



HAL
open science

Pince optique et microscopie de fluorescence pour l'étude de la synthèse des protéines en molécule unique

Antoine Le Gall

► **To cite this version:**

Antoine Le Gall. Pince optique et microscopie de fluorescence pour l'étude de la synthèse des protéines en molécule unique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112238 . tel-00647915

HAL Id: tel-00647915

<https://pastel.hal.science/tel-00647915>

Submitted on 3 Dec 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.

LABORATOIRE CHARLES FABRY DE L'INSTITUT D'OPTIQUE
UNIVERSITÉ PARIS XI
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY
ECOLE DOCTORALE ONDES ET MATIÈRE

THÈSE

pour l'obtention du grade de Docteur en sciences de l'Université Paris XI

présentée par

Antoine LE GALL

**PINCE OPTIQUE ET MICROSCOPIE DE
FLUORESCENCE POUR L'ÉTUDE DE LA SYNTHÈSE
DES PROTÉINES EN MOLÉCULE UNIQUE**

Soutenue publiquement le 04 Novembre 2011 devant la commission d'examen :

Niko Hildebrandt	Président du jury
Ulrich Bockelmann	Rapporteur
Maïté Coppey-Moisan	Rapporteur
Laurence Salomé	Examinatrice
Satoko Yoshizawa	Examinatrice
Alain Aspect	Co-directeur de thèse
Nathalie Westbrook	Co-directrice de thèse
Karen Perronet	Membre invité

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique. Une thèse à l'interface entre la physique et la biologie fait naturellement intervenir des collaborations pour apporter un autre regard que celui du physicien, mais aussi des avis et conseils sur les multiples aspects du projet. Ces trois années de thèse auront donc été pour moi une expérience formidable où j'ai été amené à faire de nombreuses rencontres avec des gens d'univers différents du mien et qui m'auront permis de m'enrichir à bien des niveaux.

Mes premiers mots de remerciement iront aux membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer ma thèse. Je remercie tout d'abord Maïté Coppey-Moisan et Ulrich Bockelmann d'avoir accepté de rapporter mon travail et aussi du temps et de l'intérêt qu'ils ont consacrés à la lecture de ce manuscrit. Je voudrais également remercier Laurence Salomé et Satoko Yoshizawa pour avoir examiné mon travail et pour leurs questions durant la soutenance. Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance à Niko Hildebrandt pour avoir accepté de présider pour la première fois un jury en France.

Parmi les membres de mon jury je voudrais remercier tout particulièrement mes directeurs de thèse. Merci à Alain Aspect de m'avoir accueilli au sein du groupe d'Optique Atomique et de m'avoir accordé sa confiance en me proposant une bourse pour cette thèse. Malgré la différence de nos sujets de recherche il a su garder un œil attentif sur l'avancement de mes travaux. Un grand merci à Nathalie Westbrook pour m'avoir encadré durant mes trois années de thèse. Nathalie a toujours eu du temps à me consacrer pour me conseiller ou relire (et surtout corriger !) les pages de ce manuscrit. J'ai également eu la chance d'encadrer les séances de travaux pratiques avec elle et j'aurai beaucoup appris de sa rigueur et de son exceptionnel esprit scientifique et pédagogique.

Il ne fait aucun doute que les résultats présentés dans ce manuscrit n'auraient pas été les mêmes sans la présence de Karen Perronet au sein de l'équipe. Karen m'a encadré au quotidien et a su faire preuve de beaucoup de patience pour me donner toutes les explications dont j'avais (toujours) besoin. Elle devrait s'appeler "Super Karen" pour son incroyable organisation lui permettant d'être présente sur tous les aspects des expériences, que ce soit les demandes de financement, entretenir les multiples collaborations et même sur le terrain à customiser la manip ou à préparer les échantillons biologiques. Durant ces trois années passées à ses côtés j'ai pu grandement apprécier sa disponibilité, son humour, sa gentillesse en plus de ses grandes qualités scientifiques. Elle arrive toujours à aller de l'avant et à surmonter les difficultés avec une constante sérénité (même face à des stagiaires récalcitrantes). Il n'y a pas de mots pour lui dire à quel point je lui suis reconnaissant pour le soutien qu'elle m'aura apporté. Je tiens en plus à lui présenter toutes mes excuses pour toutes les tâches administratives que j'ai mis si peu d'entrain à remplir (j'espère que les paquets de bonbons apportés régulièrement auront réussi à me faire pardonner).

Je me souviens encore de la première fois où j'ai mis les pieds au labo. Le thésard qui me

précédait, David Dulin, m'avait alors parlé de spots fluorescents de toutes sortes de couleurs, correspondant à des molécules aux noms barbares, qu'il essayait d'accrocher à la surface de lamelles de microscope. A ce moment là je n'avais rien compris à ce qu'il me racontait, mais avec du recul j'ai réalisé qu'il évoquait ses travaux tant redoutés dont les thésards après lui bénéficieront, à savoir la **chimie de surface**. David m'a montré toutes les astuces essentielles au bon fonctionnement de la manip et je le remercie en plus pour tous les bons moments (toujours ponctués d'humour) passés, souvent tard, avec lui au labo. Je lui souhaite une réussite amplement méritée pendant son postdoc à Delft.

Ma relève est assurée avec Nicolas Fizman qui maintenant entame sa deuxième année de thèse dans l'équipe. J'espère lui avoir transmis toutes les astuces de la manip que David m'avait lui aussi montrées. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec lui et encore plus à me confronter à lui autour d'une partie de Khet (c'est qu'il ne se laisse pas faire, le bougre!). Je suis convaincu qu'avec ses grandes qualités scientifiques Nicolas saura domestiquer ces maudits ribosomes et leur extirper tout un tas d'informations!

Cette thèse a été pour moi l'occasion de rencontrer des personnes externes au laboratoire lors de collaborations :

Je remercie en premier lieu l'équipe de l'ICSN (qui a ensuite migré au CGM) : Dominique Fourmy, Satoko Yoshizawa et Nicolas Soler avec qui on a collaboré sur le ribosome procaryote. C'est avec eux que j'ai été pour la première fois confronté à des problématiques biologiques. En discutant avec eux j'ai beaucoup appris des techniques de biochimie et j'ai réalisé que, si le ribosome est à la base de la fabrication des protéines, il pouvait aussi être sacrément capricieux.

Je tiens à remercier tout particulièrement Koen Visscher, professeur à l'Université d'Arizona, avec qui j'ai passé du temps à la réalisation de la pince optique lors de son séjour dans notre équipe. Koen déborde d'une énergie communicative et n'est jamais à court d'idées. J'ai grandement apprécié travailler avec lui et espère que l'on sera amenés à collaborer à nouveau par la suite.

Je remercie également Rachel Méallet-Renault ainsi que Gilles Clavier du PPSM à Cachan qui nous ont aidés à élucider les mystères du Bodipy-Fl et du ROXS.

Un grand merci à Olivier Namy et Hélène Chommy de l'IGM. J'ai énormément apprécié leur enthousiasme et leur réactivité. En plus de nous servir les échantillons biologiques sur un plateau, Hélène a partagé avec Nicolas et moi les longues journées de manip. Je vais beaucoup regretter cette nouvelle collaboration qui portera à coup sûr ses fruits!

Un mot de remerciement pour Carmela Giglione, Alexandre Pozza, Antigoni Alexandrou, Abdul Barakat et YongYun Hwang avec qui j'ai été amené à travailler (mais dont les travaux sortent du cadre de ce manuscrit).

Cette thèse a été effectuée dans le groupe d'Optique Atomique de l'Institut d'Optique. Il va sans dire que si j'allais au labo tous les matins avec plaisir ce n'était pas seulement parce que je travaillais avec une équipe formidable mais c'est aussi parce qu'il règne dans le groupe une atmosphère très chaleureuse. Je remercie donc chacun de ses membres : Thibault, Bess, Isabelle, Julien, Philippe, Guillaume, Vincent M., Rémi, Vincent J., Patrick, Juliette, Alain, Fred, Killian, Ralf, Thomas V., Simon, Andrea, Thomas P., Baptiste, Thomas B., Martin, Jean-Philippe, Karim, Sébastien, Marie P., Laurent, Ben, Luca, Lâam, Lynn, David C., Valentina, Guthrie, Denis, Chris, Josselin, Raphaël et les deux pique-assiettes de la salle d'à côté Marie B. et JC (il y a bien d'autres qualificatifs pour JC mais je ne me lancerai pas dans cette longue liste!). Je voudrais également remercier les deux électroniciens du groupe, André et Fred,

ainsi que les membres des ateliers d'optique et de mécanique que nous avons sans cesse sollicités.

Un mot de remerciement aussi pour les stagiaires venus apporter leur contribution aux expériences : Marie-Pierre, Fanny et Benjamin, *Tania*, Alvin et Cécile. J'espère que leur séjour dans notre équipe aura su leur donner goût au monde de la recherche.

Parce qu'il y a une vie en dehors du labo, je voudrais remercier en particulier un groupe d'amis toujours fidèles au poste : Nédo, Yôn, Sofia, Rico, Amélie, Lionel, Faweed, Julie, Cali, Isa, Ben, Soso, Rémy, Laurent, Châu, Ana, Yan, Clver et Taisa. Merci à eux pour leur amitié indéfectible malgré le temps ou la distance. Une ligne à part pour remercier Julien pour son amitié et ses suggestions de manip on ne peut moins sérieuses...

Enfin je remercie ma famille pour le soutien qu'elle m'a toujours apporté. Je leur dois énormément pour leur patience, leur présence et leurs encouragements depuis toujours.

Table des matières

Introduction	1
1 Etude de la synthèse des protéines à l'échelle de la molécule unique	5
1.1 Etat de l'art des techniques en molécule unique	5
1.1.1 Micromanipulation	6
1.1.2 Microscopie de fluorescence	10
1.2 Motivations de notre étude et choix des techniques	13
1.2.1 La synthèse des protéines	13
1.2.1.1 Résumé des différents acteurs de la traduction	13
1.2.1.2 La traduction	14
1.2.1.3 Les structures de l'ARN	18
1.2.2 Motivations	19
1.2.3 Choix d'approche de l'étude	21
1.2.3.1 Choix des techniques	21
1.2.3.2 Exemples d'études de la traduction en molécule unique	22
2 Développement d'un montage de pince optique	27
2.1 Principe	27
2.1.1 Régime de Mie	28
2.1.2 Régime de Rayleigh	31
2.2 Dispositif expérimental	32
2.2.1 Dispositif du piège	32
2.2.1.1 Le laser	32
2.2.1.2 L'objectif	33
2.2.1.3 Le montage optique	35
2.2.1.4 Le déflecteur acousto-optique	36
2.2.1.5 Calibration du déplacement du piège induit par le déflecteur acousto optique à l'aide d'une bille piégée	36
2.2.2 Dispositif de l'éclairage et de la détection	38
2.2.2.1 L'éclairage	38
2.2.2.2 La détection	39
2.3 Calibrations séparées de la raideur du piège, de la sensibilité du détecteur et de la position axiale de la bille piégée	43
2.3.1 Mouvement d'une bille piégée	44
2.3.2 Détermination de la raideur du piège	45
2.3.2.1 Théorème d'équipartition	45
2.3.2.2 Densité spectrale de puissance	46

2.3.3	Détermination de la sensibilité du détecteur	47
2.3.3.1	Technique de la bille collée	47
2.3.3.2	Densité spectrale de puissance	48
2.3.4	Détermination de la position axiale de la bille piégée	48
2.4	Calibration simultanée de la raideur du piège et de la sensibilité du détecteur	50
2.5	Etirement d'oligonucleotides	52
2.5.1	Structure et propriétés mécaniques de l'ADN	53
2.5.2	Modèles théoriques des acides ribonuléiques	54
2.5.2.1	Modèle de la chaîne à articulations libres	55
2.5.2.2	Modèle du ver	55
2.5.3	Préparation de l'expérience	56
2.5.4	Etirement d'un brin d'ADN	58
2.6	Conclusions et perspectives	61
3	Dispositif expérimental pour la microscopie de fluorescence	63
3.1	Principe du TIRF	63
3.2	Dispositif expérimental	65
3.2.1	Dispositif de TIRF	65
3.2.2	Détection de la fluorescence	67
3.2.3	Protocole de chimie de surface et optimisations	69
3.3	Compléments apportés au montage	72
3.3.1	Cellules microfluidiques	72
3.3.2	Contrôle en température de la cellule microfluidique	74
3.3.3	Autofocus	75
3.4	Conclusion	77
4	Amélioration des propriétés photophysiques de fluorophores organiques	79
4.1	Cas général : mécanisme de la fluorescence	79
4.1.1	Principe de la fluorescence et problèmes intrinsèques aux fluorophores	79
4.1.2	Améliorations des propriétés photophysiques des fluorophores	81
4.1.2.1	Description du mangeur d'oxygène	81
4.1.2.2	Ajout d'anti-oxydants	83
4.1.2.3	Solution générale : le ROXS	83
4.2	Photophysique du Bodipy-FL	84
4.2.1	Le Bodipy-FL	84
4.2.2	Accroche à la surface et préparation du tampon ROXS	87
4.2.3	Analyse des images	88
4.2.4	Photostabilité du Bodipy-Fl	91
4.2.5	Courbes de saturation du Bodipy-Fl	94
4.2.5.1	Préliminaires	94
4.2.5.2	Courbes de saturation	94
4.2.5.3	Origine de la dispersion des données sur les courbes de saturation	96
4.3	Extension à d'autres fluorophores	98
4.4	Conclusion	100
5	Etude de la cinétique de traduction du ribosome	103
5.1	Motivations	103

5.2	État de l'art des études en molécule unique des mécanismes de la traduction . . .	106
5.2.1	Exemple d'étude utilisant des Zero Mode Waveguides	106
5.2.2	Exemple d'étude dans des conditions physiologiques	108
5.3	Etude de la cinétique de traduction du ribosome procaryote	109
5.3.1	Stratégie de l'étude	110
5.3.1.1	Marquage du ribosome	110
5.3.1.2	Complexation du ribosome sur l'ARNm et accroche à la surface	112
5.3.2	Expériences de traduction	113
5.3.2.1	Cinétique de traduction en molécule unique	113
5.3.2.2	Mise en évidence de l'activité des ribosomes-QDs	117
5.3.3	Conclusions et perspectives	119
5.4	Etude de la cinétique de traduction du ribosome eucaryote	120
5.4.1	Stratégie de l'étude	120
5.4.1.1	Complexation du ribosome sur l'ARNm : IRES	120
5.4.1.2	Accroche du complexe à la surface et marquage de l'ARNm . .	122
5.4.2	Expériences de traduction	124
5.4.3	Amélioration des propriétés photophysiques des ATTO647N dans le RRL	128
5.4.4	Conclusions et perspectives	129
6	Conclusion générale et perspectives	131
A	Cellules microfluidiques et chimie de surface	135
A.1	Conceptions des cellules microfluidiques.	135
A.2	Protocole de fonctionnalisation de la surface.	136
B	Tampons ROXS	139
C	Optique	141
C.1	Mesure du waist d'un faisceau laser	141
C.2	Mesure de la distance focale d'un objectif de microscope	143
D	Préparation des billes pour la pince optique	145
D.1	Fonctionnalisation des billes	145
D.2	Mélange avec l'oligonucléotide	146
D.3	Préparation de la surface et fixation des billes par l'ADN	147
E	Articles scientifiques	149
	Simultaneous calibration of optical tweezers spring constant and position detector response	151
	Improved Photon Yield from a Green Dye with a Reducing and Oxidizing System . .	157
	Bibliographie	171

Introduction

De part leurs diverses fonctions dans la cellule, que ce soit dans la mobilité cellulaire, l'expression du code génétique ou encore la catalyse des réactions, les protéines sont à la base de la vie cellulaire. Le ribosome est l'élément clé permettant l'assemblage des acides aminés entre eux, constituant ainsi les protéines, suivant rigoureusement une séquence dictée par l'ARN messenger (ARNm). Cette étape de lecture de l'ARNm faisant correspondre une séquence de bases (ou nucléotides) du code génétique en une séquence d'acides aminés est appelée la traduction.

Celle-ci suit des mécanismes hautement régulés permettant une lecture du code génétique avec une grande fidélité (1 erreur sur 10 000 acides aminés lus). On peut toutefois rencontrer dans la nature de nombreux exemples de lecture du code génétique faisant apparaître des erreurs d'incorporation des acides aminés parfaitement localisées et avec une probabilité élevée. Souvent ces erreurs de traduction font intervenir des structures sur l'ARNm dont les rôles sur la traduction sont maintenant mieux connus (incorporation d'acides aminés rares, décalage de la phase de lecture ...).

Bien que les techniques traditionnelles employées par les biologistes et biochimistes pour l'étude du ribosome aient déjà permis de grandes avancées sur la compréhension des mécanismes de la traduction, la synthèse des protéines fait intervenir des processus asynchrones et rares nécessitant une étude de ces processus individuellement. En supprimant les effets de moyenne spatiale et temporelle inhérents aux mesures d'ensemble, les techniques à l'échelle de la molécule unique (imagerie de fluorescence, micromanipulation) sont devenues ces dernières années un nouveau moyen d'aborder l'étude de processus biologiques et notamment de la traduction.

Cette thèse a pour objectif d'apporter de nouvelles informations sur les mécanismes de la traduction, et plus particulièrement sur les interactions du ribosome avec l'ARNm. Une approche de la synthèse des protéines en molécule unique permet de caractériser les éléments clés de la traduction individuellement d'un point de vue dynamique et également d'un point de vue mécanique (mesures de forces). Nous employons à cet effet deux techniques en molécule unique pour aborder ces deux aspects de la synthèse des protéines. Nous utilisons la microscopie de fluorescence en onde évanescente afin de suivre individuellement la cinétique d'incorporation des acides aminés par le ribosome, tandis que la manipulation de l'ARNm par pince optique nous permet de caractériser ses propriétés et ainsi de mieux comprendre son rôle dans la traduction.

Les travaux décrits dans ce manuscrit poursuivent ceux réalisés durant les deux premières années de thèse de David Dulin, sa troisième année étant commune à ma première année de thèse. A mon arrivée, l'équipe venait d'observer pour la première fois en microscopie de fluorescence l'activité de ribosomes procaryotes accrochés non spécifiquement à la surface. L'équipe de biophotonique de l'Institut d'Optique disposait alors d'un montage en TIRF opérationnel, couplé à un système microfluidique permettant l'utilisation de faibles volumes pour les expériences de traduction. La microscopie de TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) néces-

sitant l'accroche spécifique du système biologique sur la surface de la lamelle de microscope, mon prédécesseur avait élaboré une chimie de surface permettant non seulement d'accrocher spécifiquement le système biologique mais également de limiter toute interaction non spécifique avec celui-ci. En collaboration avec l'équipe de Dominique Fourmy et Satoko Yoshizawa, alors rattachés au LIMMS-CNRS de l'université de Tokyo, un premier protocole avait été mis en place pour l'initiation des ribosomes sur l'ARNm et l'accroche spécifique de ce complexe à la surface.

Durant ma première année de thèse nous avons entamé une étude de la photophysique du Bodipy-Fl, fluorophore organique ayant une photostabilité moins bonne que d'autres marqueurs couramment utilisés en molécule unique, mais commercialisé sous la forme d'ARNt-lysine-Bodipy, pour des expériences de traduction *in vitro* comme alternative au marquage radioactif. Nous avons cherché à utiliser ce système afin de suivre la dynamique d'incorporation de cet acide aminé par le ribosome en molécule unique par microscopie de fluorescence en réflexion totale. Pour ce faire, nous avons mis au point un système oxydant-réducteur original qui, couplé à un système enzymatique consommant l'oxygène en solution, permet d'améliorer d'un facteur 20 le nombre de photons émis par le Bodipy-Fl.

Nous avons également poursuivi les expériences sur le ribosome procaryote en utilisant cette fois des ribosomes mutés afin de les marquer spécifiquement avec un nanocristal semi-conducteur (QD) unique. Nous avons dans un premier temps cherché à prouver l'activité de ces ribosomes par des expériences où les acides aminés marqués d'un fluorophore, le Bodipy-Fl, sont incorporés dans la protéine traduite afin de colocaliser le signal de la protéine avec celui du ribosome. Prouver l'activité de nos ribosomes avec un tel marqueur n'étant pas évident, nous avons ensuite orienté notre étude sur la cinétique de la traduction. Le marquage du ribosome nous permettant de détecter la présence du ribosome sur l'ARNm, nous détectons la fin de la traduction lorsque le ribosome atteint le codon STOP et quitte le champ d'excitation du laser (le signal du QD disparaissant alors).

Durant ma seconde année de thèse, nous avons développé sur le même microscope un montage de pince optique pour l'étude des structures de l'ARN dans un premier temps et en vue, à terme, d'une combinaison avec la microscopie de fluorescence pour l'étude de la traduction. En collaboration avec Koen Visscher, professeur à l'Université d'Arizona, durant son séjour de 5 mois dans notre laboratoire, nous avons développé une méthode de calibration originale de la pince optique [1]. En parallèle du montage du piège optique, nous avons finalisé l'étude des propriétés du Bodipy-Fl et de l'amélioration de ses caractéristiques photophysiques par une publication dans [2]. Les expériences sur la traduction, cette fois-ci avec des ribosomes sauvages, ont également été poursuivies en cherchant principalement à observer l'apparition d'un signal positif pour prouver l'activité des ribosomes. Pour cela nous avons cherché à visualiser la fluorescence d'une protéine GFP à maturation rapide traduite par le ribosome.

Ma troisième année a vu l'arrivée de Nicolas Fiszman en première année de thèse dans notre équipe, ainsi qu'une nouvelle collaboration avec l'équipe de biologistes de l'IGM à Orsay dirigée par Olivier Namy. Cette collaboration a pour objectif l'étude de l'activité de ribosomes eucaryotes en molécule unique et à terme l'étude des mécanismes de la terminaison faisant intervenir les facteurs eRF1 et eRF3 pour observer leurs interactions avec les ARN de transfert présents dans le ribosome. Dans cette première étude de l'activité du ribosome eucaryote, celui-ci est dit "sauvage", c'est à dire qu'il n'a pas subi de modification, et un oligonucléotide

marqué d'un fluorophore est hybridé à l'ARNm. L'activité hélicase permettant au ribosome de séparer deux brins complémentaires, l'oligonucléotide et donc le fluorophore disparaissent en même temps que le ribosome parcourt l'ARNm. Des études ont également été entamées pour améliorer les propriétés du fluorophore dans les extraits cellulaires utilisés pour observer la traduction. Cette troisième année a également été l'occasion d'optimiser les protocoles de chimie de surface afin de minimiser les durées de préparations des expériences ainsi que les problèmes inhérents au précédent protocole (fond de fluorescence, formation de bulles dans les cellules microfluidiques ...).

Disposant d'un montage de pince optique opérationnel, nous avons également mesuré les propriétés mécaniques d'un brin d'ADN attaché entre la bille piégée et la surface. La cohérence de nos mesures avec la littérature nous permettra de poursuivre notre étude sur la mesure des forces nécessaires pour ouvrir une tige-boucle de l'ARNm, ceci nécessitant une précision de l'ordre du nanomètre sur la mesure du déplacement de la bille dans le piège.

La suite de ce manuscrit s'articule autour de cinq chapitres :

Le premier donne un bref aperçu des techniques en molécule unique que l'on peut rencontrer dans le domaine de la biophysique. Nous introduisons également les mécanismes de la synthèse des protéines ainsi que le rôle des structures de l'ARNm. Nous justifions ensuite le choix de la pince optique et de la microscopie en onde évanescente pour étudier la traduction et donnons deux exemples d'application utilisant ces techniques.

Le second décrit le montage de pince optique, la nouvelle méthode de calibration développée ainsi que les premières mesures des propriétés mécaniques de l'ADN fixé entre la bille piégée et la surface.

Le troisième chapitre est consacré à la description du montage de microscopie de fluorescence en TIRF, la chimie de surface pour les expériences en molécule unique ainsi qu'aux diverses améliorations que nous avons apportées au montage (détection multi-couleurs, système de mise au point automatique, nouvelle cellule microfluidique).

Le quatrième chapitre est un descriptif de l'étude d'un fluorophore, le Bodipy-F1. Nous expliquons comment nous avons réussi à grandement améliorer ses propriétés photophysiques et montrons l'applicabilité de notre étude à d'autres fluorophores.

Enfin le dernier chapitre décrit les expériences en molécule unique de la traduction. La première partie résume les différentes expériences réalisées sur le ribosome procaryote muté pour y fixer un QD tandis que la seconde partie décrit les résultats obtenus sur la traduction du ribosome eucaryote.



