, 2009. **9**(7): p. 2676-2682.
54. Pavani, S., et al., *Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(9): p. 2995.
55. Toprak, E., et al., *Three-dimensional particle tracking via bifocal imaging*. *Nano Lett*, 2007. **7**(7): p. 2043-2045.
56. Ram, S., et al., *High Accuracy 3D Quantum Dot Tracking with Multifocal Plane Microscopy for the Study of Fast Intracellular Dynamics in Live Cells*. *Biophysical journal*, 2008. **95**(12): p. 6025-6043.
57. Levi, V., Q. Ruan, and E. Gratton, *3-D particle tracking in a two-photon microscope: application to the study of molecular dynamics in cells*. *Biophysical journal*, 2005. **88**(4): p. 2919-2928.
58. Carlton, P., et al., *Fast live simultaneous multiwavelength four-dimensional optical microscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(37): p. 16016.
59. Seale, K., et al., *Mirrored pyramidal wells for simultaneous multiple vantage point microscopy*. *Journal of Microscopy*, 2008. **232**(1): p. 1-6.
60. McMahan, M., et al., *3D Particle Trajectories Observed by Orthogonal Tracking Microscopy*. *ACS nano*, 2009. **3**(3): p. 609-614.
61. Gartenberg, M., et al., *Sir-mediated repression can occur independently of chromosomal and subnuclear contexts*. *Cell*, 2004. **119**(7): p. 955-967.
62. Rottmann, H.R., *Photolithography in Integrated Circuit Mask Metrology*. *IBM Journal of Research and Development*, 1974. **18**(3): p. 225-231.
63. Liu, J.L., et al., *Fabrication of silicon quantum wires by anisotropic wet chemical etching and thermal oxidation*. *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 1995. **13**(5): p. 2137-2138.
64. Petersen, K., *Silicon as a mechanical material*. *Proceedings of the IEEE*, 1982. **70**(5): p. 420-457.

65. Gardeniers, J., R. Tjerkstra, and A. Berg, *Fabrication and application of silicon-based microchannels*. 2000.
66. Iliescu, C. and F. Tay. *Wet etching of glass*. 2005.
67. Kendall, D., *A new theory for the anisotropic etching of silicon and some underdeveloped chemical micromachining concepts*. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 1990. **8**: p. 3598.
68. Smith, R., et al., *The potential dependence of silicon anisotropic etching in KOH at 60 C*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1987. **238**(1-2): p. 103-113.
69. Sato, K., et al., *Anisotropic etching rates of single-crystal silicon for TMAH water solution as a function of crystallographic orientation*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 1999. **73**(1-2): p. 131-137.
70. Tabata, O., et al., *Anisotropic etching of silicon in TMAH solutions*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 1992. **34**(1): p. 51-57.
71. Offereins, H., K. Köhl, and H. Sandmaier, *Methods for the fabrication of convex corners in anisotropic etching of (100) silicon in aqueous KOH*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 1990. **25**(1-3): p. 9-13.
72. Richter, K., et al., *Deep plasma silicon etch for microfluidic applications*. *Surface and Coatings Technology*, 1999. **116**: p. 461-467.
73. Habraken, F., et al., *Hydrogen in low pressure chemical vapor deposited silicon (oxy) nitride films*. *Journal of Applied Physics*, 1986. **59**: p. 447.
74. Wu, D., et al., *Plasma-deposited amorphous silicon carbide films for micromachined fluidic channels*. *Applied Surface Science*, 1999. **144**: p. 708-712.
75. Duffy, D., et al., *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane)*. *Anal. Chem*, 1998. **70**(23): p. 4974-4984.
76. Xia, Y., *WHITESIDES. GM: 'Soft lithography'*. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl*, 1998. **37**: p. 550-575.
77. Lin, C., et al., *A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photoresist*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2002. **12**: p. 590.
78. Fulcrand, R., et al., *Development of a flexible microfluidic system integrating magnetic micro-actuators for trapping biological species - art. no. 105019*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2009. **19**(10): p. 5019-5019.
79. Studer, V., A. Pepin, and Y. Chen, *Nanoembossing of thermoplastic polymers for microfluidic applications*. *Applied physics letters*, 2002. **80**: p. 3614.
80. <http://faculty.washington.edu>.