Etude de la synthèse des protéines à l'échelle de la molécule unique

Dans tout organisme vivant, la traduction est le processus de fabrication des protéines par le ribosome à partir du code génétique contenu dans l'ARN messager (ARNm). Les mécanismes impliqués sont complexes et ont fait l'objet de nombreuses études par mesures d'ensemble, notamment en cryo-microscopie électronique et diffraction par rayons X sur des cristaux de ribosomes pour analyser des instants "figés" de la traduction. Ces techniques "traditionnelles" se montrent toutefois limitées pour l'étude de la dynamique de ces événements, qui joue pourtant un rôle clé dans la traduction. C'est notamment le cas des mécanismes permettant au ribosome d'ouvrir certaines structures de l'ARNm. Dans la nature, on trouve de nombreux exemples de ces structures provoquant un changement radical de la protéine fabriquée. Bien que la dynamique du ribosome en présence de ces structures joue un rôle important, elle n'a pas encore pu être parfaitement caractérisée, dû notamment à la difficulté d'étudier des événements asynchrones par des techniques de mesures d'ensemble. Une approche à l'échelle de la molécule unique pour étudier individuellement la traduction s'avère donc une approche parfaitement adaptée.

Ce chapitre introductif a pour objectif de placer les travaux que nous effectuons sur la synthèse des protéines dans un contexte où les techniques de détection et de manipulation à l'échelle de la molécule unique sont de plus en plus nombreuses et performantes. Nous décrivons dans un premier temps quelques techniques usuelles pour l'étude de processus biologiques en molécule unique en essayant de donner quelques exemples d'applications. Nous exposons ensuite les mécanismes de la traduction, que ce soit pour le ribosome procaryote¹ ou eucaryote². Ces prérequis nous permettront d'aborder le rôle de certaines structures de l'ARNm dans la synthèse des protéines. Nous exposerons ensuite plus en détail la problématique de notre étude ainsi que le choix des techniques.

1.1 Etat de l'art des techniques en molécule unique

Parmi la variété des techniques existantes en molécule unique on peut différencier deux catégories : la manipulation et la mesure de forces d'une part, et l'imagerie par fluorescence d'autre part. Nous allons ici donner quelques exemples ayant fait leurs preuves pour l'étude de processus biologiques. Nous essaierons de mettre en avant les avantages et inconvénients de chaque technique pour l'étude de moteurs moléculaires ou des acides nucléiques. Comme nous le verrons par la suite dans ce chapitre, nous nous intéressons à des techniques permettant non seulement d'appliquer et mesurer des forces, détecter des déplacements nanométriques sur de

1. issu d'organismes ne possédant pas de noyau à proprement parler
2. issu d'organismes possédant un noyau

courtes échelles de temps (inférieures à la seconde), mais également de constituer facilement des statistiques sur un ensemble de systèmes biologiques. A l'heure actuelle où aucune technique ne rassemble tous ces critères, nous verrons que deux approches complémentaires pour l'étude de la synthèse des protéines seront nécessaires.

1.1.1 Micromanipulation

Nous décrivons dans ce paragraphe les trois grandes familles de techniques de manipulation en molécule unique : l'AFM, les pinces magnétiques et les pinces optiques. Une description plus détaillée de ces techniques peut être trouvée dans [3].

Microscopie à Force Atomique Bien que le microscope à force atomique (AFM) soit initialement une technique d'imagerie, permettant notamment d'établir la topologie d'un échantillon avec une résolution subnanométrique, il permet également de manipuler un système biologique et mesurer des forces d'interaction à l'échelle de la molécule unique (dans des régimes de 10 à 10^4 pN). L'AFM est constitué d'une pointe, utilisée pour sonder l'échantillon, sur laquelle est réfléchi un faisceau laser (voir figure 1.1). En mode "imagerie" la pointe balaie la surface de l'échantillon à observer, tandis qu'en mode "mesure de force" celle-ci est déplacée verticalement (perpendiculairement au plan de l'échantillon). Dans les deux cas, lorsque la pointe interagit avec l'échantillon, elle subit une tension déviant le faisceau laser réfléchi. Les déflexions du faisceau mesurées sur un détecteur de position renseignent alors indirectement sur les dimensions du spécimen étudié ou bien sur les forces d'interactions entre celui-ci et la pointe.

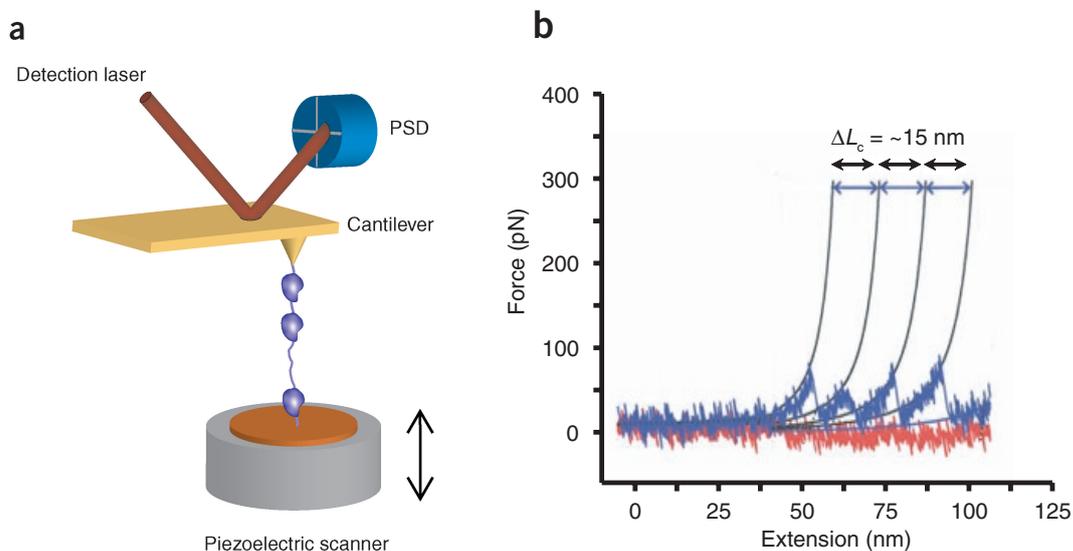


FIGURE 1.1 – (a) : schéma de principe d'un microscope à force atomique. Un détecteur de position (PSD) mesure les déviations du faisceau laser réfléchi sur la pointe de l'AFM attachée à une protéine. L'autre extrémité de la protéine étant fixée à la surface, il est possible de faire varier l'extension de la protéine en déplaçant verticalement l'échantillon à l'aide d'une platine piézoélectrique. (b) : mesure de force en fonction de l'extension d'une protéine entre la surface et la pointe de l'AFM. Un ajustement des données expérimentales par un modèle théorique permet de remonter à des grandeurs caractéristiques de la protéine étudiée (ici ΔL_c décrit les dimensions de sous-domaines de la protéine étudiée). Figures extraites de [3].

1.1 Etat de l'art des techniques en molécule unique

En mode "imagerie", les développements récents ont permis l'observation de moteurs moléculaires en temps réel [4]. Cette configuration s'avère propice à l'observation de moteurs moléculaires progressant sur un substrat pouvant être collé sur une lamelle de microscope tels que la kinésine ou la myosine sur des microtubules. Elle est cependant moins favorable pour le cas de moteurs moléculaires avançant sur des acides nucléiques où il est souvent nécessaire que ces derniers se complexent sur le substrat (l'acide nucléique) et interagissent avec lui.

En mode "mesure de force", l'AFM permet de mesurer deux grandeurs : la force et l'extension. Cette dernière décrit la distance entre les deux points d'attache généralement fixés aux extrémités de la molécule étudiée, entre la surface et la pointe de l'AFM (cette dernière nécessite alors une fonctionnalisation adaptée pour que l'attache soit spécifique à la molécule d'intérêt). En utilisant un module piézoélectrique, il est possible de faire varier la distance entre les deux extrémités de la molécule (en déplaçant soit la pointe, soit la surface). Connaissant la raideur du levier portant la pointe utilisée, il est alors possible de connaître la force exercée sur la molécule à partir de la déviation du faisceau laser sur la pointe de l'AFM. Les gammes de forces applicables avec l'AFM font que cette technique est particulièrement adaptée à l'étude des protéines [5]. La figure 1.1b donne un exemple de mesures de forces en fonction de l'extension d'une protéine entre la pointe d'un AFM et la surface.

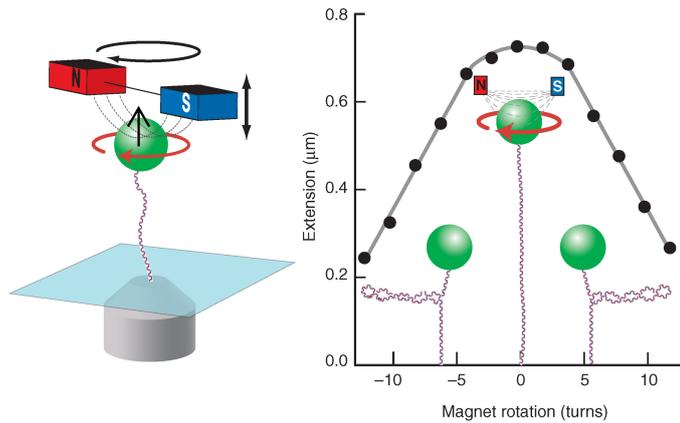


FIGURE 1.2 – A gauche : schéma de principe d'une pince magnétique. Le champ magnétique créé par la paire d'aimants permet de manipuler la bille magnétique fixée à la surface par l'échantillon biologique étudié (ici représenté par un ADN). Cette bille subit une force dans la direction du champ magnétique, tandis que la rotation de la paire d'aimant permet d'exercer une torsion sur l'ADN lorsque le moment magnétique de la bille se réaligne dans la direction du champ. A droite : exemple d'application des pinces magnétiques sur l'étude de l'enroulement d'un double brin d'ADN. Selon le nombre de tours appliqués à la bille, l'ADN subit une torsion le forçant à s'enrouler et diminuant par la même occasion la distance entre la bille et la surface. Figures extraites de [3].

Pinces magnétiques Les pinces magnétiques permettent de piéger une bille magnétique dans un champ magnétique créé par un jeu d'aimants placés au-dessus de l'échantillon (voir figure 1.2). La particule est soumise d'une part à une force dans la direction du gradient du champ et d'autre part à un couple orientant la particule dans la direction du champ magnétique. Notons qu'à la différence de l'AFM ou de la pince optique, le gradient du champ étant homogène à

l'échelle de la bille, la force appliquée sur celle-ci est constante. L'amplitude de la force exercée sur la particule peut être modulée en variant la position des aimants par rapport à la particule. Les pinces magnétiques permettent d'appliquer des forces typiquement de quelques dizaines de femtoNewton à plusieurs dizaines de picoNewton et, pour les configurations les plus avancées (pinces électromagnétiques), de contrôler l'objet piégé selon trois directions.

La détection se fait en éclairant la particule et en analysant la figure d'interférence obtenue sur une caméra. Elle permet d'atteindre une résolution de quelques nanomètres sur la position de la particule. La force est quant à elle mesurée à partir des fluctuations browniennes de position de la particule. Le point fort de cette méthode de détection est de pouvoir analyser plusieurs particules à la fois et ainsi d'étudier plusieurs systèmes biologiques en parallèle. Comparée à l'AFM et à la pince optique, elle souffre cependant d'une moins bonne résolution spatiale, limitée à 5 nm, à comparer par exemple aux déplacements effectués par le ribosome qui sont plutôt de l'ordre du nanomètre. L'une des particularités des pinces magnétiques est la possibilité de faire tourner l'objet piégé, par exemple une bille micrométrique. Ceci a notamment permis d'exercer des torsions sur l'ADN, accroché entre la bille et la surface, pour étudier son enroulement. Les pinces magnétiques ont également montré leur potentiel pour l'étude de moteurs moléculaires tels que les enzymes polymérase³ [6] ou les topoisomérases⁴ [7,8] dont les mécanismes impliquent des torsions sur les acides nucléiques. Comme le montre l'exemple de la figure 1.2, les pinces magnétiques ont également été utilisées pour l'étude des acides nucléiques [9, 10].

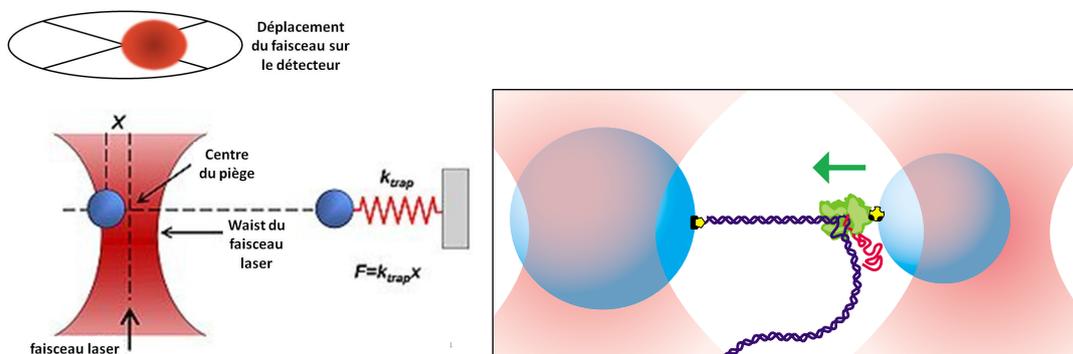


FIGURE 1.3 – A gauche : schéma de principe d'une pince optique. La bille piégée près du waist du faisceau laser subit une force de rappel lorsque sa position s'écarte du centre du piège. En positionnant un détecteur de position en aval du piège, on peut mesurer cette force ainsi que le déplacement de la bille par rapport à sa position d'équilibre. A droite : schéma d'une étude d'une polymérase par pinces optiques. La polymérase, attachée à une bille piégée, transcrit le brin d'ADN en ARN. L'extrémité du brin d'ADN étant elle aussi fixée, la polymérase doit tirer la bille hors du piège pour avancer. Chaque pas de la polymérase peut alors être détecté via les déviations du faisceau laser par la bille piégée lorsque celle-ci est déportée de sa position d'équilibre. Figure de droite extraite de [11].

Pinces optiques Un piège optique, ou pince optique, est créé en focalisant un faisceau laser à la limite de diffraction à l'aide d'un objectif à grande ouverture numérique. Le champ électrique

3. Enzymes responsables de la réplication

4. Enzymes contrôlant la structure de l'ADN

1.1 Etat de l'art des techniques en molécule unique

perçu par une particule diélectrique d'indice supérieur au milieu environnant permet de piéger celle-ci au voisinage du point focal. La particule piégée se comportant comme dans un potentiel harmonique, la force exercée sur celle-ci peut s'exprimer comme le produit de la constante de raideur du piège par le déplacement de la particule par rapport au centre du piège (voir figure 1.3).

Plusieurs configurations existent pour la détection. L'une d'entre elles consiste à placer un détecteur de position en aval du piège pour mesurer les déviations du faisceau laser par la bille lorsque celle-ci s'écarte du centre du piège. En mesurant ces déviations on mesure indirectement la position de la bille par rapport au centre du piège, ainsi que la force qui s'exerce sur celle-ci (connaissant la raideur du piège). Un tel dispositif permet d'accéder à une résolution nanométrique, voire subnanométrique, sur la position de la bille et d'appliquer des forces de 0.1 à 100 pN. De nombreuses applications des pinces optiques peuvent être trouvées dans la littérature comme l'étude des acides nucléiques [12–20] ou de moteurs moléculaires [21–23] comme notamment le ribosome [24–28].

Dans l'exemple de la figure 1.3, une polymérase est fixée à une bille piégée tandis qu'une extrémité de l'ADN qu'elle transcrit est fixée à une seconde bille dans un piège beaucoup plus raide. Alors que la polymérase transcrit le brin d'ADN en ARN, elle tire la bille sur laquelle elle est fixée hors du piège. Les déviations du faisceau renseignent alors directement sur les déplacements effectués par l'enzyme avec une résolution proche de la paire de base, soit 0.34 nm [11].

Comparaison de ces techniques Le tableau de la figure 1.4, extrait de l'article de revue [11], résume les caractéristiques des techniques de manipulation que nous venons de décrire. La

	Optical tweezers	Magnetic (electromagnetic) tweezers	AFM
Spatial resolution (nm)	0.1–2	5–10 (2–10)	0.5–1
Temporal resolution (s)	10^{-4}	10^{-1} – 10^{-2} (10^{-4})	10^{-3}
Stiffness (pN nm ⁻¹)	0.005–1	10^{-3} – 10^{-6} (10^{-4})	10 – 10^5
Force range (pN)	0.1–100	10^{-3} – 10^2 (0.01– 10^4)	10 – 10^4
Displacement range (nm)	0.1– 10^5	5 – 10^4 (5 – 10^5)	0.5– 10^4
Probe size (μm)	0.25–5	0.5–5	100–250
Typical applications	3D manipulation Tethered assay Interaction assay	Tethered assay DNA topology (3D manipulation)	High-force pulling and interaction assays
Features	Low-noise and low-drift dumbbell geometry	Force clamp Bead rotation Specific interactions	High-resolution imaging
Limitations	Photodamage Sample heating Nonspecific	No manipulation (Force hysteresis)	Large high-stiffness probe Large minimal force Nonspecific

FIGURE 1.4 – Résumé des caractéristiques des techniques de manipulation. Figure extraite de [11].

pince magnétique a un intérêt particulier pour les études nécessitant d'appliquer des torsions

ou d'étudier plusieurs systèmes biologiques en parallèle. Elle ne dispose cependant pas de résolutions spatiale et temporelle suffisantes, à cause de la méthode de détection de la bille, pour observer les plus petits pas ou les déplacements rapides de certains moteurs moléculaires tels que le ribosome. L'AFM permet quant à lui d'observer des déplacements plus petits mais les gammes de forces accessibles sont d'un ordre de grandeur plus élevées que celles exercées par les moteurs moléculaires. Cette technique est plus adaptée à l'étude de structures moléculaires faisant intervenir des liaisons fortes telles que celles impliquées dans le repliement des protéines. Enfin les pinces optiques (de même que l'AFM) souffrent du fait qu'un seul système biologique peut être étudié à la fois. Une attention particulière doit également être accordée à l'influence du rayonnement laser au niveau de l'échantillon, pouvant provoquer une élévation de température ($10^{\circ}\text{C}/\text{Watt}$ dans le plan de l'échantillon [29,30]) voire causer des dommages au spécimen biologique [31,32]. La pince optique permet néanmoins de mesurer des déplacements subnanométriques avec une résolution temporelle excellente et les gammes de forces applicables font que cette technique est particulièrement adaptée à l'étude des moteurs moléculaires et des acides nucléiques.

1.1.2 Microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence tire profit des propriétés photophysiques de fluorophores utilisés pour marquer des éléments spécifiques d'un échantillon. Plusieurs types de montages existent selon l'application (imagerie cellulaire, études de processus biologiques en molécule unique, ...) ou bien selon que la résolution spatiale, temporelle ou la statistique est privilégiée. Nous donnons ici quelques exemples.

Microscopie confocale La microscopie confocale consiste à focaliser le faisceau d'excitation dans le plan de l'échantillon et à filtrer la fluorescence issue d'autres plans que le plan focal de l'objectif. De cette façon le rapport signal sur bruit est grandement amélioré comparé à la microscopie de fluorescence traditionnelle, ou épifluorescence, et des molécules uniques peuvent être observées avec une résolution temporelle qui dépend du mode d'utilisation du montage. En mode imagerie en champ large, l'échantillon doit balayer le faisceau d'excitation afin de collecter la fluorescence de chaque point du plan d'observation. Dans ce cas, il est possible d'acquérir des coupes 2D de l'échantillon avec une résolution latérale et axiale de l'ordre de quelques centaines de nanomètres, mais avec une résolution temporelle limitée par la vitesse de balayage. Lorsque l'observation porte sur une seule molécule à la fois, la microscopie confocale permet d'atteindre une excellente résolution temporelle grâce aux photodiodes à avalanche typiquement utilisées sur ce genre de montage. Il est ainsi possible d'étudier la cinétique de réactions à partir des fluctuations d'intensité détectées (comme par exemple en spectroscopie de corrélation de fluorescence) voire de suivre les changements conformationnels de biomolécules d'intérêt, notamment de moteurs moléculaires [33]. La configuration d'un microscope confocal est également compatible avec des techniques de microscopie non linéaire ou multi-photons, bien que leurs applications soient plutôt orientées vers l'imagerie cellulaire.

Microscopie de super-résolution La diffraction impose une limite à la résolution spatiale que la microscopie de fluorescence classique ne peut franchir. De nombreuses techniques, dites de super-résolution, ont vu le jour afin de contourner cette limite. Nous donnons ici trois exemples.

En microscopie STED (STimulated Emission Depletion) la limite de diffraction est franchie en émettant deux impulsions d'excitation lasers consécutives. La première impulsion est accor-

1.1 Etat de l'art des techniques en molécule unique

dée à la longueur d'onde d'absorption du fluorophore et est focalisé à la limite de diffraction dans le plan de l'échantillon, tandis que la seconde impulsion possède une longueur d'onde décalée vers le rouge de sorte qu'elle ramène les fluorophores excités par la première impulsion dans l'état fondamental. En utilisant un mode spatial en forme de "doughnut" pour la seconde impulsion, seuls les fluorophores en périphérie du premier spot laser sont ramenés à l'état fondamental (voir figure 1.5). Le volume d'excitation est ainsi réduit jusqu'à atteindre une taille de quelques dizaines de nanomètres de diamètre. Cette technique est particulièrement utilisée pour l'étude de processus biologiques dans la cellule [34, 35].

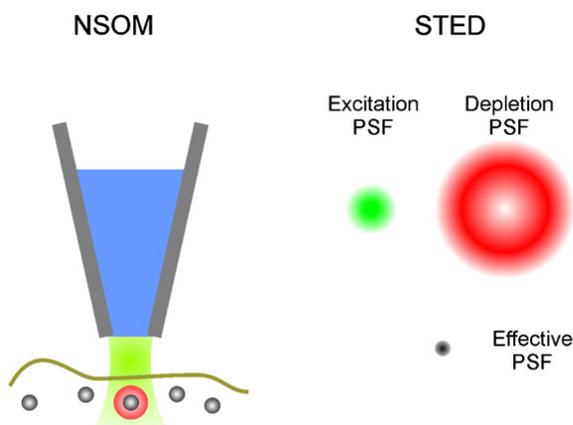


FIGURE 1.5 – Schémas de principe de la microscopie NSOM et STED. A gauche la microscopie en champ proche NSOM utilise une pointe pour sonder l'échantillon et exciter une zone plus petite que celle imposée par la diffraction. A droite sont représentées les fonctions d'étalement du point (PSF) pour le faisceau d'excitation et le faisceau de déplétion et celle de la zone d'excitation effective de l'échantillon en microscopie STED. Figures extraites de [36].

Le NSOM (Near-field Scanning Optical Microscopy) contourne la limite de résolution en utilisant une source d'excitation ou un détecteur de dimension nanométrique (voir figure 1.5). La diffraction étant un effet de champ lointain, il est possible d'exciter une zone plus localisée de l'échantillon en rapprochant la source d'excitation et ainsi d'exciter une zone plus petite que celle imposée par la diffraction. En utilisant une fibre optique servant à la fois de source d'excitation et de collecteur de photons, il est possible d'obtenir une image de l'échantillon avec une résolution de l'ordre de la dizaine de nanomètres [37]. La limitation principale du NSOM vient du fait que c'est une technique en champ proche, elle impose donc une distance minimale entre l'échantillon et la sonde, d'où son usage restreint à l'étude de surfaces d'échantillons.

La technique FIONA (Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy) permet, non pas de résoudre deux fluorophores espacés d'une distance inférieure à la tache de diffraction, mais de localiser un fluorophore unique avec une excellente précision. Pour ce faire, un grand nombre de photons du fluorophore doivent être collectés afin d'effectuer un ajustement gaussien sur sa réponse percussionnelle donnée par le détecteur. Plus le nombre de photons collectés est élevé et meilleure est la précision. Cette technique a notamment montré son applicabilité pour l'étude de moteurs moléculaires avec une résolution temporelle de quelques centaines de millisecondes seulement [38, 39].