81. Hajjoul H, G., J.; Dilhan, M.; Kocanova, S.; Bystricky, K.; Bancaud, A, A. *Novel Approach for 3D Live Cell Fluorescence Microscopy Based on Microfabricated Mirrors*. . *The 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 2008. p **1B3**.
82. Hajjoul, H., et al., *Lab-on-Chip for fast 3D particle tracking in living cells*. *Lab on a Chip*, 2009. **9**(21): p. 3054-3058.
83. Froment, J., S. Masnou, and J. Morel, *La géométrie des images naturelles et ses algorithmes*. 1998.
84. Longuet-Higgins, H., *The role of the vertical dimension in stereoscopic vision*. *Perception*, 1982. **11**(4): p. 377-386.
85. Julesz, B., *Binocular depth perception of computer-generated patterns*. *Bell System Technical Journal*, 1960. **39**(5): p. 1131.
86. Kragic, D., et al., *Vision for robotic object manipulation in domestic settings*. *Robotics and Autonomous Systems*, 2005. **52**(1): p. 85-100.

87. Sbalzarini, I. and P. Koumoutsakos, *Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology*. *Journal of Structural Biology*, 2005. **151**(2): p. 182-195.
88. Almanza, R., et al., *Development and mean life of aluminum first-surface mirrors for solar energy applications*. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 2009. **93**(9): p. 1647-1651.
89. Coons, A., E. Leduc, and M. Kaplan, *Localization of antigen in tissue cells*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1951. **93**(2): p. 173.
90. Huang, M. and M. Chalfie, *Gene interactions affecting mechanosensory transduction in *Caenorhabditis elegans**. 1994.
91. Thompson, R., D. Larson, and W. Webb, *Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes*. *Biophysical journal*, 2002. **82**(5): p. 2775-2783.
92. Pertsinidis, A., Y. Zhang, and S. Chu, *Subnanometre single-molecule localization, registration and distance measurements*. *Nature*, 2010. **466**(7306): p. 647-651.
93. Ober, R., S. Ram, and E. Ward, *Localization accuracy in single-molecule microscopy*. *Biophysical journal*, 2004. **86**(2): p. 1185-1200.
94. Frigault, M., et al., *Live-cell microscopy-tips and tools*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 6): p. 753-67.
95. Enderlein, J., E. Toprak, and P. Selvin, *Polarization effect on position accuracy of fluorophore localization*. *Optics Express*, 2006. **14**(18): p. 8111-8120.
96. Heun, P., et al., *Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus*. *Science*, 2001. **294**(5549): p. 2181.
97. Berger, A., et al., *High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast*. *Nature Methods*, 2008. **5**(12): p. 1031-1037.
98. Franklin, R. and R. Gosling, *Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate*. 1953.
99. Watson, J. and F. Crick, *The structure of DNA*. *Inspiring science: Jim Watson and the age of DNA*, 2003: p. 121.
100. Avery, O., C. MacLeod, and M. McCarty, *Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III*. *J Exp Med*, 1944. **79**: p. 137-158.
101. Sullivan, S. and D. Landsman, *Characterization of sequence variability in nucleosome core histone folds*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2003. **52**(3): p. 454-465.
102. Khochbin, S., et al., *Functional significance of histone deacetylase diversity*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2001. **11**(2): p. 162-166.
103. Bloomfield, V., *DNA condensation*. *Current Opinion in Structural Biology*, 1996. **6**(3): p. 334-341.
104. Yoshikawa, K. and Y. Yoshikawa, *Compaction and condensation of DNA*. *Pharmaceutical Perspectives of Nucleic Acid-Based Therapeutics*: p. 137-163.
105. Kornberg, R., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. *Science (New York, NY)*, 1974. **184**(139): p. 868.
106. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. *Nature*, 1997. **389**(6648): p. 251-260.
107. Davey, C., et al., *Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1.9 Å Resolution+*. *Journal of molecular biology*, 2002. **319**(5): p. 1097-1113.
108. Richmond, T. and C. Davey, *The structure of DNA in the nucleosome core*. *Nature*, 2003. **423**(6936): p. 145-150.

109. Kamakaka, R. and S. Biggins, *Histone variants: deviants?* *Genes & development*, 2005. **19**(3): p. 295.
110. Hamiche, A., et al., *Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes.* *Journal of molecular biology*, 1996. **257**(1): p. 30-42.