Microscopie de TIRF La microscopie de TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) utilise l'onde évanescente, créée par la réflexion d'un faisceau laser à l'interface lamelle/échantillon, pour exciter les fluorophores de l'échantillon (voir figure 1.6). L'intensité de cette onde décroît exponentiellement depuis la surface de la lamelle de verre et pénètre l'échantillon jusqu'à quelques centaines de nanomètres. Ainsi, en microscopie de TIRF, seuls les fluorophores proches de la surface sont excités. Le faible volume d'excitation permet ainsi d'observer des fluorophores uniques avec un bon rapport signal sur bruit, tandis que la largeur de la zone d'observation permet d'en étudier un grand nombre en parallèle sans avoir à balayer l'échantillon. La microscopie de TIRF est très populaire pour les études de processus biologiques en molécule unique [36, 40–42]. Elle est en effet simple à mettre en place et est compatible avec d'autres techniques telles que FIONA, le FRET (voir le paragraphe suivant), l'AFM [43], les pinces magnétiques [44] ou optiques [45].

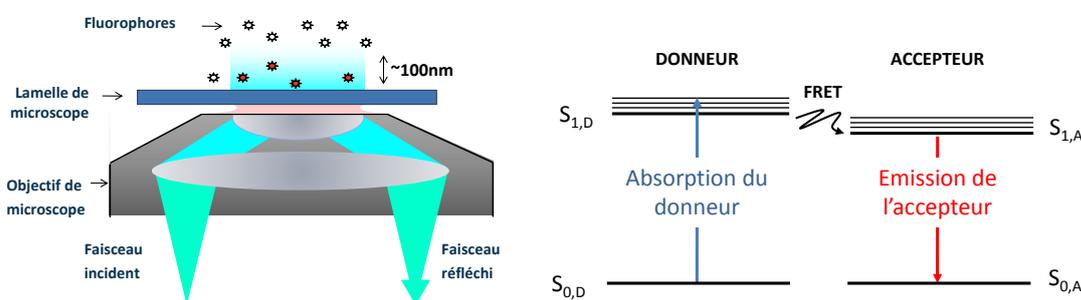


FIGURE 1.6 – Schémas de principe de la microscopie TIRF et du FRET. A gauche : en microscopie de TIRF, le faisceau d'excitation est totalement réfléchi à l'interface lamelle/échantillon créant une onde évanescente du côté de l'échantillon. Cette onde excite les fluorophores sur une profondeur d'une centaine de nanomètre seulement. A droite : les niveaux d'énergie des fluorophores donneur et accepteur sont représentés. Sous excitation à une longueur d'onde correspondant au spectre d'absorption du donneur, un phénomène de transfert d'énergie non radiatif inhibe la fluorescence du donneur et excite celle de l'accepteur.

Le FRET Le FRET (Forster Resonance Energy Transfer) est une technique de microscopie de fluorescence utilisée pour étudier les interactions entre deux molécules. Elle nécessite l'utilisation de deux fluorophores : le donneur et l'accepteur, dont le spectre d'émission du premier recouvre le spectre d'absorption du second. Lorsque les fluorophores sont proches l'un de l'autre (quelques nanomètres), il existe un phénomène de transfert d'énergie non radiatif du donneur vers l'accepteur (voir figure 1.6). Concrètement, lorsque l'on excite le donneur, sa fluorescence est en partie inhibée par la présence de l'accepteur, qui lui se retrouve excité. L'efficacité du transfert dépendant de la distance entre les deux fluorophores, il est possible de déterminer les variations de distance les séparant en analysant leur changement d'intensité de fluorescence [36, 40, 46–50].

Au travers de cette section, nous venons de décrire quelques techniques populaires pour les études en molécule unique. La description des mécanismes de la traduction et les exemples de lectures alternatives du code génétique de la section suivante vont nous permettre d'exposer notre approche de l'étude de la synthèse des protéines et de mettre en avant les critères pour le choix des techniques.

1.2 Motivations de notre étude et choix des techniques

La traduction est l'étape faisant le lien entre l'information génétique contenue dans l'ARNm et son expression protéique. Le ribosome, acteur principal de la traduction et véritable usine de fabrication des protéines dans la cellule, est une machinerie complexe faisant intervenir de nombreux facteurs. Nous allons résumer ici les principaux mécanismes de la traduction puis présenter le rôle de certaines structures secondaires de l'ARNm, support de la traduction, dans ces mécanismes. On différenciera les organismes dépourvus de noyau, que l'on appelle les procaryotes, des organismes qui en possèdent un, les eucaryotes. Certains mécanismes de la traduction ainsi que la structure du ribosome étant sensiblement différents selon l'appartenance à l'un ou l'autre de ces organismes, nous les exposerons séparément.

A partir de l'état de l'art des techniques en molécule unique établi dans la première partie de ce chapitre, nous justifierons ensuite le choix de la microscopie de fluorescence en TIRF pour l'étude de la traduction et celui de la pince optique pour l'étude des structures secondaires de l'ARNm.

1.2.1 La synthèse des protéines

1.2.1.1 Résumé des différents acteurs de la traduction

Pour aider à appréhender les étapes de la traduction qui vont suivre, nous allons commencer par établir un lexique des termes utilisés.

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

- L'ARN messager, ou ARNm, porte l'information génétique codant pour la protéine. L'ARNm est composé de nucléotides⁵ et peut être décomposé en codons. Un codon, formé de trois nucléotides, code pour un acide aminé. Il se lit de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (notation qui correspond à la numérotation des carbones du ribose constitutif de chaque nucléotide).
- Les ARN de transfert, ou ARNt, reconnaissent les codons de l'ARNm par appariement Watson-Crick⁶, et portent les acides aminés correspondant à ceux-ci. Les ARNt sont dans ce cas dits "chargés" et on les écrits aa-ARNt^{aa}. Sans acide aminé ils sont déacylés et sont alors notés ARNt^{aa}.
- Les ARN ribosomiques, ou ARNr. Constituants principaux du ribosome avec les protéines, ils portent l'activité catalytique.

Il y a deux codons particuliers :

- le codon initiateur, ou start, sur l'ARNm codant pour un Met-ARNt^{Met}⁷, qui est l'ARNt initiateur. Celui-ci est positionné sur le site P du ribosome lors de l'initiation. La séquence du codon start est AUG mais peut parfois être remplacé par le codon GUG et plus rarement UUG chez les procaryotes.

5. Les nucléotides sont des désoxyriboses ou des riboses portant une base parmi l'adénine, la guanine, la cytosine ou l'uracile (A, G, C, U respectivement).

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

7. Chez les procaryotes l'acide aminé Méthionine est formylé. Complexé à son ARN de transfert il est noté fMet-ARNt^{fMet}.

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

Les principaux sites du ribosome impliqués dans la traduction sont :

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

Les facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison pour la traduction chez le procaryote sont :

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

Les facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison pour la traduction chez l'eucaryote sont :

- Les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, eIF5 et la PABP (PolyA Binding Protein).
- Les deux facteurs d'élongation eEF-1 et eEF-2.
- Les facteurs de terminaison eRF1 et eRF3.

1.2.1.2 La traduction

Le ribosome Le ribosome est un moteur moléculaire présent dans le cytoplasme des cellules et responsable de la synthèse des protéines à partir du code génétique contenu sur l'ARNm. Que ce soit chez l'eucaryote ou le procaryote, il est formé de sous unités responsables, soit de la lecture du code génétique sur l'ARNm (la petite sous-unité), soit de la synthèse de la protéine (grande sous-unité). Il possède en son centre un site actif catalysant la synthèse des liaisons peptidiques reliant entre eux les acides aminés constituant la protéine. Ce site est appelé le centre peptidyl transferase et sert également de point d'ancrage à la chaîne polypeptidique en croissance. Les deux sous-unités du ribosome procaryote sont nommées d'après leur coefficient de sédimentation respectif, à savoir la grande sous-unité 50S et la petite sous-unité 30S. L'ensemble forme alors le complexe 70S pour une masse totale d'approximativement 2.7MDa⁸. L'unité 50S comporte 2 ARNr et 34 protéines tandis que l'unité 30S est formée d'un seul ARNr et de 21 protéines. La structure tridimensionnelle du ribosome en complexe avec les ARN de transfert et l'ARN messager de la figure 1.7 avec une résolution de 2.8 Å a demandé de nombreuses années d'efforts.

8. Un dalton est la masse atomique d'un atome d'hydrogène. A titre de comparaison, un acide aminé représente environ 110 Da et un nucléotide d'ADN 330 Da.

1.2 Motivations de notre étude et choix des techniques

Elle a permis notamment de mettre en évidence les rôles structuraux et fonctionnels assurés par les constituants du ribosome. Nous distinguerons par la suite trois sites du ribosomes, les sites A, P et E dans lesquels les ARN de transfert viennent successivement se fixer. Le site A (pour Aminoacyl) est occupé par un ARN de transfert porteur d'un acide aminé en attente d'être incorporé dans la chaîne polypeptidique. Le site P (pour Peptidyl) est le site où est ensuite transféré cet ARNt pour que son un acide aminé soit lié à la chaîne polypeptidique en croissance. Enfin le site E (pour Exit) permet la libération de l'ARNt une fois celui-ci déchargé de son acide aminé. Depuis le centre peptidyl transferase, le ribosome possède également un tunnel de sortie par lequel la protéine en croissance est progressivement évacuée.

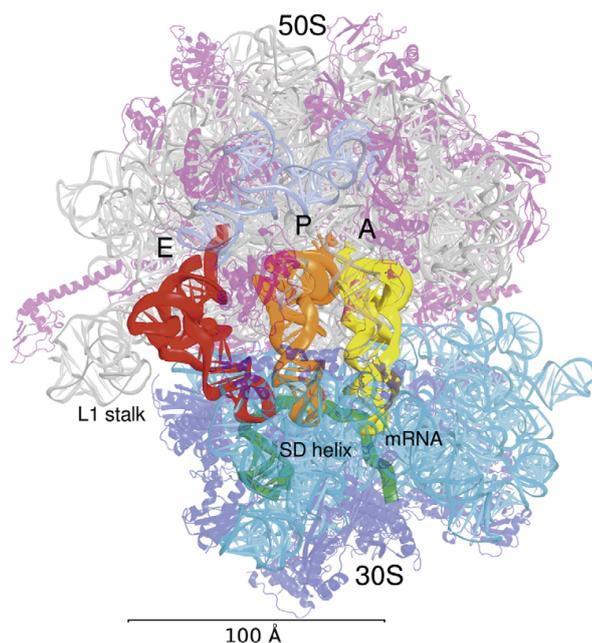


FIGURE 1.7 – Structure tridimensionnelle du ribosome procaryote obtenue par diffraction aux rayons X, avec une résolution de 2.8 Å. On y voit la grande sous-unité 50S (grise) complexée à la petite sous-unité 30S (bleue) sur l'ARNm (vert). Trois ARN de transfert sont représentés dans les différents site du ribosome A, P et E. La figure est extraite de [51].

Le ribosome eucaryote est quant à lui plus gros : 4.2MDa. Ses sous-unités sont nommées 60S et 40S et ensemble elles ont un coefficient de sédimentation de 80S. A la différence du ribosome procaryote, la sous-unité 60S comporte 3 ARNr et 49 protéines tandis que la petite sous-unité 40S est formée d'un seul ARNr et de 33 protéines. Ce n'est que très récemment que la structure tridimensionnelle du ribosome eucaryote a été révélée [52,53]. Malgré ces quelques différences dans leur structure, les mécanismes des ribosomes procaryotes et eucaryotes sont très similaires.

L'initiation chez les procaryotes L'initiation correspond à la complexation des deux sous-unités du ribosome sur l'ARNm. Pour ce faire la reconnaissance du codon de démarrage, ou codon START, doit se faire par la sous-unité 30S. Ce codon doit être précédé de 6 à 12 nucléotides par une séquence dite Shine-Dalgarno (SD) complémentaire de l'extrémité 3' de l'ARN ribosomique 16S de la petite sous-unité, stabilisant, par un appariement entre l'ARNm

et l'ARNr, la petite sous-unité sur l'ARNm.

La formation du complexe sur l'ARNm fait intervenir trois facteurs d'initiation : IF1, IF2 et IF3. D'abord IF3 s'associe à la petite sous-unité 30S pour sonder l'ARNm jusqu'à trouver la séquence SD, plaçant ainsi dans le site P le codon START. IF2 accompagne ensuite l'ARNt initiateur fMet-ARNt^{fMet} vers ce même site P tandis que IF1 bloque le site A de la sous-unité ribosomique. L'interaction codon-anticodon entre l'ARNm et le fMet-ARNt^{fMet} place le ribosome sur le bon cadre de lecture. IF2 hydrolyse une molécule de GTP puis IF3 et IF1 quittent le complexe. La sous-unité 50S peut alors s'associer et le ribosome complet peut commencer la traduction.

D'autres mécanismes de l'initiation de ribosomes procaryotes ont également pu être observés, faisant intervenir uniquement le ribosome 70S sur une position interne de l'ARNm. Nous y reviendrons par la suite, notamment dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

L'initiation chez les eucaryotes Chez les eucaryotes l'ARNm, présent sous forme circulaire, est complexé à différents facteurs d'initiation : eIF4E, eIF4G et eIF4A, ainsi que la PABP. Le facteur eIF4G joue alors le rôle de protéine organisatrice en liant simultanément la coiffe⁹ de l'ARNm via eIF4E à la queue polyA¹⁰ via la PABP, et recrutant la petite sous-unité 40S du ribosome.

Cette petite sous-unité est elle-même associée à l'ARNt de démarrage aminoacylé par la méthionine associé au facteur eIF2 complexé au GTP, au facteur eIF3 (qui maintient la sous-unité 40S dissociée de la grande sous-unité), ainsi que eIF1A et eIF5. Le facteur eIF3 reconnaît eIF4G sur l'ARNm et permet le recrutement du ribosome au niveau de la coiffe de l'ARNm. Ce complexe avance alors le long de l'ARNm jusqu'au codon START, puis dissocie ses différents facteurs associés pour recruter la grande sous-unité 60S du ribosome avant d'entamer la traduction.

Les rôles de tous ces facteurs d'initiation chez le ribosome eucaryote ne sont toutefois pas encore élucidés, ce qui complique fortement la complexation de ces ribosomes sur l'ARNm in vitro (notamment pour les études en molécule unique). Il existe également un autre mécanisme d'initiation du ribosome sur l'ARNm (faisant intervenir les structures du type IRES¹¹) mais nous y reviendrons dans le chapitre 5 lors de la description de nos expériences sur le ribosome en molécule unique.

L'élongation L'élongation correspond à l'étape d'incorporation des différents acides aminés dans la chaîne polypeptidique en croissance. Chaque cycle d'élongation correspond à la lecture d'un codon sur l'ARNm et à l'assimilation de l'acide aminé porté par un ARN de transfert (voir figure 1.8). Le facteur d'élongation EF-Tu (homologue de l'eEF1A chez les eucaryotes), en complexe avec le GTP, apporte un ARNt chargé (aa-ARNt^{aa}) au site A du ribosome, où se trouve le codon en cours de lecture. Lorsque l'anti-codon s'apparie correctement avec le codon du site A, l'hydrolyse du GTP en GDP permet à l'EF-Tu de libérer l'aa-ARNt^{aa}. Au centre peptidyl-transférase, l'ARNt initialement présent dans le site P est alors déacylé pour permettre le transfert de la chaîne polypeptidique en formation sur l'aa-ARNt^{aa} du site A.

9. La coiffe ou 5'-cap est un nucléotide modifié que l'on trouve à l'extrémité 5' des ARN messagers dans les cellules eucaryotes.

10. La queue polyA est une succession de nombreux ribonucléotides de type Adénosine (A) à l'extrémité 3' des ARNm.

11. Internal Ribosome Entry Site : séquence nucléotidique permettant le recrutement du ribosome sur une position interne de l'ARNm.

1.2 Motivations de notre étude et choix des techniques

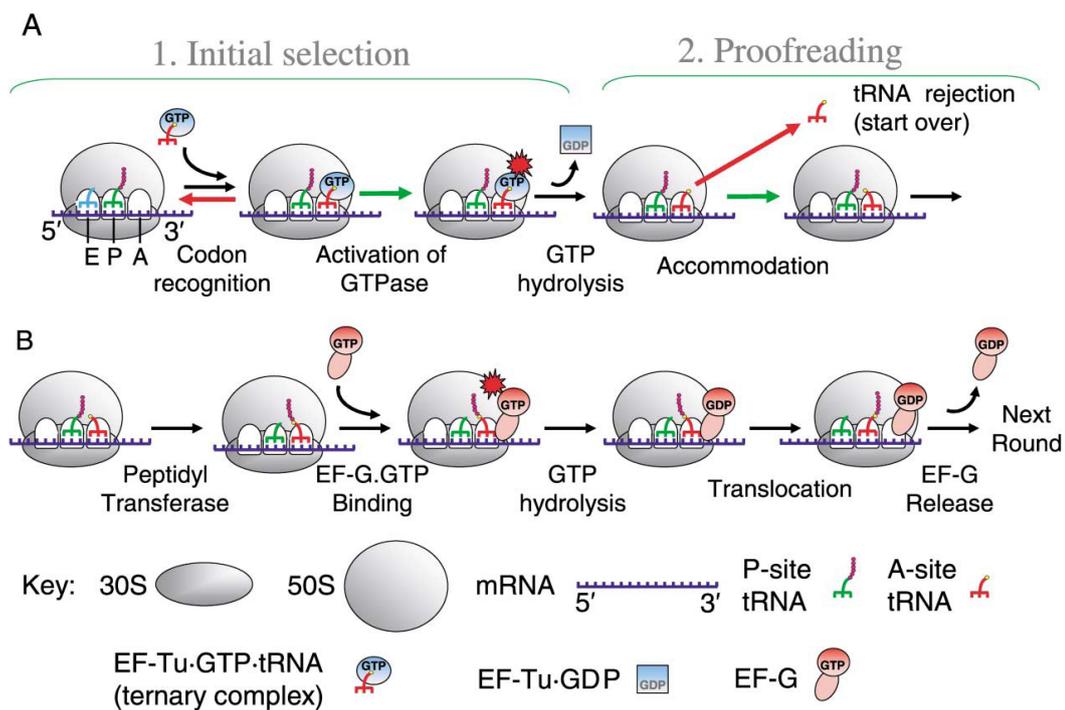


FIGURE 1.8 – Schéma d'un cycle d'élongation du ribosome. Celui-ci est initialement représenté avec les sites E et P occupés par un ARN de transfert, ainsi qu'avec un polypeptide en croissance. Le site A est quant à lui disponible pour accueillir un nouvel ARNt chargé. Une fois le bon ARNt chargé dans le site A, celui du site P est alors déacylé pour que la chaîne peptidique puisse être transférée vers le nouvel acide aminé. Le ribosome entame ensuite une translocation pour lire le codon suivant. Figure extraite de [54].

La protéine EF-G (eEF-2 chez l'eucaryote) catalyse ensuite la translocation des deux ARN de transfert des sites P et A vers les sites E et P. L'ARNt déacylé du site E est alors libéré dans le cytoplasme tandis que le site A se retrouve libre pour accueillir un nouvel ARNt chargé.

Les mécanismes du cycle d'élongation constituent un domaine particulièrement actif par la communauté scientifique étudiant la traduction à l'échelle de la molécule unique, notamment pour comprendre plus en détail la dynamique et la synchronisation de tous ces événements.

La terminaison Une fois le codon STOP atteint, des facteurs interviennent pour libérer la protéine du ribosome ainsi que le recyclage des différents acteurs de la traduction. Lorsque ce codon STOP est au niveau du site A du ribosome, la protéine complète est encore accrochée par une liaison ester au dernier ARNt situé au site P. Un facteur de terminaison (RF1 ou RF2 chez les procaryotes et eRF1 chez les eucaryotes) interagit alors avec le codon STOP et déclenche l'hydrolyse de la liaison ester entre la protéine et le dernier ARNt, libérant la protéine. Un second facteur (RF3 ou eRF3) se lie ensuite au ribosome et provoque l'hydrolyse du GTP permettant alors le départ des deux facteurs. L'ARNt et l'ARNm sont finalement libérés par l'action de RRF (Ribosome Release Factor) et de facteurs d'élongation et d'initiation (EF-G et IF3 chez les procaryotes).

1.2.1.3 Les structures de l'ARN

Nous venons de voir que l'ARNm est lu de manière linéaire par le ribosome, depuis un codon START jusqu'à un codon STOP. La phase de lecture étant imposée par le codon START il ne peut y avoir a priori qu'une seule protéine traduite à partir d'une même séquence d'un ARNm. On peut toutefois trouver dans la nature de nombreux exemples de voie alternative de lecture du code génétique, ainsi que de mécanismes de régulation de la traduction faisant notamment intervenir des structures de l'ARNm.

Dans la cellule, l'ARN est le plus souvent présent sous la forme de simples brins. Toutefois, dû à des appariements Watson-Crick intramoléculaires, de nombreux ARN se replient sur eux-mêmes pour former des structures secondaires. Dans certains cas, celles-ci peuvent même adopter une structure tridimensionnelle (structure tertiaire) en formant des interactions non-canoniques comme c'est le cas des ARN de transfert ou des ARN ribosomiques. L'existence de ces structures joue un rôle important dans la fonction de ces ARN, que ce soit pour la reconnaissance d'autres molécules ou protéines (comme par exemple les structures IRES ou SECIS de l'ARNm), mais aussi pour assurer des fonctions catalytiques (ribosome, riboswitch¹², ribozymes¹³...). Nous nous intéressons dans le cadre de cette thèse aux structures de l'ARN faisant intervenir une lecture alternative de l'ARNm. C'est le cas notamment du décalage de la phase de lecture ou encore de l'incorporation des acides aminés sélénocystéine ou pyrrolysine dans une protéine.

Dans le premier cas, le ribosome rencontre généralement durant la traduction une structure de l'ARNm résistant à son activité hélicase¹⁴ (souvent des structures tertiaires de types pseudo-nœuds, voir figure 1.9). Ces structures bloquent alors transitoirement le ribosome dans un état où celui-ci a une probabilité plus importante de changer de cadre de lecture. Des séquences de glissement présentes devant ces structures, permettent aux ARN de transfert de se ré-apparier

12. Structure présente sur un ARN messenger bloquant ou activant la traduction de la protéine correspondante.

13. ARN possédant la propriété de catalyser une réaction chimique spécifique.

14. Activité permettant de dissocier deux brins complémentaires d'un oligonucléotide

1.2 Motivations de notre étude et choix des techniques

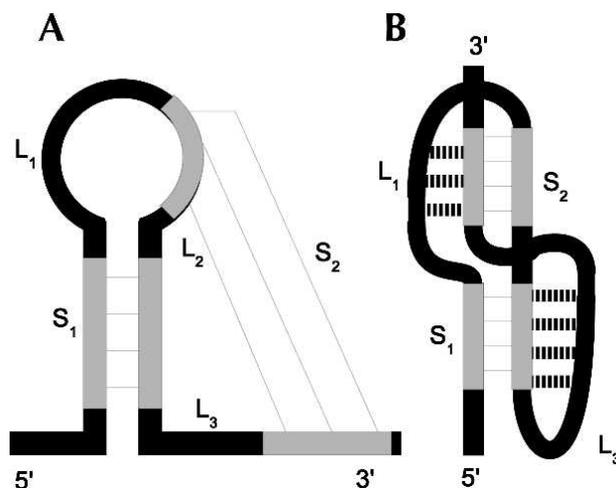


FIGURE 1.9 – Schéma d’une tige-boucle (A) interagissant avec l’ARNm pour former un pseudonœud (B). La tige-boucle est formée d’une tige (notée S) constituée de l’appariement d’une séquence de l’ARN avec la même séquence mais inversée présente plus loin sur l’ARN, et de la boucle (notée L) que constitue la séquence intermédiaire. Le pseudonœud est quant à lui formé par l’interaction d’une boucle avec une région située à l’extérieur de la tige qui la délimite. Figure extraite de [55].

dans la nouvelle phase de lecture et ainsi de poursuivre la traduction. Ce mécanisme est particulièrement utilisé par certains retrovirus pour fabriquer deux protéines différentes avec un ratio fixé, à partir d’un même ARNm.

Le second exemple concerne l’incorporation d’un acide aminé rare dans une protéine. Dans le cas des sélénoprotéines (protéines comprenant l’acide aminé rare sélénocystéine), une structure secondaire (tige-boucle SECIS) est également présente le long de l’ARNm, juste en aval d’un codon STOP. Cette structure a la particularité de recruter un facteur protéique spécifique pour l’incorporation de la sélénocystéine, permettant au ribosome de ne pas terminer la traduction sur le codon STOP et de continuer la fabrication de la nouvelle protéine.

1.2.2 Motivations

Les techniques traditionnelles employées par les biologistes et biochimistes pour l’étude du ribosome ont déjà permis de grandes avancées sur la compréhension des mécanismes de la traduction (notamment grâce aux structures cristallographiques du ribosome en complexe avec certains facteurs de la traduction [51,54,56–60]). Les mécanismes qui nous intéressent concernent les lectures alternatives du code génétique faisant intervenir des structures de l’ARNm tels que SECIS ou les pseudonœuds. Ceux-ci étant asynchrones et les événements concernés “rares”, ces techniques basées sur des mesures d’ensemble, voire sur des systèmes figés, se montrent particulièrement limitées.

Une approche à l’échelle de la molécule unique s’avère alors appropriée pour l’étude d’événements isolés et asynchrones. Elles ont d’ailleurs fait leurs preuves sur le ribosome procaryote et ont notamment permis une meilleure compréhension de certains aspects de la translocation [61–78]. La connaissance de la structure atomique du ribosome procaryote a permis des avancées remarquables grâce à des marquages spécifiques de certains de ses constituants et

l'étude de leurs interactions avec certains partenaires de la traduction. Cependant ces études se sont pour l'instant concentrées sur l'aspect qualitatif des mécanismes de la synthèse des protéines (mouvement des sous-unités ribosomiques durant le cycle d'élongation, conformation des ARN de transfert dans le ribosome...) en utilisant des reconstitutions des facteurs de la traduction. Afin de marquer certains acteurs de la traduction d'un fluorophore sans pour autant être gênés par le bruit de fluorescence des fluorophores libres en solution, ces reconstitutions des facteurs de la traduction ne sont pas représentatives des conditions physiologiques (les éléments marqués d'un fluorophore étant en très large défaut dans la solution) et la cinétique des événements observés est donc très largement sous-estimée. Il est maintenant connu que le ribosome effectue des pauses lors de la traduction et que la durée de celles-ci est grandement influencée par la présence d'une structure sur l'ARNm. Il n'est cependant pas encore clair si cette durée est corrélée au fait que le ribosome parvient à fondre la structure de l'ARNm, ou encore au fait qu'il change de cadre de lecture [79–81]. Etudier l'influence de ces pauses requiert l'utilisation d'extraits cellulaires plutôt qu'une reconstitution des facteurs de la traduction, afin de se placer dans des conditions plus représentatives de la "réalité" et perturber le moins possible la dynamique de la traduction.

En étudiant la cinétique de traduction de ribosomes individuels sur un ARNm comportant l'une de ces structures, on doit s'attendre à observer différentes populations, selon que le ribosome ouvre la structure ou décale sa phase de lecture (la position du codon STOP n'étant alors plus la même). Il serait particulièrement intéressant de voir comment évoluent ces populations avec la stabilité de la structure de l'ARNm (durée des pauses, déséquilibre des populations, efficacité de décalage de la phase de lecture etc...) ou encore d'étudier l'influence sur ces populations de la séquence de glissement ou de la séquence d'espacement avec la structure. Pour aller plus loin, on peut également s'interroger sur le cas des polysomes. Ceux-ci sont un ensemble de ribosomes traduisant en série le même ARNm, tels un enfillement de perles sur un même fil. Le premier ribosome rencontrant une structure secondaire doit ouvrir celle-ci mais il n'est pas encore connu si les ribosomes suivants doivent également ouvrir la tige-boucle ou encore s'ils aident le premier ribosome à se stabiliser sur l'ARNm (l'empêchant de reculer pour décaler sa phase de lecture).

Un deuxième aspect de l'importance de ces structures concerne leur stabilité ainsi que les forces mises en jeu pour leur ouverture. Ces structures représentent des barrières énergétiques que le ribosome doit franchir pour continuer la traduction. L'étude dans [82] suggère que la force nécessaire pour défaire la structure est directement liée à l'efficacité de décalage de la phase de lecture, toutefois des résultats plus récents évoquent plutôt la conformation de la structure et la difficulté pour le ribosome de l'ouvrir comme paramètres influençant cette efficacité [20, 83, 84]. La caractérisation de ces structures à l'aide de techniques de manipulation s'avèrerait complémentaire de mesures de cinétiques en microscopie de fluorescence. Dans le cas de la lecture alternative du code génétique faisant intervenir la tige-boucle SECIS de l'ARNm, on pourra s'intéresser aux modes d'interactions du facteur d'élongation SelB recrutant l'ARNt portant l'acide aminé rare, la sélénocystéine, et voir l'influence de ce facteur sur la stabilité de la structure.

Pour revenir aux mécanismes de la traduction, on notera que peu d'études en molécule unique ont été faites sur les étapes d'initiation et de la terminaison [85]. Pour la plupart, les études actuelles partent en effet d'une situation où le ribosome est déjà complexé sur l'ARNm avec l'ARNt initiateur déjà dans le site P, tandis que seuls des états hybrides, voire un ou deux cycles d'élongation du ribosome sont observés. L'une des raisons à cela est le fait que l'utilisation de solutions de traduction à partir des facteurs reconstitués, ainsi que le marquage de certains

1.2 Motivations de notre étude et choix des techniques

de ces facteurs, demandent des efforts considérables, notamment pour leur purification. Avoir accès à un système permettant d'observer plusieurs cycles d'élongation autoriserait également l'étude des mécanismes de la fin de la synthèse des protéines tels que les diverses interactions avec les facteurs de terminaison ou encore les protéines chaperonnes assistant la maturation du polypeptide en croissance.

En ce qui concerne le ribosome eucaryote, aucune étude en molécule unique n'a encore été réalisée à ce jour. La raison principale vient du fait que la structure complète du ribosome eucaryote n'a été révélée que récemment, rendant le marquage (spécifique et unique) du ribosome lui-même difficilement accessible. Le groupe de J. D.Puglisi de l'université de Standford a toutefois récemment publié des premiers résultats sur le marquage du ribosome eucaryote suggérant de futures expériences en molécule unique [86]. Les étapes de l'initiation étant également plus complexes et faisant intervenir de nombreux facteurs dont les rôles sont encore mal caractérisés, la reproduction de ces étapes *in vitro* pour des études en molécule unique en est d'autant plus compliquée, surtout si la purification de ces facteurs d'initiation doit être effectuée. Observer la traduction de ribosomes eucaryotes en molécule unique représente donc un enjeu de taille et permettrait de clarifier de nombreux mécanismes. On pourra notamment s'intéresser aux mécanismes d'action des facteurs de terminaison eRF1 et eRF3 en interaction avec les ARN de transfert dans le ribosome lors de la fin de la traduction.

1.2.3 Choix d'approche de l'étude

1.2.3.1 Choix des techniques

Le potentiel des techniques en molécule unique disponibles à ce jour suggèrent d'orienter notre étude sur la synthèse des protéines selon deux approches différentes. En effet, l'étude du décalage de la phase de lecture ou de l'incorporation d'acides aminés rares dans la protéine fait intervenir d'une part des forces qui dépendent de la structure à ouvrir ainsi que des déplacements de l'ordre du nanomètre (notamment pour chaque translocation du ribosome) et d'autre part de la statistique (pour caractériser les différentes populations). Les techniques de manipulation actuelles possédant les sensibilités requises pour nos expériences ne permettent cependant que d'étudier un système à la fois. Une seconde technique basée sur la fluorescence de molécules uniques permettant d'étudier en parallèle plusieurs ribosomes est alors nécessaire.

Lorsque le ribosome avance d'un codon le long de l'ARNm, parcourant un nanomètre en moins d'une seconde, il doit casser des interactions entre l'ARN ribosomique et le complexe codon-anticodon, ce qui nécessite une force de l'ordre de la dizaine de picoNewton [24]. La technique de manipulation pour observer ces déplacements ainsi que ces forces doit donc permettre non seulement une résolution spatiale subnanométrique avec une échelle de temps compatible, mais également de mesurer ou appliquer des forces de l'ordre du picoNewton. D'après l'état de l'art du début de ce chapitre, seules les pinces optiques remplissent ces critères. En effet l'AFM ne permet d'étudier que des processus biologiques faisant intervenir des gammes de forces plus élevées, tandis que les pinces magnétiques ne possèdent pas une résolution spatiale suffisante. Les pinces optiques ont d'ailleurs déjà montré leur potentiel pour l'étude des mécanismes de la traduction, que ce soit lors de l'ouverture de structure de l'ARNm [20,82,83,87], ou pour étudier les interactions de certains facteurs avec le ribosome [24,27,28] voire la traduction elle-même [25,26]. Cette technique souffre toutefois du fait qu'un seul système biologique peut être étudié à la fois et l'expérience doit être reproduite afin de constituer des statistiques représentatives des processus étudiés.

Etant donné la complexité des expériences de traduction en molécule unique, il convient d'utiliser une technique permettant des mesures sur plusieurs systèmes en parallèle. La microscopie de fluorescence en TIRF, grâce à son champ large, a l'avantage de permettre l'étude d'un grand nombre de systèmes biologiques tout en laissant la possibilité de combiner des techniques de FRET voire même de super-résolution telle que FIONA. La microscopie de fluorescence ne permet toutefois d'explorer que l'aspect dynamique de la synthèse des protéines et se doit d'être complétée par des techniques de manipulation pour sonder les forces mises en jeu.

1.2.3.2 Exemples d'études de la traduction en molécule unique

Nous donnons ici deux exemples d'études de la traduction par des techniques en molécule unique. Le premier utilise des pinces optiques pour caractériser les forces mises en jeu dans l'ouverture de structures de l'ARNm impliquées dans des cas de décalage de la phase de lecture, tandis que le second utilise la microscopie de fluorescence pour étudier les mouvements des deux sous-unités du ribosome pendant la translocation.

Pince optique et traduction Dans [82], les auteurs montrent que l'efficacité du décalage de la phase de lecture dépend des forces nécessaires pour ouvrir des structures de l'ARNm de types pseudonœuds impliquées dans le cas du virus de la bronchite (IBV, Infectious Bronchitis Virus). Pour ce faire, l'ARN contenant le pseudonœud est hybridé sur deux oligonucléotides ADN, chacun possédant à son extrémité une biotine ou une digoxigénine. Ces deux molécules permettent d'attacher l'ARN entre deux billes, l'une maintenue par une micropipette et l'autre piégée par une pince optique (voir figure 1.10). La micropipette est ensuite déplacée par rapport à la pince optique pour étirer l'ARN et ouvrir sa structure. Connaissant la raideur du piège optique et les déviations de la bille dans le piège lorsque la structure de l'ARN est étirée, les auteurs obtiennent les forces nécessaires pour une extension donnée de l'ARN et notamment la force pour l'ouverture de la structure (voir figure 1.10). Trois ARN sont étirés dans cette étude mais seulement deux possèdent une structure. L'ARN PK421 ne possède en effet pas de pseudonœud et sert de contrôle, tandis que les ARN PK400 et PK401 possèdent un pseudonœud différant d'un nucléotide sur sa première tige. La traduction de ces ARN en solution montre une efficacité de décalage de la phase de lecture de 0.5% dans le contrôle (limite de détection de leur méthode de mesure), 14% pour l'ARN PK401 et 6% pour l'ARN PK400 tandis que l'ouverture du pseudonœud nécessite une force de 39 pN pour l'ARN PK401 et 31 pN pour l'ARN PK400. De ces mesures les auteurs en concluent que l'efficacité de décalage de la phase de lecture est effectivement corrélée à la force nécessaire pour ouvrir le pseudonœud dans le cas du virus de la bronchite.

Les résultats de cette étude sont cependant modérés par les études dans [20, 83] où les auteurs montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre le décalage de la phase de lecture et la force nécessaire pour l'ouverture des pseudonœuds pour des mutants du même virus. Ils montrent toutefois qu'il existe une corrélation avec la difficulté pour ouvrir la structure, notamment liée aux contraintes de torsion ou encore à la cinétique de repliement de la structure.

Microscopie de fluorescence et traduction Il est maintenant connu qu'avant la formation de la liaison peptidique associant le nouvel acide aminé au polypeptide en croissance, les deux sous-unités du ribosome sont solidement associées. Ces deux sous-unités se débloquent alors pour amener le site peptidyl transférase vers le nouvel acide aminé, puis se bloquent à nouveau pour permettre la translocation de l'ARNt du site A vers le site P ainsi que la lecture du nouveau

1.2 Motivations de notre étude et choix des techniques

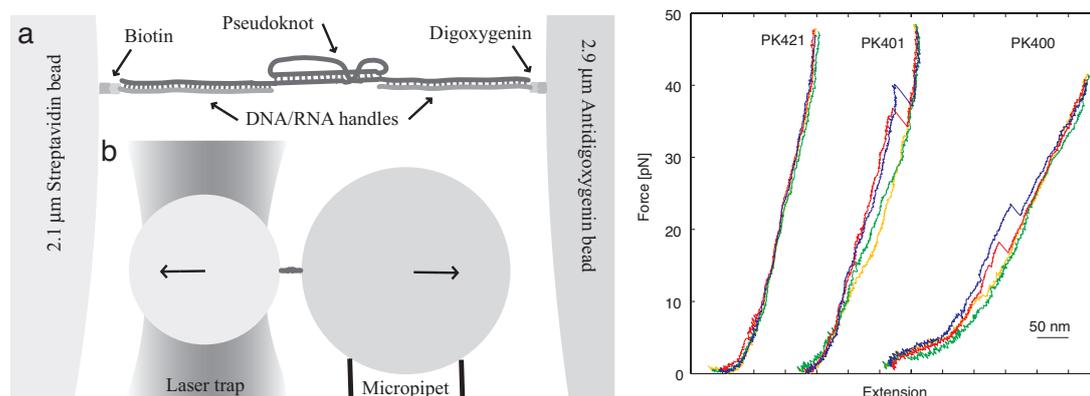


FIGURE 1.10 – Schéma de l'expérience et mesures de forces en fonction de l'extension des différents ARN étudiés. L'ARN est attaché entre deux billes de diamètres $2.1 \mu\text{m}$ et $2.9 \mu\text{m}$ par l'intermédiaire de deux oligonucléotides ADN hybridés sur cet ARN. La plus grande bille est maintenue par une micropipette tandis que la plus petite est piégée par la pince optique. Pour étirer l'ARN et ouvrir sa structure, la micropipette est déplacée par rapport à la pince optique. Les déviations du faisceau de pince par la bille piégée renseignent alors sur l'extension de l'ARN et les forces mises en jeu. Il est ainsi possible de connaître la force nécessaire pour ouvrir la structure et l'extension de cette dernière. La figure de droite représente les mesures (deux étirements et deux relâchements pour chaque ARN) obtenues pour l'ARN PK421 qui ne possède pas de pseudonœud (contrôle), ainsi que les ARN PK400 et PK401 qui possèdent un pseudonœud différent d'un nucléotide sur la première tige. Figure extraite de [82].

codon. Des études en cryo-microscopie électronique ont par ailleurs montré que lorsque les deux sous-unités sont débloquées, l'unité 30S possède une liberté de rotation de 3 à 10° permettant un état hybride du ribosome pendant lequel la translocation des ARNt est possible. La façon dont ces événements sont synchronisés n'est cependant pas encore comprise.

L'étude dans [70] porte sur les changements conformationnels des deux sous-unités du ribosome lors du cycle d'élongation. Pour ce faire chaque sous-unité est marquée d'un fluorophore (Cy3 ou Cy5) suffisamment proches l'un de l'autre pour observer un signal de FRET lorsque l'échantillon est éclairé en TIRF par le faisceau d'excitation (dont la longueur d'onde d'émission correspond au pic d'absorption du Cy3). Les sous-unités 30S sont initialement complexées sur les ARNm puis sont fixées à la surface par l'intermédiaire d'une biotine à l'extrémité 5' de chaque ARNm. Les sous-unités 50S sont ensuite complexées sur la petite sous-unité 30S faisant alors apparaître le signal de FRET (diminution de l'intensité du Cy3 et apparition du signal du Cy5) entre les fluorophores (voir figure 1.11). En injectant les facteurs de la traduction, les auteurs observent alors les changements conformationnels du ribosome lorsque celui-ci avance sur l'ARNm.

Ce système a permis aux auteurs d'observer la dynamique d'un grand nombre de ribosomes sur plusieurs cycles d'élongation et de corréler entre eux plusieurs des mécanismes de la traduction. Ils confirment ainsi le fait que le ribosome passe d'un mode "verrouillé" à un mode "déverrouillé" pour chaque cycle d'élongation, synchronisant le transfert des ARNt ainsi que la lecture du nouveau codon de l'ARNm. Les durées passées dans ces différentes conformations du ribosome sont également caractérisées et montrent que, tandis que la durée de l'état verrouillée reste constante, celle de l'état déverrouillée diminue fortement après plusieurs cycles d'élonga-

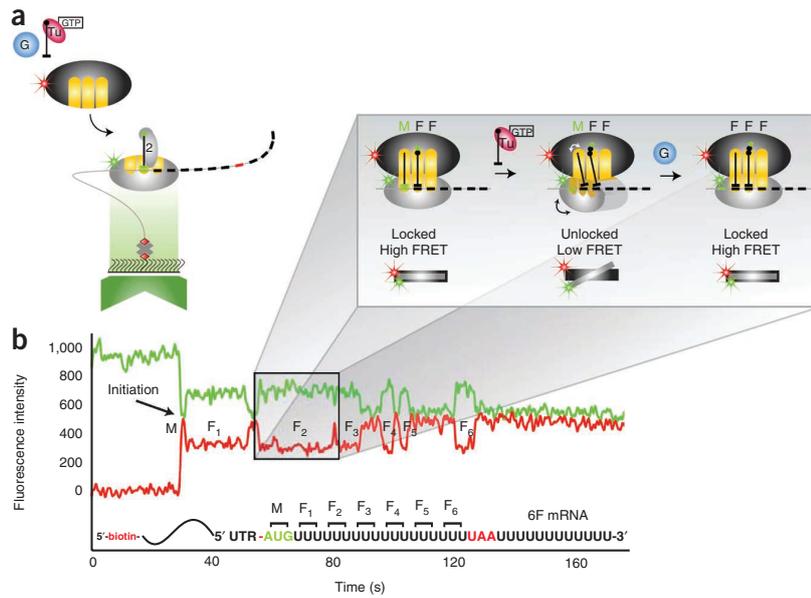


FIGURE 1.11 – (a) : configuration de l'expérience. La petite sous-unité du ribosome, marquée d'un Cy3 et associée à l'ARNm, est fixée à la surface par l'intermédiaire d'une biotine sur l'extrémité de cet ARNm. La grande sous-unité, marquée d'un Cy5, vient ensuite se complexer à la petite pour former le complexe 70S sur l'ARNm. L'association des deux sous-unités fait alors apparaître un signal de FRET entre les deux fluorophores lors de l'excitation par le faisceau laser à 532 nm totalement réfléchi à l'interface lamelle/échantillon. (b) : traces temporelles des deux fluorophores au cours de la traduction. Les changements d'efficacité de FRET renseignent sur la conformation du ribosome selon sa position sur l'ARNm. M et F dénotent respectivement les codons de la méthionine et de la phénylalanine. Figure extraite de [70].

1.2 Motivations de notre étude et choix des techniques

tions, traduisant le fait que la vitesse de translocation du ribosome n'est pas constante le long de l'ARNm (du moins sur les 6 translocations observées par ces auteurs).

L'activité de plusieurs antibiotiques a également pu être caractérisée, confirmant leur mode d'action (obstruction du tunnel de sortie pour l'érythromycine, blocage de l'EFG dans le ribosome pour l'acide fusidique, etc...). Enfin, en observant un troisième signal de fluorescence provenant du marquage d'un ARNt, les auteurs confirment leurs précédents résultats sur le fait que la reconnaissance codon-anticodon de l'ARNm et le nouvel ARNt dans le site A se fait pendant le changement de conformation du ribosome.

La principale limitation de leur système vient du fait que les auteurs observent ces multiples cycles d'élongation du ribosome en utilisant des solutions contenant les facteurs de la traduction dans des quantités nettement inférieures à celles rencontrées dans des conditions physiologiques. Il en résulte que les cinétiques des mécanismes sont fortement ralenties et, en raison des durées de vie limitées des fluorophores avant photoblanchiment, seuls quelques cycles d'élongation peuvent être observés.

Ces deux exemples de techniques appliquées à l'étude de la traduction permettent donc d'aborder deux aspects de la synthèse des protéines. Les pinces optiques s'avèrent être une technique parfaitement adaptée pour étudier les structures de l'ARNm et leur rôle non trivial sur le décalage de la phase de lecture. Elles permettent non seulement de caractériser les barrières énergétiques que représentent ces structures mais également de caractériser leurs cinétiques de repliement ainsi que l'influence de facteurs protéiques sur leur stabilité. Les éléments clés et les mécanismes de cette lecture alternative de l'ARNm restent toutefois à être caractérisés. Des études récentes [25, 26] ont par ailleurs montré le potentiel des pinces optiques pour l'observation de plusieurs cycles d'élongation du ribosome en temps réel tout en appliquant des forces sur le système biologique.

La microscopie de fluorescence en TIRF permet quant à elle de sonder d'autres aspects de la traduction, tels que les changements conformationnels du ribosome ou bien la cinétique et les modes d'interaction de divers facteurs de la traduction. Elle permet notamment l'observation d'un grand nombre de systèmes biologiques en parallèle et de caractériser les processus biologiques sur des populations entières. On pourra facilement imaginer à terme pouvoir combiner ces deux techniques afin de sonder lors de la traduction les interactions du ribosome avec certains facteurs protéiques ou avec la structure elle-même tout en mesurant les forces impliquées.

Développement d'un montage de pince optique

Les structures secondaires d'acides nucléiques tels l'ADN ou l'ARN jouent un rôle fondamental dans leur interaction avec les protéines ou les moteurs moléculaires comme les ribosomes, polymérases, hélicases . . . La connaissance des propriétés de ces structures est alors importante pour comprendre les mécanismes qui leur sont liés.

En tirant profit des propriétés de la lumière afin de manipuler des objets de petite taille, les pinces optiques permettent d'appliquer et sonder des forces, typiquement de 0.1 à 100 pN, couvrant une large gamme de forces impliquées dans les processus biologiques avec une excellente résolution spatiale et temporelle (0.1 – 2 nm et 10^{-4} s respectivement). De tels outils de manipulation ont déjà permis de nombreuses études à l'échelle de la molécule unique permettant d'appliquer des forces suffisantes pour dénaturer des structures existantes sur les acides nucléiques et ainsi remonter à leur conformation et aux forces permettant de maintenir ces structures [13, 17–19, 82, 83, 87–89]. D'autres travaux ont également démontré le large potentiel des pinces optiques pour étudier la dynamique de certains moteurs moléculaires comme la kinésine [90], les polymérases [11, 22] ou même le ribosome [24–28].

Dans cette section nous allons décrire le montage de pince optique développé dans notre laboratoire afin d'étudier ces structures présentes sur certains acides ribonucléiques. Notre équipe s'intéresse en particulier à la structure SECIS de l'ARN messenger intervenant dans l'incorporation dans certaines protéines de la sélénocystéine, un acide aminé rare qui ne possède pas de codon spécifique. Cette structure de petite taille (quarantaine de nucléotides) possède une forte affinité avec une protéine permettant au ribosome sur un codon STOP d'incorporer l'acide aminé en question au lieu de terminer la traduction. Combinée à un montage de fluorescence la pince optique permettra à terme d'étudier les changements conformationnels du ribosome en interaction avec de telles structures. Dans un premier temps les principes de base, le dispositif expérimental ainsi qu'une nouvelle méthode de calibration de notre pince optique seront développés. Nous exposerons ensuite les premiers résultats obtenus de l'application de notre piège optique pour mesurer les propriétés mécaniques d'un système maintenant connu qu'est l'ADN et ainsi valider notre système. Une fois cet objectif atteint, notre dispositif de pince optique permettra d'étudier des structures secondaires telles que SECIS.

2.1 Principe

Le piégeage optique est basé sur l'interaction de la lumière avec un objet micrométrique [91] (quelques dizaines de nanomètres à quelques dizaines de microns). Cette interaction de la lumière avec la matière permet d'exercer des forces typiquement de l'ordre du piconewton. En focalisant fortement un faisceau laser il est possible d'exercer deux types de forces sur un objet

diélectrique d'indice supérieur à celui du milieu environnant : une force de pression dite de radiation due aux photons poussant la particule dans le sens de propagation du faisceau et une force de gradient ramenant la particule vers le point de plus forte intensité, à savoir le point de focalisation du faisceau. C'est cette seconde force qui participera efficacement au piégeage tandis que la première aura tendance à pousser l'objet hors de sa position d'équilibre au point de focalisation du laser. Le piégeage ne sera alors possible que lorsque la force de gradient devient supérieure à la pression de radiation.