111. Simpson, R., *Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones.* *Biochemistry*, 1978. **17**(25): p. 5524-5531.
112. Olins, A. and D. Olins, *Spheroid chromatin units (nu bodies).* *Science*, 1974. **183**: p. 330-332.
113. Germond, J., et al., *Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975. **72**(5): p. 1843.
114. Thoma, F., T. Koller, and A. Klug, *Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin.* *The Journal of cell biology*, 1979. **83**.
115. Bednar, J., et al., *Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(24): p. 14173.
116. McBryant, S., et al., *The silent information regulator 3 protein, SIR3p, binds to chromatin fibers and assembles a hypercondensed chromatin architecture in the presence of salt.* *Molecular and cellular biology*, 2008. **28**(11): p. 3563.
117. Dorigo, B., et al., *Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail.* *Journal of molecular biology*, 2003. **327**(1): p. 85-96.
118. Diesinger, P. and D. Heermann, *The influence of the cylindrical shape of the nucleosomes and H1 defects on properties of chromatin.* *Biophysical Journal*, 2008. **94**(11): p. 4165-4172.
119. Thoma, F. and R. Simpson, *Local protein–DNA interactions may determine nucleosome positions on yeast plasmids.* 1985.
120. Schalch, T., et al., *X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre.* *Nature*, 2005. **436**(7047): p. 138-141.
121. Robinson, P., et al. *EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure.* 2006: National Acad Sciences.
122. Tremethick, D., *Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber.* *Cell*, 2007. **128**(4): p. 651-654.
123. Bystricky, K., et al., *Long-range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analyzed by high-resolution imaging techniques.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(47): p. 16495.
124. Dekker, J., *Mapping in vivo chromatin interactions in yeast suggests an extended chromatin fiber with regional variation in compaction.* *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(50): p. 34532.
125. Goffeau, A., et al., *Life with 6000 genes.* *Science*, 1996. **274**(5287): p. 546.
126. Gasser, S., et al. *The function of telomere clustering in yeast: the circe effect.* 2004: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
127. Gotta, M., et al., *The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*.* *The Journal of cell biology*, 1996. **134**(6): p. 1349-1363.
128. Palladino, F., et al., *SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres.* *Cell*, 1993. **75**(3): p. 543-555.

129. Jin, Q., J. Fuchs, and J. Loidl, Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *Journal of cell science*, 2000. **113**: p. 1903.
130. Hediger, F., et al., Live Imaging of Telomeres:: yKu and Sir Proteins Define Redundant Telomere-Anchoring Pathways in Yeast. *Current Biology*, 2002. **12**(24): p. 2076-2089.
131. Taddei, A., et al., Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *The EMBO Journal*, 2004. **23**(6): p. 1301-1312.
132. Bühler, M. and S. Gasser, Silent chromatin at the middle and ends: lessons from yeasts. *The EMBO journal*, 2009. **28**(15): p. 2149-2161.
133. Therizols, P., et al., Chromosome arm length and nuclear constraints determine the dynamic relationship of yeast subtelomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(5): p. 2025.
134. Schober, H., et al., Controlled exchange of chromosomal arms reveals principles driving telomere interactions in yeast. *Genome research*, 2008. **18**(2): p. 261.
135. Duan, Z., et al., A three-dimensional model of the yeast genome. *Nature*, 2010. **465**(7296): p. 363-367.
136. Meister, P., et al., Visualizing yeast chromosomes and nuclear architecture. *Methods in Enzymology*, 2010: p. 535-567.
137. Straight, A., et al., GFP tagging of budding yeast chromosomes reveals that protein-protein interactions can mediate sister chromatid cohesion. *Current Biology*, 1996. **6**(12): p. 1599-1608.
138. Saxton, M. and K. Jacobson, Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. 2003.
139. Levi, V. and E. Gratton, Chromatin dynamics during interphase explored by single-particle tracking. *Chromosome Research*, 2008. **16**(3): p. 439-449.
140. Mazia, D., G. Schatten, and W. Sale, Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *Applications to electron microscopy. The Journal of Cell Biology*, 1975. **66**(1): p. 198.
141. Li, X. and B. Logan, Analysis of bacterial adhesion using a gradient force analysis method and colloid probe atomic force microscopy. *Langmuir*, 2004. **20**(20): p. 8817-8822.
142. Velegol, S., et al., AFM imaging artifacts due to bacterial cell height and AFM tip geometry. *Langmuir*, 2003. **19**(3): p. 851-857.