Dans une première approximation on peut représenter l'objet piégé se comportant comme dans un potentiel harmonique. Une analogie peut être faite avec le comportement d'une bille accrochée à un ressort. Lorsque la bille s'éloigne de sa position d'équilibre une force de rappel s'exerçant comme le produit de la constante de raideur du ressort par le déplacement de la bille va s'exercer sur celle-ci. De la même façon on peut caractériser un piège optique par sa raideur en N/m. En connaissant donc cette constante et le déplacement de la bille par rapport à sa position d'équilibre il est alors possible de connaître la force exercée sur cette bille.

Deux modèles permettent de comprendre plus en détail le piégeage optique. Toutefois ceux-ci ne s'appliquent que dans deux cas bien distincts. Le premier se place dans le cas d'une bille de taille supérieure d'un ordre de grandeur à la longueur d'onde du piège, on est alors dans le cas du régime de Mie [92] où l'on peut expliquer le piégeage par l'optique géométrique. Le second considère le cas d'une bille de dimension inférieure d'un ordre de grandeur à la longueur d'onde et que l'on peut assimiler à un dipôle dans un champ électrique [93]. Dans le cas intermédiaire où l'objet est de même dimension que la longueur d'onde, des calculs plus complets permettant d'évaluer les forces de piégeage peuvent être trouvés dans la littérature [94]. Cependant compte tenu des incertitudes résiduelles sur la forme du potentiel du piège causées par les aberrations optiques ou encore de la transmission de l'objectif mal connue dans le proche infrarouge, une calibration expérimentale du piège est préférable pour connaître sa constante de raideur.

2.1.1 Régime de Mie

La lumière possédant une quantité de mouvement, celle-ci est modifiée lors du passage de la lumière au travers de la bille. Le transfert de la quantité de mouvement de la lumière à l'objet résulte alors en l'action d'une force sur ce dernier. Dans le régime de Mie, une explication par l'optique géométrique des transferts de quantité de mouvement de la lumière avec celle de l'objet piégé donne de bons résultats pour le calcul des forces appliquées sur des objets de diamètre très supérieur à la longueur d'onde du faisceau de piège ($d \gg \lambda$).

En considérant un flux de photons incidents sur une bille d'indice supérieur à celui du milieu, une certaine proportion est réfléchi à la première interface tandis qu'une autre est réfractée par l'objet selon la loi de Snell-Descartes. Les multiples réflexions sur les faces internes de la bille seront ici négligées, de même que les effets de polarisation.

Dans le cas des photons réfléchis, ceux-ci voient alors leur quantité de mouvement totale changer d'une quantité \vec{P} :

$$\vec{P} = \sum_{i=0}^N \vec{p}_i \quad (2.1)$$

où N est le nombre total de photons réfléchis et \vec{p}_i la quantité de mouvement d'un photon. L'objet est donc dévié d'une quantité égale mais opposée $-\vec{P}$ (figure 2.2). Ce transfert de

2.1 Principe

quantité de mouvement se traduit alors par une force exercée dans le sens de propagation de la lumière. Il s'agit de la force de pression de radiation.

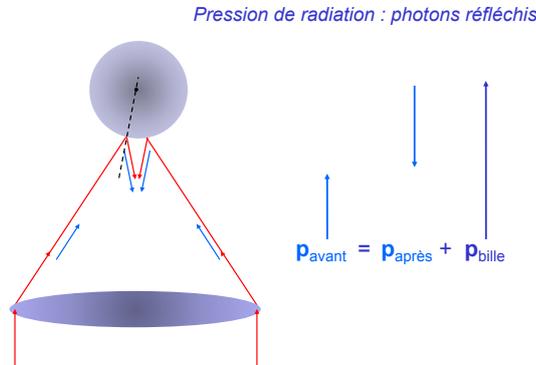


FIGURE 2.1 – Schéma de principe de la pression de radiation. Les photons réfléchis à l'interface entre le milieu et la bille cèdent une fraction de leur quantité de mouvement poussant alors la bille dans le sens de propagation des photons incidents.

Pour comprendre le piégeage longitudinal et transversal il faut considérer les photons réfractés par l'objet. Le piégeage longitudinal s'explique par le fait que l'objet se comporte comme une lentille et collimate (ou bien fait diverger) les rayons incidents inclinés par rapport à l'axe optique selon que l'objet est situé en aval (ou en amont) du point de focalisation (figure 2.2). La composante longitudinale de la quantité de mouvement des photons en sortie de l'objet est alors plus grande (respectivement plus petite) qu'à l'entrée. Il en résulte une force dirigée vers le point de focalisation du faisceau appelée force de gradient. On comprend alors que pour que le piégeage soit efficace il faudra que la force de gradient soit supérieure à la force de pression de radiation.

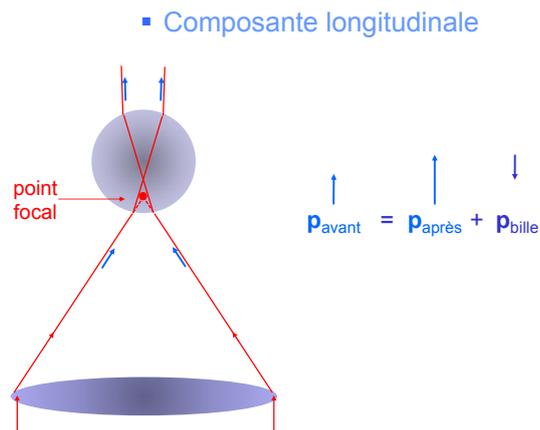


FIGURE 2.2 – Schéma de principe du piégeage longitudinal. La composante longitudinale de la quantité de mouvement des photons, dont la trajectoire est déviée par la bille, est plus grande (ou plus petite si la bille est positionnée en amont du point de focalisation du faisceau) qu'à l'entrée. Il en résulte une force dirigée vers le point de focalisation du faisceau.

Le piégeage transversal se comprend quant à lui de la même manière, à savoir qu'un rayon

incident désaxé par rapport à la bille exercera sur celle-ci une force dirigée du côté d'incidence du faisceau (figure 2.3). Dans le cas d'un faisceau laser le profil d'intensité étant gaussien, la bille verra un gradient d'intensité et sera donc toujours attirée vers le centre du faisceau. Pour maximiser le piégeage transversal il faudra donc obtenir un fort gradient d'intensité ce qui peut être obtenu par l'utilisation d'un objectif à forte ouverture numérique. On peut également remarquer que puisque le gradient d'intensité sera plus grand dans le plan transversal que dans le plan longitudinal, la force de piégeage sera également plus importante .

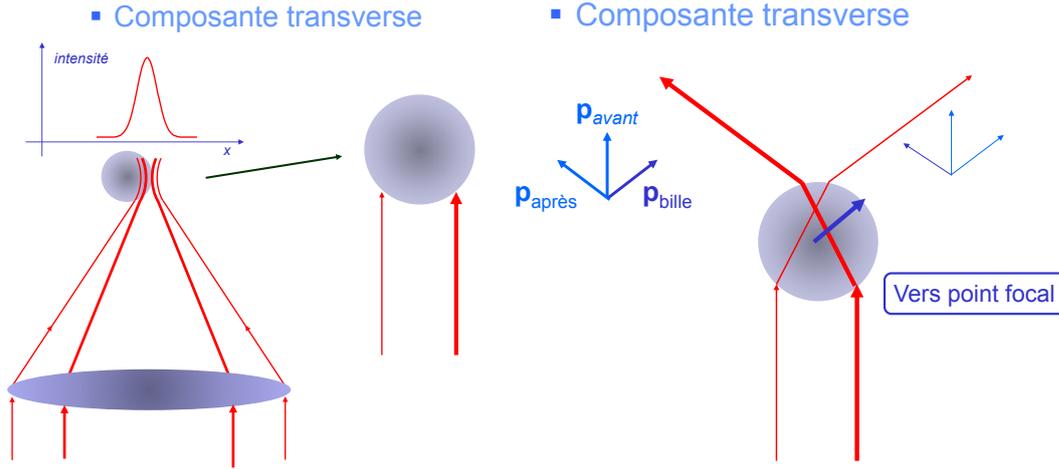


FIGURE 2.3 – Schéma de principe du piégeage transversal. Les photons incidents désaxés par rapport à la bille céderont à la bille une quantité de mouvement dirigée du côté d'incidence des photons.

Connaissant le changement total de la quantité de mouvement de la lumière subi à la traversée de la bille, il est alors possible de remonter à la force exercée sur celle-ci :

$$F_{bille}^{\vec{}} = \frac{\partial \vec{P}}{\partial t} \quad (2.2)$$

La quantité de mouvement p transmise par un photon à la bille s'écrivant $p = h/\lambda$ (avec h la constante de Planck et λ la longueur d'onde du faisceau) on peut exprimer la quantité totale de mouvement transmise par un flux de N photons, d'énergie totale E et de fréquence ν , à la bille d'indice n_b par :

$$P = Np = \frac{E}{h\nu} \frac{h}{\lambda} = \frac{n_b E}{c} \quad (2.3)$$

Ashkin dans [92] propose un facteur sans dimension Q supplémentaire à cette équation, représentant l'efficacité de piégeage. Ce facteur peut être calculé connaissant notamment l'angle d'incidence des rayons, le mode spatial du faisceau laser, sa longueur d'onde, sa polarisation, les indices de réfraction ainsi que la géométrie de l'objet piégé. La force totale exercée par les photons sur la bille s'exprime alors selon :

$$F = Q \frac{n_b P}{c} \quad (2.4)$$

Avec P la puissance du laser dans le plan de focalisation. En prenant une puissance de 10mW, un facteur d'efficacité Q de 0,1 et une bille d'indice 1,5 on trouve un ordre de grandeur de 5pN pour la force globale exercée par les photons.

2.1 Principe

2.1.2 Régime de Rayleigh

Pour expliquer le cas d'un objet de diamètre très inférieur à la longueur d'onde du faisceau laser ($d \ll \lambda$) le régime de Rayleigh propose quant lui une approche différente. L'objet est alors assimilé à un dipôle dans un champ électrique sur lequel les forces se décomposent en deux types : une force de pression de radiation et une force de gradient.

En définissant $I(r)$ comme étant l'intensité au point de focalisation dans le plan perpendiculaire à l'axe optique :

$$I(r) = \frac{2P}{\pi\omega^2} e^{-2r^2/\omega^2} \quad (2.5)$$

avec P la puissance du faisceau laser dans le plan focal, ω son waist (le rayon), on peut exprimer la force de pression de radiation de la manière suivante [90] :

$$\vec{F}_{rad} = \frac{128\pi^5 r^6 n_m I}{3\lambda^4 c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \vec{u}_z \quad (2.6)$$

avec m le rapport d'indice de l'objet n_b sur celui du milieu n_m , λ la longueur d'onde du faisceau laser, c la vitesse de la lumière dans le vide, r le rayon de la bille et \vec{u}_z le vecteur directeur de la propagation de la lumière. La principale action de cette force sera donc de pousser la bille dans le sens de propagation du faisceau.

On peut également définir la force de gradient exercée sur un objet diélectrique situé dans un champ électrique. Sa polarisation est alors reliée au champ électrique par :

$$\vec{p} = \alpha \vec{E} \quad (2.7)$$

où α est la polarisabilité de l'objet définie comme :

$$\alpha = n_m^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (2.8)$$

La force de gradient s'écrit alors :

$$\vec{F}_{grad} = \frac{\alpha}{2} \nabla I \quad (2.9)$$

On voit alors que, comme dans le régime de Mie, la force de gradient sera d'autant plus grande que le faisceau sera fortement focalisé. On obtient finalement dans le plan perpendiculaire à l'axe optique :

$$F(r) = \frac{4\alpha r P}{\omega^4 c n_m^2} e^{-r^2/2\omega^2} \quad (2.10)$$

Il est également intéressant de remarquer que dans le cas du régime de Rayleigh la force de pression de radiation varie quadratiquement avec la polarisabilité de la bille. Plus la différence entre l'indice du milieu et celui de la bille sera grande et plus la polarisabilité de la bille et donc la pression de radiation seront élevées. Il sera donc plus difficile de piéger dans le plan longitudinal des billes de polystyrène (indice 1.57, différent du matériau massif) que des billes de silice (indice 1.45). La force de gradient varie quant à elle linéairement avec la polarisabilité de la bille. La force de piégeage transversale étant indépendante de la pression de radiation, pour une même puissance du faisceau laser on pourra donc appliquer des forces dans le plan transversal plus élevées sur des billes de polystyrène que sur des billes de silice.

Une deuxième remarque peut être faite sur l'influence de la taille de la bille piégée. Dans le régime de Rayleigh les forces longitudinales varient avec le cube du rayon de la bille tandis que dans le régime de Mie la taille n'a que peu ou pas d'influence [95].

Enfin il est à noter que dans une grande majorité des cas, les objets piégés par pince optique ont une taille du même ordre de grandeur que la longueur d'onde du faisceau de piège. Les deux modèles décrits ci-dessus n'apportent donc pas de prédiction précise quant aux forces mises en jeu et une calibration expérimentale du piège est préférable.

2.2 Dispositif expérimental

2.2.1 Dispositif du piège

Le montage du piège a été réalisé sur un microscope Olympus IX-70 et est schématisé sur la figure 2.4. L'ensemble des optiques a été monté sur une table sur coussin d'air et protégé des perturbations extérieures à l'aide d'une enceinte réalisée en contreplaqué du côté extérieur et en isolant phonique côté intérieur (Sofombi 10A BS 25, PintaEnac).

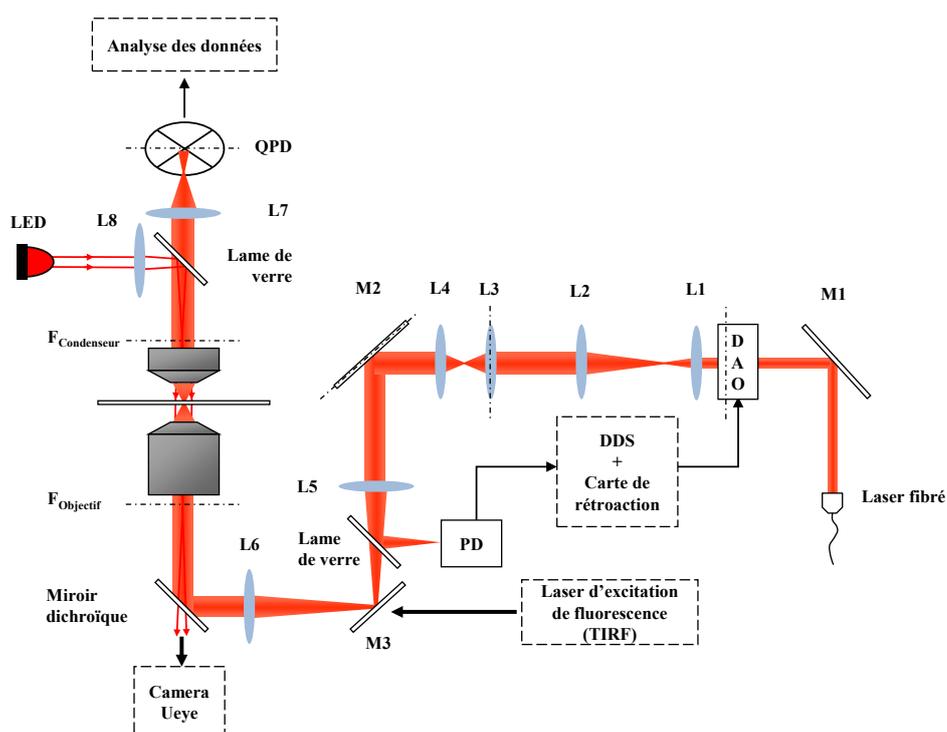


FIGURE 2.4 – Dispositif expérimental complet de la pince optique.

2.2.1.1 Le laser

Deux sources laser différentes ont été utilisées pour le montage de la pince optique. La première est un laser solide Nd :YAG continu émettant à 1064nm, pompé par diode, polarisé linéairement et de puissance nominale 1W. Le mode spatial de ce laser était initialement circulaire mais il a évolué vers un mode spatial elliptique. Il a été remplacé récemment par un laser

2.2 Dispositif expérimental

à fibre dopée Ytterbium (Keopsys) de longueur d'onde 1069nm, de puissance nominale 5W, également polarisé linéairement. Le choix du laser à fibre s'est fait pour sa stabilité de pointé et surtout la grande qualité de mode TEM_{00} donnée par la fibre permettant ainsi l'utilisation d'un faisceau limité par la diffraction et symétrique dans le plan de l'échantillon. D'autre part, la fibre permet de séparer l'unité laser du montage optique afin d'éviter toute vibration mécanique pouvant rajouter du bruit aux mesures.

On remarquera que l'alimentation de ce second laser possède un asservissement de la puissance des deux diodes de pompe. Une fraction de la puissance optique délivrée par celles-ci est prélevée et mesurée par une photodiode à l'entrée de la fibre afin d'assurer un pompage de la fibre stabilisé et ainsi d'avoir un faisceau en sortie de fibre stabilisé lui aussi en puissance.

Le choix de la longueur d'onde du laser est lié à l'influence du laser sur la viabilité de l'échantillon biologique. Une trop grande absorption de l'échantillon à la longueur d'onde utilisée entraînera un échauffement voire une dégradation du système biologique [29,30]. La figure 2.5 représente l'absorption de l'eau et de deux constituants du sang en fonction de la longueur d'onde. On y voit que pour la gamme spectrale autour de 1064nm l'influence du laser est modérée.

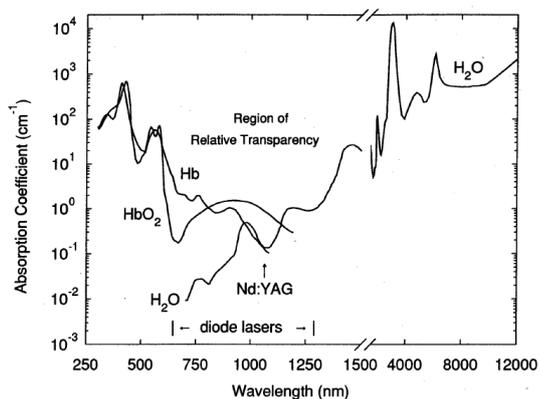


FIGURE 2.5 - Coefficient d'absorption d'échantillons biologiques et de l'eau dans le proche infrarouge (extrait de [90]). Hb et HbO₂ réfèrent à la déoxyhémoglobine et l'oxyhémoglobine présentes dans le sang.

2.2.1.2 L'objectif

Comme nous l'avons vu dans la partie théorique il est crucial pour être capable de piéger une bille que la force de gradient longitudinale soit plus élevée que celle due à la pression de radiation. Ceci peut être obtenu en focalisant un faisceau laser très fortement grâce à un objectif de microscope avec une grande ouverture numérique. L'objectif que nous utilisons est le même que celui dont nous nous servons pour nos expériences de TIRF à savoir un Apoplan Olympus avec une ouverture numérique de 1.45. Cela implique d'utiliser une huile à immersion (Fluka 10976 d'indice 1.512) entre l'objectif et l'échantillon afin de ne pas être limité à une ouverture numérique de 1 imposée par l'indice de l'air. On pourra noter que l'ouverture numérique de notre objectif est amplement suffisante pour des expériences de pince optique puisque le milieu biologique est généralement d'un indice proche de celui de l'eau soit environ 1.33. L'ouverture

numérique dans ce milieu ne sera alors pas de 1.45 mais d'une valeur au maximum égale à l'indice du milieu biologique.

Afin de bénéficier pleinement de l'ouverture numérique d'un objectif, il est important que la taille du faisceau recouvre la pupille de sortie. Des études ont démontré qu'une valeur comprise entre 0.67 et 1 pour le rapport entre le diamètre du waist du faisceau et celui de la pupille de sortie de l'objectif donnait de bonnes conditions de piégeage [92,96–98]. Pour connaître la taille optimale du waist à l'entrée de notre objectif, il a donc été nécessaire de déterminer le diamètre de la pupille de celui-ci, or nous pouvons le calculer à partir de son ouverture numérique et de sa focale. En effet la relation d'aplanétisme d'Abbe pour un système dont l'image est à l'infini s'écrit :

$$n_1 y \sin(\alpha) = \frac{\Phi_{PS}}{2} \theta' \quad (2.11)$$

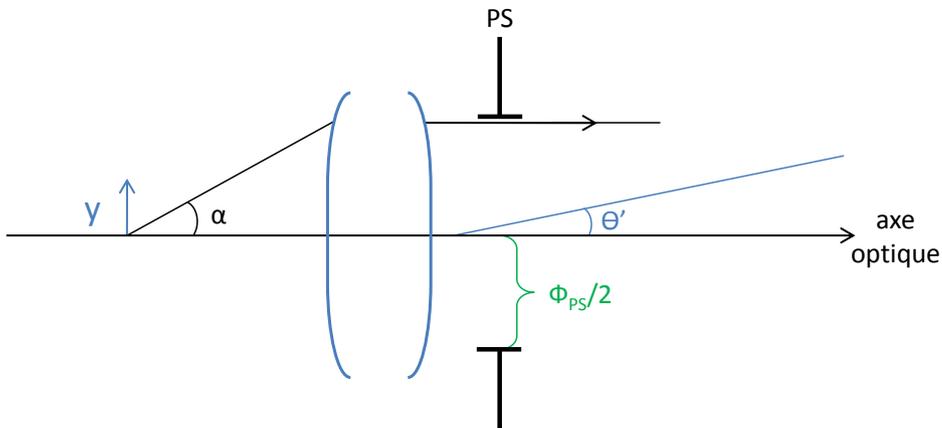


FIGURE 2.6 – Schéma de la relation d'aplanétisme d'Abbe pour un système dont l'image est à l'infini. θ' est le rayon angulaire de l'image de y par l'objectif, α le demi angle d'ouverture objet et Φ_{PS} le diamètre de la pupille de sortie du système optique.

Avec les notations de la figure 2.6, on a θ' le rayon angulaire de l'image de y par l'objectif, α le demi angle d'ouverture objet et Φ_{PS} le diamètre de la pupille de sortie du système optique. On a également les relations suivantes pour l'ouverture numérique ON et la focale f' de l'objectif de microscope :

$$ON = n_1 \sin(\alpha) \quad \text{et} \quad f' = \frac{y}{\theta'} \quad (2.12)$$

d'où la relation entre la pupille et la focale :

$$\Phi_{PS} = 2f'ON \quad (2.13)$$

Bien que les constructeurs ne donnent pas la focale de leurs objectifs, il est toutefois possible de l'estimer à partir de leur grandissement et de la focale de la lentille de tube. Pour les Olympus celle-ci est généralement de 180 mm, d'où pour notre objectif de grandissement $g_y = 60$ une focale de $f = 180/g_y = 3$ mm (Cette valeur est confirmée par la mesure donnée en annexe). La taille de la pupille de sortie de notre objectif est alors de 8.7 mm pour une ouverture numérique de 1.45, il nous faudra donc agrandir la taille de notre faisceau laser pour que son waist dans le plan de la pupille de l'objectif ait un diamètre égal ou légèrement inférieur à cette valeur (pour un rapport inférieur à 1 entre les diamètres du waist du faisceau et de la pupille de l'objectif, ou bien si l'on considère une ouverture numérique de l'objectif inférieure à 1.45).

2.2 Dispositif expérimental

2.2.1.3 Le montage optique

Le montage de la pince optique est schématisé avec le laser fibré sur la figure 2.7. Afin de manipuler la bille piégée il est possible de déplacer le piège par rapport à l'échantillon à l'aide d'un défecteur acousto-optique (noté DAO, MODEL DTD-274HA6, IntraAction Corp, défecteur double dont on n'a utilisé que le premier défecteur horizontal). Le faisceau laser, après passage dans le DAO, traverse trois télescopes jusqu'à son injection dans l'objectif de microscope. Comme il a été mentionné dans le paragraphe précédent, il est nécessaire pour bénéficier pleinement de l'ouverture numérique de l'objectif de recouvrir la pupille de celui-ci. Le diamètre du waist du faisceau étant de 3mm en sortie du collimateur de la fibre optique, un télescope de grandissement 175 : 500 a été placé après le DAO garantissant un waist du faisceau de 8.6 mm suffisante pour couvrir la pupille de l'objectif. On a choisi ici un rapport de 1 entre le waist du faisceau et le diamètre de la pupille de l'objectif (prise pour une ouverture numérique de 1.45). Un deuxième télescope 50 : 50 a ensuite été placé afin de contrôler la position du piège autour du plan focal de l'objectif en ajustant la distance entre les deux lentilles du télescope. Un dernier télescope 300 : 300 permet la combinaison du montage de pince optique avec celui de microscopie de fluorescence (TIRF) qui nécessite une lentille de focale 300mm pour focaliser le faisceau dans le plan focal arrière de l'objectif. Le DAO servant à effectuer une

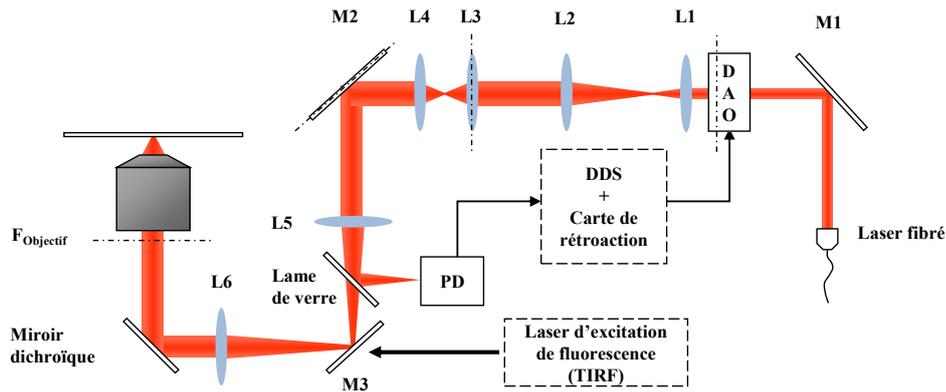


FIGURE 2.7 – Dispositif du piège optique. Le faisceau diffracté dans l'ordre -1 par le défecteur acousto optique (DAO) traverse 3 télescopes avant d'être focalisé dans le plan de l'échantillon. Le premier télescope (L_1, L_2) de focales 175 : 500 agrandit le faisceau pour suffisamment recouvrir la pupille de l'objectif. Le second télescope (L_3, L_4) de focales 50 : 50 permet, par une translation axiale de la première lentille, d'ajuster la position du piège autour du plan focal de l'objectif. Le dernier télescope (L_5, L_6) de focales 300 : 300 permet quant à lui de combiner les montages de pince optique et de fluorescence sur le même microscope. Une photodiode (PD) mesure une fraction de la puissance laser prélevée par une lame de verre insérée entre les deux lentilles du dernier télescope. Le signal mesuré par cette photodiode est ensuite utilisé pour rétroagir sur la puissance envoyée au DAO afin de stabiliser en puissance le faisceau diffracté. Les lignes pointillées représentent quant à elles les plans conjugués du montage, à savoir le DAO, la lentille L_3 , le miroir M_2 et le plan focal arrière de l'objectif F_{objectif} .

déviations angulaires du faisceau, une conjugaison appropriée doit être effectuée pour que cette déviation soit équivalente à une translation pure dans le plan de l'échantillon. Ceci est possible en conjuguant le défecteur avec le plan focal arrière de l'objectif comme décrit sur la figure 2.7. Finalement un miroir dichroïque (Chroma, z488/1064rpc) placé après le dernier télescope

permet de réfléchir le faisceau de pince vers l'objectif de microscope tout en laissant la possibilité d'exciter l'échantillon avec un faisceau laser à 488nm pour une combinaison éventuelle de la pince optique avec de la microscopie de fluorescence.

2.2.1.4 Le défecteur acousto-optique

L'utilisation d'un défecteur acousto-optique (DAO) permet dans notre montage de dévier la trajectoire de notre faisceau laser de manière contrôlée et ainsi de manipuler l'objet piégé dans un plan horizontal au niveau de l'échantillon. Bien que ces dispositifs apportent moins de précision et de stabilité que les défecteurs électro-optiques [99, 100], leur prix est généralement plus accessible et ils permettent d'effectuer des déplacements du piège plus importants. Ils présentent en plus par rapport aux miroirs galvanométriques un temps de réponse beaucoup plus court.

Les DAO sont basés sur l'injection d'une onde acoustique (typiquement des fréquences radio) dans un cristal créant ainsi une modulation d'indice. L'injection se fait par un transducteur piézoélectrique permettant la conversion d'une onde électrique en une onde acoustique. En envoyant un faisceau laser sur le cristal, celui-ci verra alors un matériau dont l'indice est modulé par la fréquence de l'onde acoustique injectée. Selon la longueur d'onde λ du faisceau laser ainsi que f et v la fréquence et la vitesse de l'onde acoustique dans le cristal, il en ressort un faisceau diffracté avec un angle θ par rapport au faisceau non diffracté dans l'ordre 0 :

$$\theta = \frac{m\lambda f}{v} \quad (2.14)$$

avec m l'ordre diffracté (... -2, -1, 0, 1, 2, ...). L'ordre -1 est ensuite isolé de l'ordre 0 et agrandi par les trois télescopes mentionnés précédemment. Connaissant les grossissements angulaires de ces derniers il est possible, à partir de la déviation angulaire $\Delta\theta$ introduite par le DAO, de remonter à la valeur de la translation du piège Δy qui sera effectuée dans le plan de l'échantillon :

$$\Delta y = f' \Delta\theta G_1 G_2 G_3 \quad (2.15)$$

avec Δy la translation effectuée dans le plan de l'échantillon, f' la focale de l'objectif (de valeur 3 mm déterminée dans la section Objectif), $\Delta\theta$ la déviation angulaire introduite par le défecteur acousto-optique et G_1, G_2, G_3 respectivement les grossissements des télescopes 1, 2 et 3 (de valeurs respectives 0.35, 1 et 1). La déflexion maximale de notre DAO étant de 26.9 mrad, on a alors accès à un déplacement maximal théorique de notre piège de 28.2 μm .

2.2.1.5 Calibration du déplacement du piège induit par le défecteur acousto optique à l'aide d'une bille piégée

On peut donner une estimation du facteur de calibration du DAO, à savoir le déplacement Δy effectué pour une variation de fréquence Δf reçue. En injectant la formule 2.14 dans 2.15 on trouve alors la relation :

$$\Delta y = f' \left(\frac{\lambda \Delta f}{v} G_1 G_2 G_3 \right) \quad (2.16)$$

Soit un facteur de calibration théorique de 1.82nm/kHz pour une vitesse de l'onde acoustique de 617m/s dans le cristal (Tellurium Dioxide) et une longueur d'onde de notre laser de $\lambda = 1069nm$.

2.2 Dispositif expérimental

Afin de connaître avec exactitude ce facteur de calibration nous l'avons déterminé expérimentalement. Pour ce faire, une rampe de fréquence, centrée sur 26.24MHz et de pas 10kHz, est envoyée au DAO et 16 images de la bille piégée sont enregistrées pour chaque pas de fréquence. Les détails sur l'éclairage de l'échantillon ainsi que sur la détection par caméra et le traitement des images sont donnés dans leurs rubriques respectives. En résumé, ces 16 acquisitions de 100ms par déplacement du piège sont moyennées puis filtrées et enfin binarisées avant de faire une détection du centre de la bille (plugin "detection particule" sous ImageJ). Les positions du centre de la bille données en pixels sont ensuite converties en nanomètres (à l'aide d'une calibration de la taille d'un pixel de la caméra en utilisant une mire graduée), puis tracées en fonction du pas de fréquence correspondant (figure 2.8). On obtient ainsi une relation linéaire

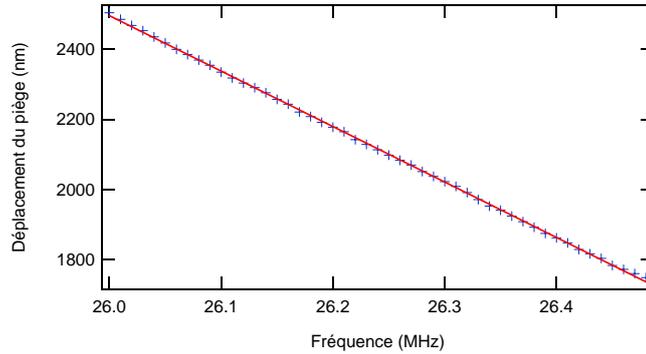


FIGURE 2.8 – Calibration du déflecteur acousto optique (DAO). Une rampe de fréquence, centrée sur 26.24MHz et de pas 10kHz, est envoyée au DAO et 16 images de la bille piégée sont enregistrées et moyennées pour chaque pas de fréquence. Un programme de détection détermine la position de la bille sur chaque image. La pente donnée par un ajustement linéaire du déplacement du piège en fonction de la fréquence envoyée au DAO correspond alors au facteur de calibration recherché, ici de 1.46 nm/kHz.

entre le déplacement du piège et la fréquence envoyée au DAO. La pente donnée par un ajustement linéaire correspond alors au facteur de calibration recherché, ici de 1.46 nm/kHz proche de celui donné par la théorie.

La génération des signaux électriques porteurs des fréquences radio est faite par une carte DDS (Direct Digital Synthesizer). Le signal est ensuite amplifié puis adressé au DAO. La communication entre la carte DDS et l'ordinateur est quant à elle faite via un séquenceur permettant la génération de séquences reproductibles.

La puissance du faisceau dans l'ordre diffracté dépendant de la puissance dans l'onde acoustique et de la fréquence acoustique, un asservissement a été mis en place pour garantir une même puissance dans le piège quelque soit sa position dans le plan de l'échantillon. Pour cela une fraction de la puissance laser est prélevée au niveau du dernier télescope et est utilisée comme consigne pour ajuster la puissance de l'onde acoustique injectée dans le DAO et ainsi garantir une puissance optique stable à l'entrée de l'objectif du microscope.

Le temps de réponse du DAO et donc du temps de déplacement du piège est quant à lui donné par le temps de traversée du faisceau par l'onde acoustique dans le cristal. Celui-ci est donné par la relation $T_r = 0.64D/v$, où T_r est l'intervalle de temps pour que l'intensité dans le faisceau passe de 10 à 90%, D est le diamètre du waist du faisceau laser et v la vitesse de

l'onde acoustique dans le cristal. Dans le cas d'utilisation du laser fibré, le diamètre du faisceau à l'entrée du DAO est de 3 mm, soit un temps de réponse calculé à partir de cette formule de $3\mu s$, suffisant pour les besoins de nos expériences.

2.2.2 Dispositif de l'éclairage et de la détection

Dans la section précédente nous avons décrit la partie "pince optique", à savoir le piégeage et la manipulation d'une bille micrométrique. Nous allons maintenant décrire la partie détection combinée au système d'éclairage de l'échantillon qui permet d'observer et de mesurer la position d'une bille piégée et de détecter et mesurer des forces. Le schéma de cette partie du montage est décrit dans la figure 2.9.

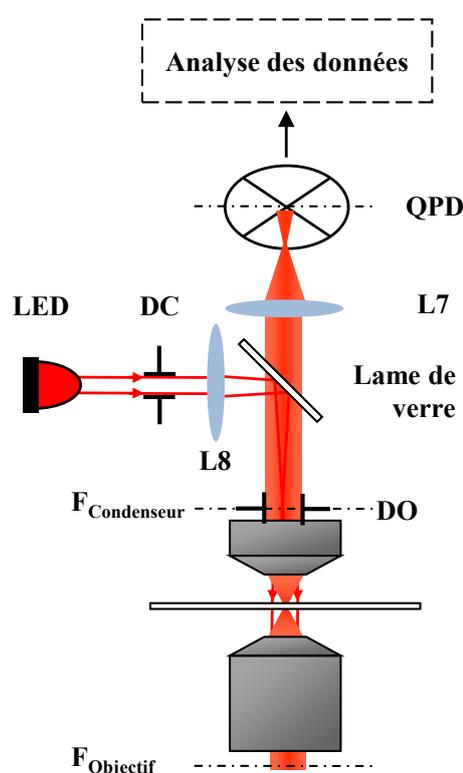


FIGURE 2.9 – Schéma du système de détection. La photodiode à quatre quadrants (QPD) et la diode électroluminescente (LED) sont conjuguées respectivement par les lentilles L7 et L8 (de focales 40 mm et 100 mm) avec le plan focal arrière du condenseur et de l'objectif. Le diaphragme de champ (DC) est quant à lui conjugué avec le plan de l'échantillon.

2.2.2.1 L'éclairage

Un bon système d'éclairage doit pouvoir permettre à l'utilisateur de bénéficier d'un éclairage uniforme de l'échantillon et de régler l'ouverture numérique de l'éclairage. Une méthode largement répandue consiste à faire un éclairage Köhler qui réalise les différentes conjugaisons suivantes :

2.2 Dispositif expérimental

- le diaphragme de champ (DC) de l'éclairage avec l'échantillon
- le diaphragme d'ouverture (DO) de l'éclairage avec la pupille d'entrée de l'objectif
- la source lumineuse avec le diaphragme d'ouverture

Les microscopes commerciaux possèdent un système d'éclairage pré-monté constitué généralement d'une lampe Halogène, d'un diaphragme de champ, d'un diaphragme d'ouverture situé dans le plan focal du condenseur, le tout permettant de faire l'éclairage Köhler. Ces systèmes ne proposent toutefois pas de solutions satisfaisantes pour y combiner un système de détection qui nécessite un condenseur avec une grande ouverture numérique, un détecteur de position du faisceau de pince ainsi qu'une source lumineuse "froide" pour ne pas créer de variation de température pouvant être gênante lors du déroulement d'une expérience.

Nous avons choisi de monter notre système d'éclairage et de détection sur une cage permettant d'y placer les différentes optiques souhaitées. La cage comporte deux voies, une pour l'éclairage et l'autre pour la détection avec une lame séparatrice permettant la recombinaison/séparation au niveau du condenseur. Dans notre cas, la partie éclairage est constituée d'une LED émettant à 685nm (JET-685-10, Roithner Lasertechnik), d'un diaphragme de champ (DC) et d'une lentille de focale $f = 100 \text{ mm}$ (L_8) permettant la conjugaison de la source lumineuse avec le diaphragme d'ouverture d'un condenseur à grande ouverture numérique (Olympus U-AAC, $ON = 1.4$) et du DC avec le plan de l'échantillon via L_8 et le condenseur.

2.2.2.2 La détection

Le système de détection de notre pince optique permet de connaître la position de l'objet piégé. Deux méthodes sont utilisées. L'une, par imagerie de la bille piégée sur une caméra, sert à calibrer les déplacements du piège effectués dans le plan de l'échantillon grâce au DAO. La seconde, où un signal interférométrique est mesuré dans le plan focal arrière du condenseur [101–103], revient à mesurer les déviations du faisceau par l'objet piégé à l'aide d'un détecteur de position. Elle sera utilisée pour connaître les fluctuations de position de la bille avec une bonne résolution spatiale et temporelle permettant de remonter aux grandeurs qui nous intéressent, à savoir la position relative de la bille par rapport au centre du piège et les forces exercées sur celle-ci.

Par caméra La caméra utilisée pour imager la bille à travers l'objectif de microscope est une Ueye (UI-2250SE-M) avec un capteur de 1600X1200 pixels de 4.4 μm de côté. Les billes utilisées lors de nos expériences ont un diamètre de l'ordre du micron tandis que l'objectif de microscope a un grossissement de 60X. L'image de la bille par l'objectif a alors une taille de 60 μm trop faible pour pouvoir déterminer une position avec une résolution satisfaisante. C'est pourquoi des optiques supplémentaires (Tube photo 1X-SPT, oculaire PE3.3X et Adaptateur video U-PMTV1X, Olympus) ont été rajoutées entre l'objectif et la caméra permettant ainsi d'avoir une image de la bille d'une taille théorique de 198 μm couvrant alors 54 pixels de côté sur la caméra. Pour déterminer la position du centre d'une bille, une image d'une durée de 100ms est acquise puis traitée de la façon suivante :

- l'image est rognée sur la zone d'intérêt de la bille
- le contraste est augmenté de 0.5%
- l'image est filtrée par un filtre gaussien de rayon 2 pixels
- la position du centre de la bille est détectée avec le plugin "Particule tracker" sous ImageJ

La position du centre de la bille étant alors connue en pixels, nous avons calibré la taille correspondant à un pixel de la caméra dans le plan de l'échantillon en utilisant une mire graduée

avec un pas de $10\ \mu\text{m}$ (figure 2.12). Nous avons sur notre montage un pixel pour $22.33\ \text{nm}$ dans le plan de l'échantillon.

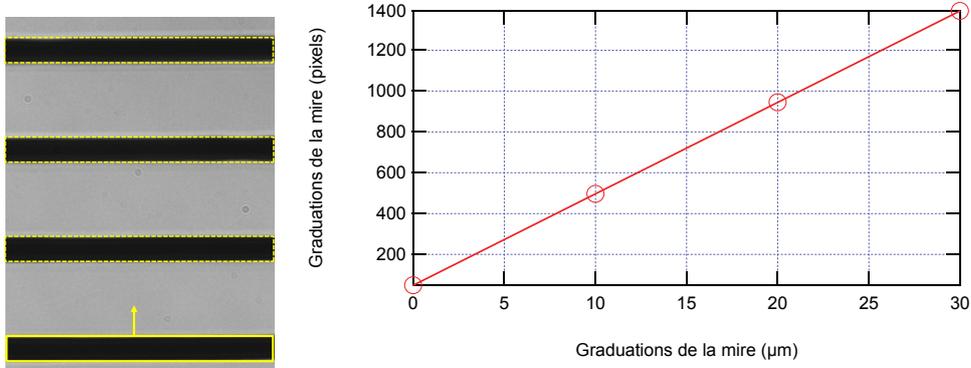


FIGURE 2.10 – Calibration de la taille des pixels de la caméra. A gauche : Traitement de l'image de la mire. Sous ImageJ un rectangle est superposé à l'image de la première graduation d'une mire de pas de $10\ \mu\text{m}$. Ce rectangle est ensuite translaté et pour chaque superposition du rectangle avec une graduation sa position en pixels est relevée. A droite : Position du rectangle en fonction de la graduation de la mire. On obtient une relation linéaire dont la pente permet de déterminer la taille dans le plan objet correspondant à un pixel de la camera, ici $22.33\ \text{nm}/\text{pixel}$.

Nous avons également cherché à déterminer la résolution spatiale de notre système de détection par caméra. Pour cela nous avons utilisé une bille de polystyrène de diamètre $1\ \mu\text{m}$ collée à la surface de l'échantillon. En utilisant la platine piézoélectrique (NanoView 3 axes, Mad City Labs) nous avons fait faire à l'échantillon des pas de 20, 10 et $5\ \text{nm}$ avec, entre chaque pas, des temps de pause suffisamment longs pour pouvoir prendre 32 images de la bille collée (chaque image étant elle-même une moyenne de 10 images de 100 ms). Les positions du centre de la bille alors obtenues après analyse sous ImageJ, tracées en fonction du numéro de l'image, montrent que la résolution spatiale avec cette méthode est limitée à $\approx 5\ \text{nm}$ (figure 2.11).

Par photodiode à quatre quadrants Après son passage dans l'échantillon, le faisceau de pince est collecté par un condenseur à grande ouverture numérique et envoyé sur une photodiode à quatre quadrants (QPD). Les déplacements de la bille par rapport au centre du piège dévient le faisceau et ces déviations peuvent alors être mesurées par le détecteur de position. Toutefois cette configuration est sensible à des dérives éventuelles du faisceau de pince. En positionnant les optiques de la détection de façon à ce que la QPD soit positionnée dans un plan conjugué du plan focal arrière du condenseur, il est alors possible de ne mesurer que la position relative de la bille par rapport au piège (figure 2.12). C'est cette configuration qui est adoptée sur notre montage.

Le plan focal arrière du condenseur n'étant pas physiquement accessible, une lentille supplémentaire (L7 sur la figure 2.9) de focale $f = 40\ \text{mm}$ permet d'imager celui-ci sur la photodiode à quatre quadrants. Les quatre signaux de notre photodiode (SPOT-9DMI, OSI Optoelectronics) sont numérisés à $65536\ \text{Hz}$ en utilisant une carte Delta Sigma DAC (National Instrument, PCI 4474) et exploités sous Labview 8.2 de la façon décrite sur la figure 2.13. Normaliser les signaux par la somme des quadrants permet de s'affranchir de l'instabilité de puissance du

2.2 Dispositif expérimental

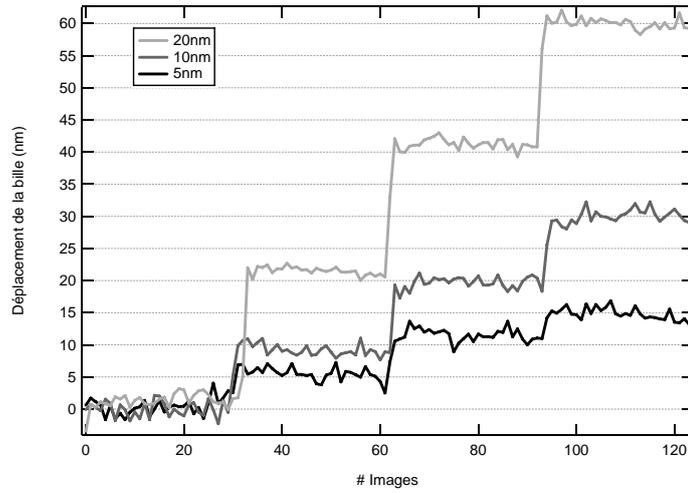


FIGURE 2.11 – Résolution de la détection par caméra. Une bille de polystyrène de diamètre $1\ \mu\text{m}$ est collée à la surface de l'échantillon puis, en utilisant la platine piézoélectrique, l'échantillon est déplacé par pas de 20, 10 ou 5 nm. Des temps de pause suffisamment longs sont imposés entre chaque pas afin de prendre 32 images de la bille collée (chaque image étant elle-même une moyenne de 10 images de 100 ms). Ces images sont ensuite analysées sous ImageJ pour déterminer la position du centre de la bille. On voit ici que les pas de 5 nm sont encore résolus.

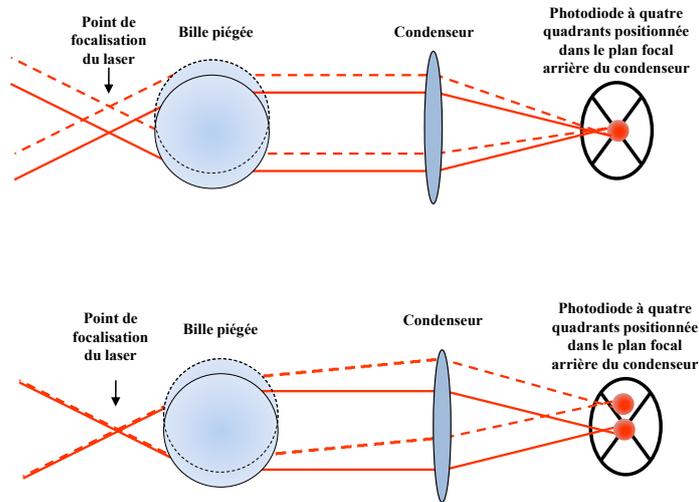
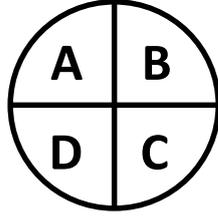


FIGURE 2.12 – La photodiode à quatre quadrants positionnée dans un plan conjugué du plan focal arrière du condensenseur ne mesure que les déviations du faisceau par la bille et n'est pas sensible à une translation du piège.

faisceau de pince. Dans M. W. Allersma et al. [103], les auteurs montrent que dans le régime de Rayleigh la réponse de la QPD en fonction du déplacement de la bille dans le piège n'est linéaire que sur une gamme de déplacements limitée. Pour une déviation du faisceau par la



$$\mathbf{S} = \mathbf{A} + \mathbf{B} + \mathbf{C} + \mathbf{D}$$

$$X = \frac{(A + D) - (C + B)}{S}$$

$$Y = \frac{(A + B) - (C + D)}{S}$$

FIGURE 2.13 – Analyse du signal de la photodiode à quatre quadrants. X et Y mesurent la déviation du faisceau de pince par la bille suivant deux directions perpendiculaires. S mesure les variations d'intensité du faisceau. A noter que X et Y étant normalisés par S pour s'affranchir des fluctuations d'intensité totale, ils sont sans unité ($\Delta\text{Volts}/\text{Volts}$).

bille dans la direction X , l'expression théorique de la réponse du détecteur est donnée par :

$$X \cong \frac{16}{\sqrt{\pi}} \frac{k\alpha}{w^2} (x/w) e^{-(x/w)^2} \quad (2.17)$$

où k est le vecteur d'onde, x le déplacement de la bille par rapport au centre du piège, w la taille du faisceau dans le plan focal et α la susceptibilité diélectrique de la bille de rayon r qui s'exprime comme :

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

On voit alors que le rapport signal sur bruit sera d'autant meilleur que le diamètre de la bille sera grand (cette prédiction n'est cependant valable que dans le cas où $2r < \lambda$), mais aussi que la différence d'indice entre la bille et le milieu sera important (figure 2.14). On voit également à partir de cette équation que la zone linéaire de détection diminue en même temps que la taille du faisceau dans le plan de focalisation. Choisir une grande ouverture numérique pour optimiser l'efficacité de piégeage se fera donc au détriment de la zone de linéarité de la détection. Nous avons fait le calcul de la sensibilité requise pour détecter un déplacement de 1nm pour une bille de silice de diamètre $0.5 \mu\text{m}$. Le rayon du faisceau dans le plan de focalisation est limité par la diffraction $w = 0.61\lambda/ON$ avec ON l'ouverture numérique de l'objectif, soit dans notre cas $482 \mu\text{m}$ si l'on considère que l'on piège dans un milieu d'indice proche de celui de l'eau ($n_m = 1.33$). On trouve alors une sensibilité requise de $4 \cdot 10^{-4}$ soit 4mV si le signal total représente 10V sur la photodiode à quatre quadrants. Cependant ceci représente la situation la plus critique dans laquelle nous pouvons nous trouver puisque nous travaillerons plutôt avec des billes de polystyrène de diamètre $1 \mu\text{m}$, ce qui augmente le rapport signal sur bruit. Il est aussi à noter qu'augmenter le diamètre de la bille au-delà de la longueur d'onde n'apportera plus au rapport signal sur bruit. Allersma rapporte que dans le régime de Mie le signal varie alors en $1/2r$ [103].