143. Vadillo-Rodriguez, V., et al., Comparison of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods. *Applied and environmental microbiology*, 2004. **70**(9): p. 5441.
144. Marshall, W., et al., Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. *Current Biology*, 1997. **7**(12): p. 930-939.
145. Thakar, R. and A. Csink, Changing chromatin dynamics and nuclear organization during differentiation in *Drosophila* larval tissue. *Journal of cell science*, 2005. **118**(5): p. 951.
146. Levi, V., et al., Chromatin dynamics in interphase cells revealed by tracking in a two-photon excitation microscope. *Biophysical journal*, 2005. **89**(6): p. 4275-4285.
147. Bronstein, I., et al., Transient anomalous diffusion of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *Physical review letters*, 2009. **103**(1): p. 18102.
148. de Gennes, P., Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles. *The Journal of Chemical Physics*, 1971. **55**: p. 572.

149. Bystricky, K., et al., Regulation of nuclear positioning and dynamics of the silent mating type loci by the yeast Ku70/Ku80 complex. *Molecular and cellular biology*, 2009. **29**(3): p. 835.
150. Doi, M. and S. Edwards, *The theory of polymer dynamics*. 1988: Oxford University Press, USA.
151. Weber, S., A. Spakowitz, and J. Theriot, Bacterial Chromosomal Loci Move Subdiffusively through a Viscoelastic Cytoplasm. *Physical review letters*, 2010. **104**(23): p. 238102.
152. Haw, M., *Colloidal suspensions, Brownian motion, molecular reality: a short history*. *Journal of physics: condensed matter*, 2002. **14**: p. 7769.
153. Pickering, C. and N. Halliwell, Laser speckle photography and particle image velocimetry: photographic film noise. *Applied optics*, 1984. **23**(17): p. 2961-2969.
154. Adrian, R., Scattering particle characteristics and their effect on pulsed laser measurements of fluid flow- Speckle velocimetry vs particle image velocimetry. *Applied optics*, 1984. **23**: p. 1690.
155. Adrian, R., Twenty years of particle image velocimetry. *Experiments in Fluids*, 2005. **39**(2): p. 159-169.
156. Ghosh, R. and W. Webb, Automated detection and tracking of individual and clustered cell surface low density lipoprotein receptor molecules. *Biophysical journal*, 1994. **66**(5): p. 1301-1318.
157. Gelles, J., B. Schnapp, and M. Sheetz, Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. 1988.
158. Mallik, R., et al., Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature*, 2004. **427**(6975): p. 649-652.
159. Work, S. and D. Warshaw, Computer-assisted tracking of actin filament motility. *Analytical biochemistry*, 1992. **202**(2): p. 275-285.
160. Crocker, J. and D. Grier, Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996. **179**(1): p. 298-310.
161. <http://www.deas.harvard.edu/projects/weitzlab/matlab/index.html>.
162. Levy., G. *Imagej particle tracker*.
163. Helmuth, J., et al., A novel supervised trajectory segmentation algorithm identifies distinct types of human adenovirus motion in host cells. *Journal of Structural Biology*, 2007. **159**(3): p. 347-358.
164. Ewers, H., et al., Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(42): p. 15110.
165. Brunner, C., C. Wahnes, and V. Vogel, Cargo pick-up from engineered loading stations by kinesin driven molecular shuttles. *Lab Chip*, 2007.
166. Manderson, A., et al., Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF. *The Journal of Cell Biology*, 2007. **178**(1): p. 57.
167. Sengers, B., et al., Computational modelling of cell spreading and tissue regeneration in porous scaffolds. *Biomaterials*, 2007. **28**(10): p. 1926-1940.
168. Rogers, S., et al., Precise particle tracking against a complicated background: polynomial fitting with Gaussian weight. *Physical Biology*, 2007. **4**: p. 220.
169. Raffel, M., C. Willert, and S. Wereley, *Particle image velocimetry: a practical guide*. 2007: Springer Verlag.
170. Carter, B., G. Shubeita, and S. Gross, Tracking single particles: a user-friendly quantitative evaluation. *Physical Biology*, 2005. **2**: p. 60.

171. Cheezum, M., W. Walker, and W. Guilford, *Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles*. *Biophysical journal*, 2001. **81**(4): p. 2378-2388.