Afin de ne pas être limités par l'échantillonnage de l'acquisition, après que les courants issus

2.3 Calibrations séparées de la raideur du piège, de la sensibilité du détecteur et de la position axiale de la bille piégée

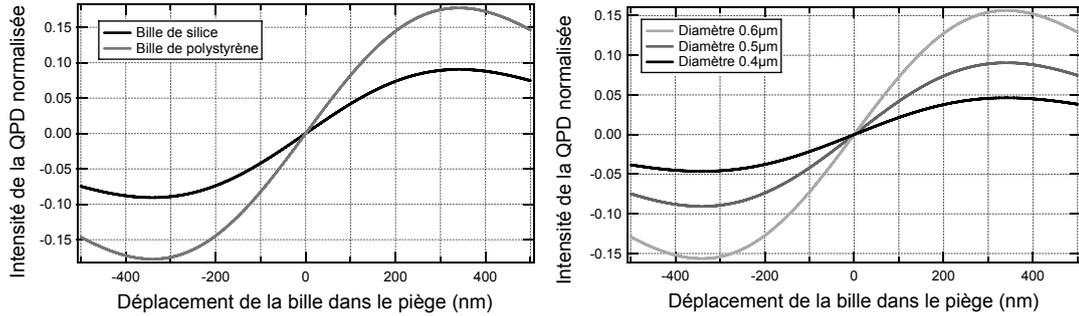


FIGURE 2.14 – Réponse du détecteur pour un déplacement donné de la bille piégée. A gauche : réponse du détecteur pour une bille de polystyrène ($n_b = 1.57$) et de silice ($n_b = 1.45$), chacune de diamètre $0.5 \mu\text{m}$. A droite : réponse du détecteur pour des billes de silice de diamètres différents.

de la QPD sont amplifiés et convertis en tensions, ceux-ci sont numérisés par une carte d'acquisition 24bits à 4voies (NI PCI-4474, National Instruments). Chaque voie possède une plage de tension de $\pm 10 \text{ V}$ soit une résolution maximale de $20\text{V}/2^{24} = 1.2 \mu\text{V}$ suffisante pour ne pas limiter la résolution de notre détection.

Enfin une dernière remarque doit être faite quant au fait d'utiliser un laser émettant à 1069 nm avec un détecteur en silicium, comme c'est le cas de notre photodiode à quatre quadrants. Berg-Sørensen et al. [104] ont analysé la réponse temporelle de détecteurs en silicium en fonction de la longueur d'onde. Ils ont montré que la transparence du silicium à 1064 nm introduit un retard dans la réponse temporelle du détecteur dû aux porteurs de charges créés dans la zone dopée n de celui-ci, alors détectés avec une échelle de temps de la microseconde, au lieu de la zone de déplétion où ils sont détectés avec une échelle de temps de l'ordre de la nanoseconde. Ce retard sera alors traduit par un effet de filtre passe-bas de notre détecteur (typiquement entre 5 et 10 kHz de fréquence de coupure), qui devra être pris en compte lors de l'analyse du mouvement de la bille dans notre piège, lorsque la fréquence de coupure de celui-ci est du même ordre de grandeur que celle du détecteur.

2.3 Calibrations séparées de la raideur du piège, de la sensibilité du détecteur et de la position axiale de la bille piégée

En positionnant notre détecteur dans un plan conjugué du plan focal arrière du condenseur, nous sommes donc capables de connaître la position de la bille dans le piège par une mesure en $\Delta\text{Volts}/\text{Volts}$ de la déviation du faisceau. Afin d'en déduire les grandeurs qui nous intéressent, à savoir la force exercée sur la bille en Newton et sa position relative par rapport au centre du piège en nanomètres, il convient d'identifier dans un premier temps les autres forces qui s'appliquent à la bille piégée et de caractériser son mouvement. Nous proposerons ensuite deux approches classiques d'analyse du mouvement de la bille piégée pour déterminer la raideur du piège, ainsi que deux autres méthodes pour calibrer la sensibilité de la détection permettant de convertir en nanomètres la position mesurée en $\Delta\text{Volts}/\text{Volts}$ par notre détecteur. Dans la section suivante de ce chapitre nous proposerons une alternative à ces méthodes de calibration, publiée dans [1], permettant de déterminer simultanément la raideur du piège et la sensibilité

de la détection.

2.3.1 Mouvement d'une bille piégée

Une bille micrométrique piégée par un faisceau de pince (qui sera assimilé par la suite à un potentiel harmonique) est soumise à différentes forces :

- Une force de rappel du piège qui s'exprime comme le produit de la raideur du piège κ par le déplacement de la bille par rapport à sa position d'équilibre x : $F_r = \kappa x$,
- Une force due à la viscosité du milieu qui s'exprime comme le produit du coefficient de friction γ du milieu par la vitesse de la bille $\dot{x}(t)$: $F_v = \gamma \dot{x}(t)$,
- Une force due à l'énergie thermique s'écrivant, avec T la température en Kelvin et k_B la constante de Boltzmann : $F_T = (2k_B T \gamma)^{\frac{1}{2}} \alpha(t)$ (en utilisant $\langle \alpha(t) \rangle = 0$ et $\langle \alpha(t) \alpha(t') \rangle = \delta(t - t')$),
- Une force d'inertie qui est le produit de la masse m de la bille par son accélération $\ddot{x}(t)$: $F_i = m \ddot{x}(t)$.

Ces différentes forces sont à l'origine du mouvement de la bille piégée dans le potentiel harmonique qui peut alors être décrit par l'équation de Langevin :

$$F_r + F_v + F_i = F_T \quad (2.18)$$

Cependant le nombre de Reynolds pour une bille de taille micrométrique dans l'eau est faible ce qui signifie que les forces d'inertie sur la bille sont négligeables. On a également négligé les forces de gravité sur des échelles de temps courtes puisque la masse de la bille est faible et sa densité proche de celle du milieu.

En écrivant la fréquence de coupure du piège $f_c = \kappa / (2\pi\gamma)$, ainsi que la constante de diffusion $D = k_B T / \gamma$, on peut alors écrire l'équation du mouvement de la bille piégée sous la forme :

$$\dot{x}(t) + 2\pi f_c x(t) = (2D)^{\frac{1}{2}} \alpha(t) \quad (2.19)$$

On voit par cette équation qu'à partir des fluctuations de position de la bille il est possible de connaître la fréquence de coupure du piège. La raideur du piège pourra en être déduite connaissant le coefficient de friction dû au milieu γ . A noter que celui-ci est différent du coefficient de friction γ_0 de la solution lorsque la bille piégée est proche de la surface. La connaissance de γ peut être obtenue à partir du coefficient de diffusion de la bille ou bien en utilisant la loi de Faxen. Cette dernière permet de calculer γ connaissant la hauteur, h , du centre de la bille par rapport à la surface, la viscosité de la solution loin de la surface η (approximée à celle de l'eau), le rayon de la bille r (donné par le fabricant avec une dispersion de 10-15%) :

$$\gamma = \frac{6\pi\eta r}{1 - \frac{9}{16} \frac{r}{h} + \frac{1}{8} \left(\frac{r}{h}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{r}{h}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{r}{h}\right)^5} \quad (2.20)$$

avec $\gamma_0 = 6\pi\eta r$ le coefficient de friction du milieu loin de la surface.

Sur la figure 2.15, on voit que pour une bille de diamètre $1\mu m$ le coefficient de friction change drastiquement lorsque la distance à la surface est inférieure à $2\mu m$. Si celui-ci ne peut être obtenu à partir du coefficient de diffusion de la bille, il convient donc pour calibrer la raideur du piège de déterminer également la position axiale de la bille piégée.

2.3 Calibrations séparées de la raideur du piège, de la sensibilité du détecteur et de la position axiale de la bille piégée

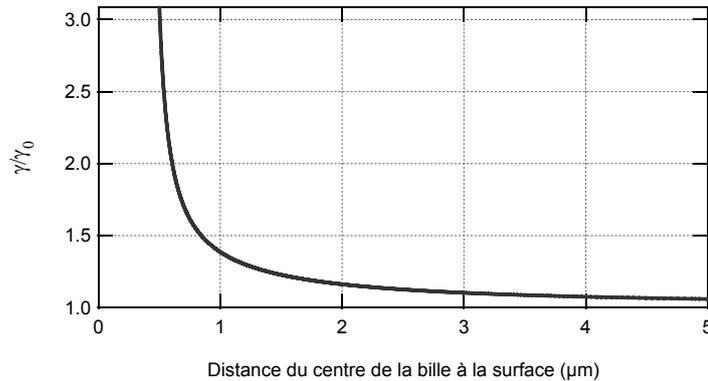


FIGURE 2.15 – Variation du coefficient de friction normalisé sur une bille de diamètre $1 \mu\text{m}$ en fonction de sa distance à la surface.

2.3.2 Détermination de la raideur du piège

2.3.2.1 Théorème d'équipartition

Le mouvement brownien d'une particule possède une distribution d'énergie exponentielle définie par la loi de Boltzmann : $P = e^{-\frac{E}{k_B T}}$. En supposant que le potentiel E du piège est harmonique, la distribution des positions de la bille piégée au cours du temps doit alors suivre une loi gaussienne dont la largeur est définie par la température et la raideur du piège. D'après

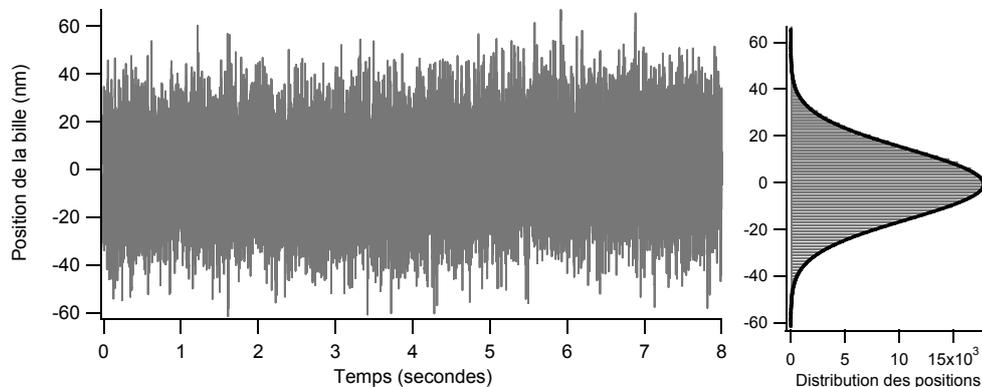


FIGURE 2.16 – A gauche : Mouvement brownien d'une bille de silice de diamètre $1 \mu\text{m}$ piégée avec le laser Nd :YAG. A droite : distribution des positions de la bille piégée (histogrammes) et son ajustement gaussien (trait plein). L'ajustement nous donne une variance de 21.28 nm^2 pour les fluctuations de position de la bille piégée soit, en utilisant le théorème d'équipartition, une raideur de 0.019 pN/nm .

le théorème d'équipartition, chaque terme quadratique dans l'expression de l'énergie donne une contribution de $\frac{1}{2}k_B T$ à l'énergie totale. On peut donc relier la raideur du piège à la variance des fluctuations de position de la bille dans le piège par :

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}\kappa \langle x^2 \rangle \quad (2.21)$$

On a alors une relation directe entre les fluctuations de position de la bille et la raideur du piège ne faisant intervenir que la température du milieu et la constante de Boltzmann. Plus la raideur du piège sera élevée et plus les fluctuations de position de la bille piégée seront faibles. Toutefois, bien que cette méthode soit aisée à mettre en place, elle présente quelques défauts. D'une part l'expression donnée n'est valable que dans le cas où le piège peut être assimilé à un potentiel harmonique ce qui n'est pas vrai sur les bords du piège. D'autre part, cette méthode requiert au préalable une calibration de la sensibilité du détecteur puisque les fluctuations de position de la bille doivent être connues en nanomètres et non en $\Delta Volts/Volts$. Une erreur dans la calibration du détecteur se verra élevée au carré dans la mesure de la variance. Il en va de même pour une faible dérive, par exemple du détecteur par rapport au piège, qui impliquera une sur-estimation de la variance et donc une sous-estimation de la raideur du piège.

2.3.2.2 Densité spectrale de puissance

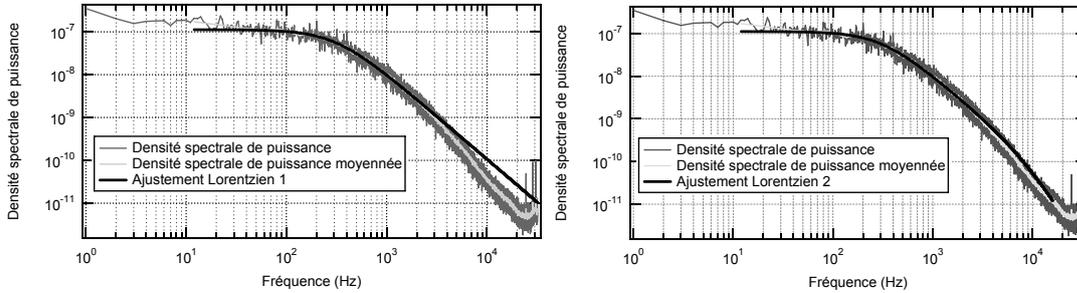


FIGURE 2.17 – Densité spectrale de puissance de la position d'une bille piégée de silice et de diamètre $1 \mu\text{m}$ avec le laser Nd :YAG. Les données sont moyennées et ajustées sur le graphique de gauche par l'équation 2.22 et sur le graphique de droite par l'équation 2.23 prenant en compte la fréquence de coupure de la QPD. La fréquence de coupure du piège obtenue dans le premier cas est de $307 \pm 2 \text{ Hz}$ et de $309 \pm 2 \text{ Hz}$ dans le second cas avec en plus une fréquence de coupure de la détection de $10 \pm 4 \text{ kHz}$. Cette dernière valeur est cohérente avec celles obtenues par les auteurs dans [105].

A partir de l'équation du mouvement de la bille il est possible d'écrire la densité spectrale de puissance de la position de la bille dans le piège qui peut être approximée par une Lorentzienne [105] :

$$P(f) = \frac{D}{2\pi^2(f^2 + f_c^2)} \quad (2.22)$$

La raideur du piège est alors reliée à la fréquence de coupure par $f_c = \kappa/(2\pi\gamma)$. Cette raideur peut donc être déterminée à partir d'un ajustement de la courbe expérimentale par la théorie, à condition de connaître le coefficient de friction γ du milieu qui dépend de la distance de la bille piégée à la surface.

Afin de prendre en compte l'effet de filtrage des hautes fréquences imposé par les détecteurs en silicium travaillant dans l'infrarouge, Berg-Sørensen et al. [105] ont rajouté à l'équation 2.22 un terme prenant en compte la fréquence de coupure f_d du détecteur :

$$P(f) = \frac{D}{2\pi^2(f^2 + f_c^2)} \frac{f_d^2}{(f^2 + f_d^2)} \quad (2.23)$$

2.3 Calibrations séparées de la raideur du piège, de la sensibilité du détecteur et de la position axiale de la bille piégée

C'est donc l'équation que nous utiliserons pour ajuster nos données expérimentales (voir figure 2.17).

2.3.3 Détermination de la sensibilité du détecteur

Le déplacement de la bille par rapport à sa position d'équilibre dans le piège est mesuré par notre détecteur en $\Delta Volts/Volts$. Il convient donc de calibrer la sensibilité de la détection, à savoir le facteur de conversion en $\frac{\Delta Volts}{Volts}/nm$. Deux méthodes couramment utilisées sont décrites ci-après.

2.3.3.1 Technique de la bille collée

La technique de la bille collée consiste à effectuer un balayage d'une bille collée à la surface par rapport au faisceau et à mesurer en $\frac{\Delta volts}{Volts}$ les déviations du faisceau correspondantes [102]. Pour cela une bille est piégée dans l'échantillon et ramenée près de la surface afin qu'elle s'y colle non spécifiquement. Une fois la bille immobilisée il est possible en utilisant une platine piézoélectrique de balayer avec la bille la largeur du faisceau de piège d'une quantité connue tout en mesurant la déviation du faisceau sur la photodiode à quatre quadrants. Pour des déplacements de la bille suffisamment faibles une relation linéaire existe entre le déplacement de la bille et la déviation mesurée avec la QPD. En effectuant un ajustement linéaire de cette portion de la courbe on peut alors déterminer la sensibilité du détecteur (figure 2.18).

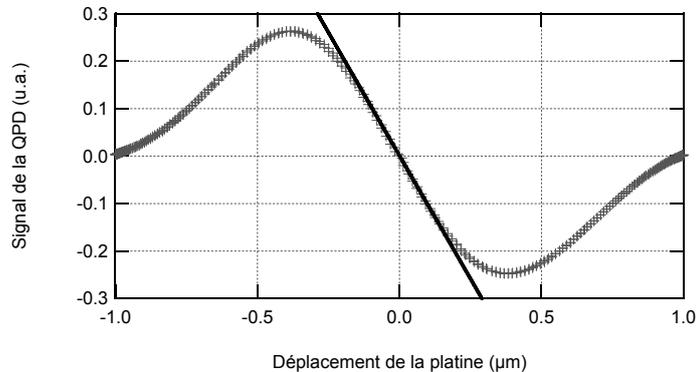


FIGURE 2.18 – Balayage du faisceau laser (laser fibré) avec une bille collée à la surface. La bille est en polystyrène et son diamètre est de $1 \mu m$. Pour chaque position de la bille la déviation du faisceau laser est mesurée par la QPD. La sensibilité du détecteur est alors donnée par la pente de la zone linéaire de la courbe obtenue, soit ici $1.04 \mu m^{-1}$.

Cependant cette calibration reste approximative. En effet la position axiale de la bille par rapport au faisceau est difficilement contrôlable et n'est pas rigoureusement la même que celle de la bille piégée dans les conditions d'une expérience. De plus il est souvent difficile d'immobiliser une bille sur la surface puisque lors des expériences des agents passivants sont utilisés afin d'éviter justement les interactions non-spécifiques entre les billes et la surface. A cela se rajoute le fait que la bille fixée à la surface n'est alors plus utilisable pour d'autres mesures. Enfin, la réponse du détecteur dépendant de la taille de la bille piégée, qui varie pour des billes d'un même stock (typiquement 10%), il est souvent préférable de faire cette calibration sur un

ensemble de billes et de déterminer la valeur moyenne obtenue pour la sensibilité du détecteur.

2.3.3.2 Densité spectrale de puissance

La sensibilité du système de détection peut être déterminée à partir de la densité spectrale de puissance de la position de la bille piégée [103]. En multipliant celle-ci par la fréquence au carré et pour $f \gg f_c$, la courbe atteint alors un plateau P^V dont la valeur est obtenue en $(\frac{\Delta V_{Volts}}{V_{Volts}})^2 \cdot Hz$ (voir figure 2.19). Or l'expression théorique de ce plateau P^m , en $(metres)^2 \cdot Hz$, est donnée par :

$$P^m = \frac{P^V}{\beta^2} = \frac{D}{2\pi^2} \quad (2.24)$$

En développant D on trouve alors l'expression de la sensibilité du détecteur en $\frac{\Delta V_{Volts}}{V_{Volts}}/m$:

$$\beta = \sqrt{\frac{P^V 12\pi^3 \eta r}{k_B T}} \quad (2.25)$$

avec r le rayon de la bille et η la viscosité du milieu à la hauteur de la bille par rapport à la surface. On notera toutefois que cette méthode implique une calibration de la position axiale du piège et qu'elle est peu compatible avec des pièges de fortes raideurs : la largeur du plateau devient alors plus petite et il est plus difficile de déterminer sa valeur.

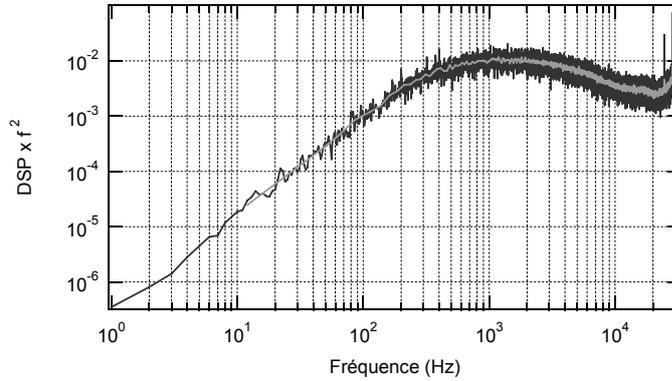


FIGURE 2.19 – Densité spectrale de puissance de la position d'une bille piégée avec le laser Nd : YAG, multipliée par la fréquence élevée au carré. On voit alors apparaître un plateau pour des fréquences supérieures à la fréquence de coupure du piège. En utilisant la formule 2.25 et connaissant le rayon de la bille $r = 0.5 \mu m$, la viscosité du milieu $\eta = 10^{-3} Pa.s$ et un plateau de $0.01(\frac{\Delta V_{Volts}}{V_{Volts}})^2 \cdot Hz$, on détermine une sensibilité du détecteur de $0.67 \mu m^{-1}$.

2.3.4 Détermination de la position axiale de la bille piégée

Souvent lors des expériences de spectroscopie de force en molécule unique il est nécessaire de connaître la position axiale de la bille piégée par rapport à la surface. D'une part, lorsque les forces appliquées avec la pince se font sur un système biologique attaché à la surface il est nécessaire de prendre en compte l'angle avec lequel on applique ces forces et d'autre part, la connaissance de la distance séparant la bille de la surface permet de prendre en compte dans

2.3 Calibrations séparées de la raideur du piège, de la sensibilité du détecteur et de la position axiale de la bille piégée

la calibration du piège les changements de viscosité et donc des forces de friction (voir figure 2.15). Il convient donc pour calibrer la raideur du piège, qui dépend du coefficient de friction du milieu, de déterminer également la position axiale de la bille.

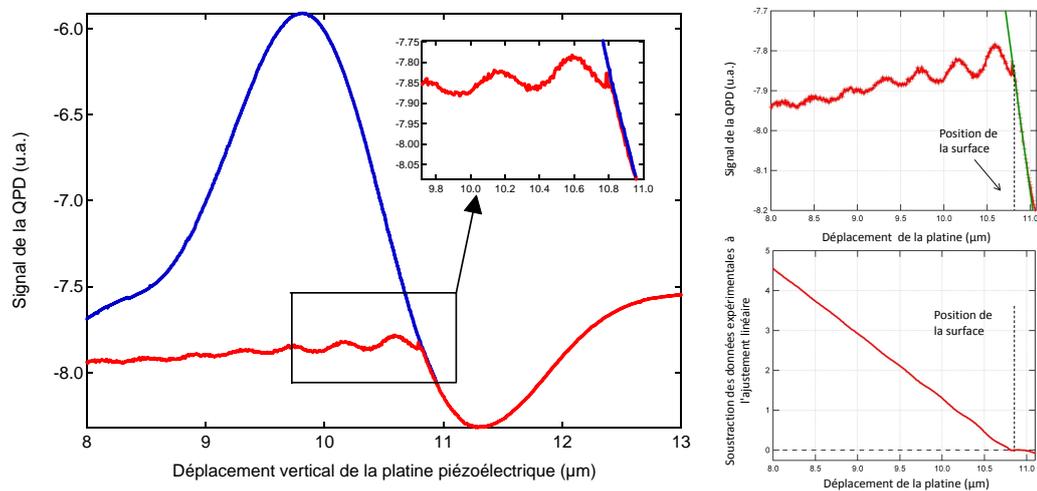


FIGURE 2.20 – Détermination de la hauteur d’une bille piégée de polystyrène de diamètre $1\ \mu\text{m}$. La platine est traduite verticalement pour s’approcher de la bille tout en mesurant le signal somme de la QPD. A gauche : mesure faite avec une bille piégée (courbe rouge) superposée à celle de cette même bille collée non spécifiquement à la surface (courbe bleue). Pour des déplacements de la platine proches du point de contact entre la bille et la surface, la courbe de la bille collée peut être approximée à une droite. En haut à droite : en vert l’ajustement de la chute linéaire de l’intensité mesurée après que la bille piégée rentre en contact avec la surface. En bas à droite : soustraction des données expérimentales à cet ajustement linéaire permettant de localiser la position de la surface sur la platine. La formule 2.26 nous permet ensuite de déterminer la hauteur initiale de la bille piégée, ici de $2.47\ \mu\text{m}$.

L’approche adoptée ici consiste à détecter les variations d’intensité totale (somme des quadrants de la QPD) causées par les interférences entre le faisceau réfracté par la bille et ceux réfléchis entre la bille et la surface de la lamelle [100,106,107]. En balayant la distance surface-bille avec la platine piézoélectrique, on mesure des oscillations de l’intensité modulées par ces interférences (figure 2.20). Lorsque la surface rentre en contact avec la bille on observe une rupture des oscillations suivie d’une décroissance linéaire de l’intensité. Pour identifier ce point de contact entre la bille et la surface sur nos courbes expérimentales, nous avons effectué cette mesure avec la même bille cette fois-ci collée non spécifiquement à la surface (courbe bleue de la figure 2.20). Pour des déplacements proches du point de contact on remarque que la courbe de la bille collée peut être approximée à une droite. Ce point de contact entre la bille et la surface peut donc être identifié en soustrayant la courbe expérimentale à l’ajustement de la portion linéaire, la première valeur négative correspond alors à la position de la platine pour laquelle la surface touche la bille. Cette position nous permet ensuite de déterminer la distance qui sépare la bille de la surface moyennant un facteur correctif. En effet, à cause de la différence d’indice entre la lamelle et le milieu dans lequel se trouve la bille, il existe un décalage de la position du waist du faisceau de pince et donc de la position axiale de la bille par rapport au plan focal de l’objectif. Ce décalage, qui varie pendant le balayage de la distance surface-bille avec la platine

piézoélectrique, doit donc être pris en compte puisque le déplacement effectué avec la platine, h_{piezo} , entre sa position initiale et le moment où elle rencontre la bille ne correspond pas à la distance réelle séparant la bille de la surface, h_{bille} . La hauteur de la bille est alors donnée par :

$$h_{bille} = \frac{n_m}{n_v} h_{piezo} - r \quad (2.26)$$

avec n_m l'indice du milieu ($n_m \approx 1.33$), n_v celui de la lamelle ($n_v = 1.512$) et r le rayon de la bille.

2.4 Calibration simultanée de la raideur du piège et de la sensibilité du détecteur

Comme on vient de le voir il n'est pas aisé de trouver une méthode de calibration qui permette de connaître simultanément la raideur du piège et la sensibilité du détecteur. Le plus souvent deux méthodes complémentaires sont utilisées ce qui rallonge considérablement la durée des expériences. D'autres méthodes ont été proposées pour calibrer simultanément ou rapidement les deux paramètres de calibration recherchés en utilisant une platine piézoélectrique plus rapide [101] ou bien un second laser de détection [108]. Nous avons mis au point une alternative à ces méthodes basée sur l'analyse de la réponse impulsionnelle de notre QPD pour un déplacement rapide de la bille par rapport au piège, ce qui a donné lieu à une publication [1].

Comme mentionné dans la partie descriptive du montage, un déflecteur acousto optique est placé dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif permettant ainsi de déplacer notre piège dans un plan horizontal. En déplaçant le piège rapidement la bille retournera dans sa nouvelle position d'équilibre avec un temps de réponse qui dépend de la raideur du piège et de la viscosité du milieu.

$$X(t) = X_0 e^{-t/t_b} \quad (2.27)$$

où $X(t)$ est le déplacement de la bille par rapport au centre du piège en fonction du temps, X_0 le déplacement initial du piège, et $t_b = \gamma/\kappa$ le temps de réponse de la bille avec γ le coefficient de friction du milieu et κ la raideur du piège.

On a vu que le temps de réponse du DAO était limité par la taille du faisceau dans le cristal et par la vitesse de l'onde acoustique dans ce dernier, soit un temps de réponse de $1.6 \mu s$ pour les mesures faites ici avec le laser Nd :YAG. Il est donc minime par rapport au temps de réponse de la bille (typiquement de quelques centaines de microsecondes à quelques dizaines de millisecondes selon la raideur du piège). Ce temps de déplacement du piège étant négligeable, la bille ne peut pas suivre instantanément et dévie le faisceau sur la QPD, permettant ainsi de calibrer la sensibilité de notre détection, connaissant le déplacement du piège X_0 .

Cependant l'équation 2.27 ne permet pas de faire un ajustement sur les données expérimentales dû au fait que notre détecteur en Silicium possède un temps de réponse limité à la longueur d'onde de notre laser. Berg-Sørensen et al. [104] proposent d'exprimer la réponse temporelle du détecteur sous la forme de deux termes, selon que les porteurs de charges sont détectés rapidement ou non :

$$g(t) = \alpha \delta(t) + (1 - \alpha) \frac{1}{t_d} e^{-t/t_d} \quad (2.28)$$

avec α la fraction de porteurs de charge créés dans la zone de déplétion, t_d le temps de réponse de la QPD pour les porteurs de charge créés dans la zone dopée négativement. Le temps de

2.4 Calibration simultanée de la raideur du piège et de la sensibilité du détecteur

réponse de la bille lors d'un déplacement du piège est donnée par la convolution de $X(t)$ et $g(t)$:

$$S(t) = \int_0^t X(t)g(t-t')dt = X_0 \alpha e^{-t/t_b} + X_0 (1-\alpha) \frac{t_b}{t_b-t_d} \left(e^{-t/t_b} - e^{-t/t_d} \right) \quad (2.29)$$

Cette équation permet alors d'effectuer un ajustement de la réponse impulsionnelle de notre QPD obtenue expérimentalement pour un déplacement ici de $X_0 = 77 \text{ nm}$ du piège. Le signal de la QPD étant normalisé par le signal somme des quadrants la valeur obtenue de la sensibilité du détecteur est en $\frac{\Delta \text{Volts}}{\text{Volts}} / \mu\text{m}$, noté par la suite μm^{-1} . La raideur du piège est quant à elle déterminée en N/m connaissant le coefficient de friction du milieu.

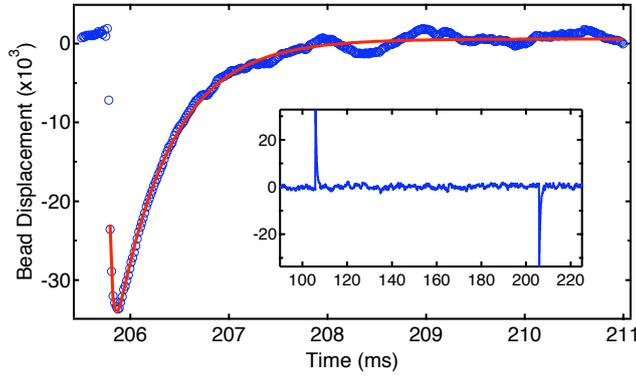


FIGURE 2.21 – Réponse impulsionnelle de la QPD (sans unité) pour un déplacement de 77 nm du piège avec une bille de silice de diamètre 1 μm piégée avec le laser Nd : YAG. Le déplacement est répété 100 fois et le signal de la QPD (cercles) est moyenné avant d'être ajusté par l'équation 2.29 (courbe). L'encart montre le signal total mesuré par la QPD pour un aller et un retour du piège à sa position initiale. La fenêtre principale montre un zoom du second pic ajusté par l'équation 2.29. Les paramètres obtenus par l'ajustement donnent une calibration du détecteur de $0.515 \mu\text{m}^{-1}$, une fréquence de coupure du piège de 302 Hz, une fraction de la réponse instantanée de la QPD de $\alpha = 0.36$, et une fréquence de coupure de la QPD de 6341 Hz.

Afin d'estimer les erreurs typiques obtenues sur la calibration du détecteur et de la raideur du piège, la méthode a été répétée 10 fois avec la même bille positionnée à $5 \mu\text{m}$ de la surface pour négliger les effets de celle-ci sur la viscosité et donc sur la calibration. On a obtenu une réponse du détecteur de $0.512 \pm 0.013 \mu\text{m}^{-1}$ (moyenne \pm écart type) et une réponse de la bille dans le piège de $0.532 \pm 0.027 \text{ ms}$ (soit une raideur de $0.0188 \text{ pN.nm}^{-1}$) ce qui démontre la bonne reproductibilité de notre méthode. Le mouvement brownien de la bille a également été enregistré 10 fois à 65536 Hz pendant 8 secondes par enregistrement. Nous avons ainsi pu comparer nos résultats avec ceux obtenus par la méthode utilisant la densité spectrale de puissance du mouvement de la bille piégée proposée par Berg-Sørensen et al. [105] qui prend également en compte le temps de réponse limité de notre QPD (Utilitaire Matlab [109]). Le temps de réponse de la bille obtenu est de $t_b = 1/2\pi f_c = 0.555 \pm 0.013 \text{ ms}$ avec f_c la fréquence de coupure de la QPD et une raideur du piège calculée de $0.0183 \text{ pN.nm}^{-1}$. En multipliant la densité spectrale de puissance (DSP) par la fréquence élevée au carré on obtient, comme proposé par Allersma dans [103] une sensibilité de notre détection de $0.479 \pm 0.007 \mu\text{m}^{-1}$. Ces deux valeurs de la raideur et de la sensibilité de la détection sont en bon accord avec notre méthode.

Pour vérifier la valeur de $0.512\mu\text{m}^{-1}$ obtenue pour la calibration de notre système de détection nous l'avons utilisée pour convertir les mesures de fluctuations de position de la bille en unité de longueur. En utilisant le théorème d'équipartition nous avons alors obtenu une raideur de $0.0175\text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$, en accord avec la valeur obtenue avec notre méthode et celle utilisant la DSP.

Nous avons également cherché à déterminer expérimentalement la zone de linéarité de notre détection. Pour ce faire nous avons utilisé notre méthode pour tracer la valeur du déplacement du piège mesuré avec la QPD, X_0 , en fonction du déplacement réel effectué avec le DAO (figure 2.22). On obtient une zone de linéarité d'environ $\pm 150\text{ nm}$.

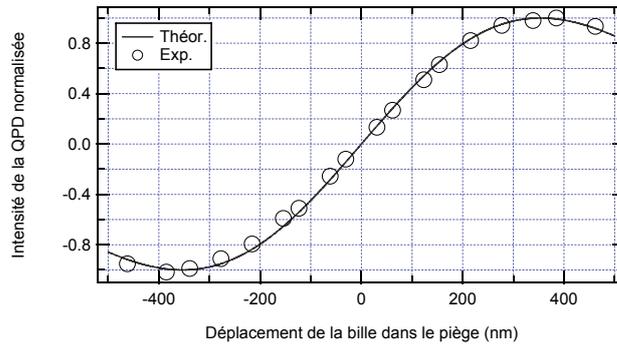


FIGURE 2.22 – Zone de linéarité de notre détection. Les cercles correspondent aux mesures du déplacement du piège avec la QPD, X_0 , en fonction du déplacement réel effectué avec le DAO. En trait plein la courbe théorique dans le régime de Rayleigh prévue pour une bille de silice de diamètre $1\mu\text{m}$ et une ouverture numérique de 1.33 (équation 2.17). La transmission des optiques du système de détection n'étant pas connue, les intensités mesurées par la QPD sont normalisées à 1 pour la théorie et l'expérience. Bien que l'équation 2.17 ait été déterminée pour décrire la réponse de la QPD dans le cas du piégeage dans le régime de Rayleigh, on voit que l'allure de la courbe expérimentale reste en bon accord avec celle obtenue par la théorie.

Nous avons vu jusqu'ici les différentes méthodes à notre disposition pour calibrer notre système de pince optique. Afin de prendre en compte les changements de viscosité dus à la proximité de la surface nous ferons systématiquement la mesure de la distance séparant la bille piégée de la lamelle en utilisant l'approche décrite dans la section 2.3.4 de ce chapitre. La raideur du piège et la sensibilité de la détection seront ensuite calibrées par la méthode que nous venons ici de détailler, en prenant en compte la valeur corrigée de la viscosité du milieu. Le théorème d'équipartition ne faisant pas intervenir la connaissance de la hauteur de la bille piégée, nous pourrions également utiliser cette méthode pour confronter nos valeurs de la raideur du piège et ainsi valider nos mesures.

2.5 Etirement d'oligonucléotides

Dans cette section nous allons décrire brièvement la structure des acides nucléiques ainsi que les deux modèles couramment utilisés pour décrire leurs propriétés selon que l'acide nucléique est simple ou double brin. Ces modèles seront ensuite utilisés pour faire des ajustements théoriques sur des courbes expérimentales de force en fonction de l'extension d'un ADN double

2.5 Etirement d'oligonucléotides

brin dont la longueur totale et la longueur de persistance (décrivant la rigidité de l'ADN) sont a priori connues. Les paramètres obtenus nous permettront alors de valider notre méthode d'approche (calibration de la pince optique et configuration de l'expérience) pour l'étude future de systèmes biologiques plus complexes.

2.5.1 Structure et propriétés mécaniques de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule polymère présente dans les cellules de tout organisme vivant. Il s'agit d'une molécule allongée dont la taille peut varier de quelques nanomètres à plusieurs centaines de microns de long sur quelques nanomètres de large seulement. Elle est notamment le support de l'information génétique nécessaire pour la synthèse des protéines. Cette information génétique est contenue sous la forme d'un enchaînement de nucléotides constituant une chaîne polymère. Ces derniers sont composés d'un désoxyribose lié à un groupe phosphate et à une base azotée. Chaque nucléotide est lié successivement par des liaisons 3'-5' phosphodiester, d'un phosphate à la fonction ester du sucre suivant. Chaque extrémité d'un brin d'ADN est donc terminée soit par un phosphate, notée 5' ou 5'P, soit par un désoxyribose, notée 3' ou 3'OH.

Chaque molécule d'ADN peut s'hybrider à une autre pour former un ADN double brin, possé-

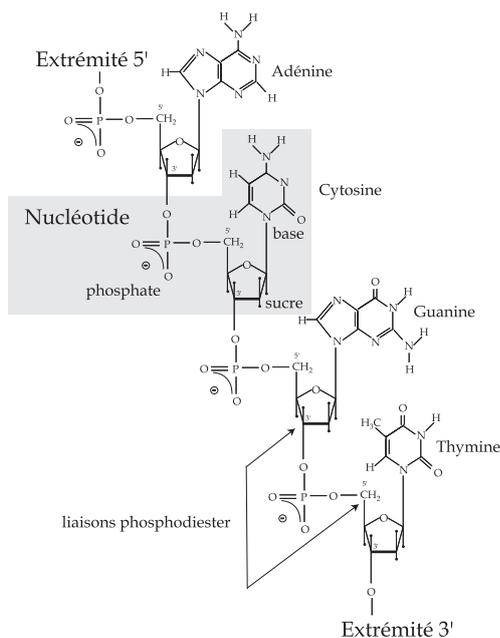


FIGURE 2.23 – Constitution d'un simple brin d'ADN. Le monomère à l'origine de la molécule d'ADN est le nucléotide représenté en grisé, constitué d'une base, d'un sucre et d'un groupement phosphate lié au sucre du nucléotide voisin. Les extrémités d'un brin sont notées par 5' et 3'.

dant une structure en double hélice. Cette association de deux simples brins nécessite cependant une certaine complémentarité entre les bases se faisant face. Deux ou trois liaisons hydrogènes (notées liaisons H) se font alors entre chaque paire de bases. Ces interactions attractives ainsi que celles entre bases d'un même simple brin stabilisent la structure double brin en s'opposant aux répulsions électrostatiques entre groupements phosphates chargés négativement. Cependant cette stabilité reste relativement faible puisqu'une élévation de quelques dizaines de

degrés suffit pour séparer les deux simples brins hybridés. Les quatre bases azotées disponibles dans tout organisme sont l'adénine (notée A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G) et les associations possibles sont les paires A-T (deux liaisons H) et G-C (trois liaisons H).

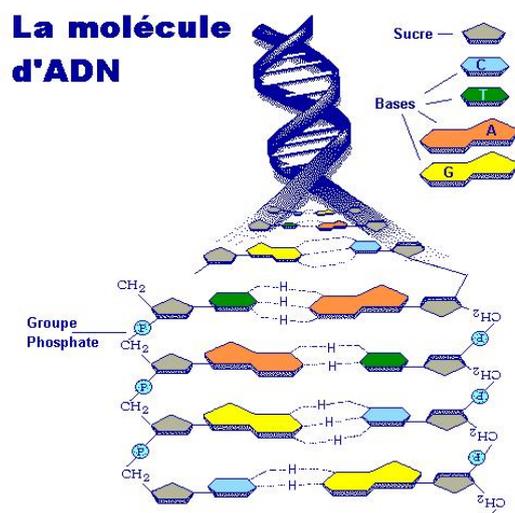


FIGURE 2.24 – Représentation d'une molécule d'ADN double brin. La structure en double hélice est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre les bases se faisant face.

L'acide ribonucléique (ARN) est quant à lui synthétisé à partir de l'ADN et possède une structure très similaire. Le désoxyribose est remplacé par un ribose et les acides aminés thymine par l'uracile (U) pouvant aussi s'apparier avec l'adénine via deux liaisons H. Alors que l'ADN est souvent présent dans l'organisme sous sa forme de double hélice, l'ARN est majoritairement présent sous forme de simple brin.

Des expériences en molécule unique [14, 87, 110–112] ont déjà permis de comprendre certains aspects des propriétés mécaniques de l'ADN. Celui-ci est un polymère possédant une longueur de contour et une longueur de persistance. La longueur de contour peut être définie comme la longueur totale de la molécule. Connaissant la distance entre deux bases de 0.338nm et le nombre total de bases bp constituant un brin, on peut donc calculer la longueur de contour $L = 0.338bp$. Pour exemple, l'ADN utilisé dans notre étude possède 7500 paires de bases, soit une longueur de contour de $2.5\mu m$. La longueur de persistance définit quant à elle la distance sur un segment de la molécule au bout de laquelle il n'y a plus de corrélations entre les orientations de ses extrémités. Cette notion permet de décrire la rigidité de la molécule. Une valeur élevée de cette grandeur traduira alors un ADN peu enclin à se courber. Pour l'ADN double brin on estime sa longueur de persistance à environ 150 paires de bases, bien que cette grandeur varie selon les conditions du milieu (pH, concentrations en sels, température ...).

2.5.2 Modèles théoriques des acides ribonuléliques

L'ADN peut donc être considéré comme une chaîne polymère caractérisée par sa longueur de contour et sa longueur de persistance. En solution l'ADN adoptera une conformation en pelote afin de maximiser son entropie et sera sujet à des fluctuations de conformation dues aux fluctuations thermiques. Appliquer une force sur la molécule d'ADN viendra alors réduire son entropie et donc réduira le nombre de configurations possibles pour la molécule. Les forces

2.5 Etirement d'oligonucleotides

nécessaires pour étirer complètement une molécule d'ADN sont relativement faibles ($<10\text{pN}$) et deux modèles seront discutés ici permettant de décrire le lien entre ces forces et l'extension d'une molécule d'ADN simple ou double brin.

2.5.2.1 Modèle de la chaîne à articulations libres

Le modèle de la chaîne à articulations libres [14, 113] considère l'ADN comme un polymère constitué de N monomères chacun de longueur b tels que ces fragments peuvent tourner librement autour d'articulations sans interactions avec les fragments voisins et tels que la longueur totale de l'ADN vaut $L = Nb$. En présence d'une force extérieure F , ces segments tendent à s'aligner avec la direction dans laquelle la force est appliquée. Afin de maximiser son entropie la chaîne aura alors tendance à s'opposer à son étirement et l'extension de l'ADN est alors définie par la position d'équilibre entre la force appliquée et les fluctuations thermiques de la molécule. L'énergie E de la chaîne polymère est alors donnée par :

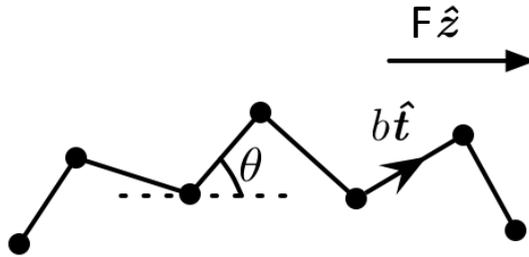


FIGURE 2.25 – schéma représentatif du modèle de la chaîne à articulations libres. Le polymère est considéré comme une succession de fragments de longueur b orientés dans la direction \hat{t} pouvant tourner librement autour d'articulations sans interactions avec les fragments voisins. F représente la force appliquée à la molécule dans la direction z .

$$\frac{E}{k_B T} = \sum_{i=1}^N \frac{Fb}{k_B T} t_i \cdot z \quad (2.30)$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température, t_i le vecteur directeur du fragment i et z la direction selon laquelle la force est appliquée.

À partir de cette équation une relation entre la force appliquée et l'extension l moyenne de la chaîne donne :

$$\left\langle \frac{l}{L} \right\rangle = \coth \left(\frac{Fb}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{Fb} \quad (2.31)$$

avec L la longueur totale de la molécule. Pour des forces élevées on voit cependant que l'extension de la molécule se rapproche de la longueur totale de la molécule L avec l'inverse de la force. D'après la littérature [14, 114, 115] ce comportement ne décrit pas, ou mal, celui d'un double brin d'ADN. Toutefois il semble mieux décrire celui d'un simple brin d'ADN ou d'ARN dont les bases, non appariées, agiraient plutôt comme des fragments individuels.

2.5.2.2 Modèle du ver

Le modèle du ver considère quant à lui l'ADN comme une chaîne continue. Ce modèle permet alors de mieux décrire le comportement de polymères plus rigides et de considérer

que des segments successifs d'une même chaîne peuvent présenter une certaine "coopérativité" en pointant dans une direction similaire. La figure ci-dessous schématise le modèle du ver. Il

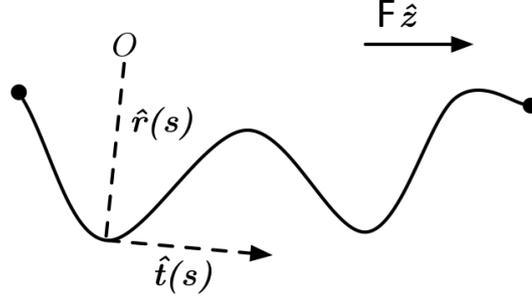


FIGURE 2.26 – Schéma représentatif du modèle du ver. Le polymère est alors considéré comme une chaîne continue tenant compte de la rigidité de la molécule. s représente l'abscisse curviligne, f la force appliquée dans la direction z et $\mathbf{t}(s)$ la tangente au rayon de courbure $\mathbf{r}(s)$ de la molécule.

convient dans ce modèle d'introduire un terme décrivant la rigidité de la molécule appelée la longueur de persistance L_p qui, rappelons-le, représente la distance au bout de laquelle les corrélations d'orientation du polymère sont perdues. D'après Marko et Siggia [116] l'énergie E de la molécule s'écrit :

$$E = k_B T \int_0^L \left[\frac{L_p}{2} \left| \frac{d\mathbf{t}(s)}{ds} \right|^2 - \frac{F}{k_B T} \mathbf{t}(s) \cdot \mathbf{z} \right] ds \quad (2.32)$$

avec s l'abscisse curviligne de la chaîne.

Une solution numérique à cette équation a pu être déterminée par ces mêmes auteurs et est couramment utilisée pour ajuster les courbes expérimentales de force-extension de l'ADN pour de faibles forces :

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{l}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{l}{L} \right) \quad (2.33)$$

Cette expression donne de bons résultats avec les expériences impliquant des forces inférieures à 5 pN , au delà desquelles le modèle prévoit des forces requises pour une extension de l'ADN donnée qui augmentent plus rapidement que les données expérimentales. Ceci peut s'expliquer par le fait que le modèle considère l'ADN comme une molécule inextensible, c'est à dire pour une longueur totale constante. Or, pour des forces élevées, la structure de l'ADN se déforme permettant alors à la molécule de s'étendre sur des distances plus grandes que L . Pour prendre en compte ce phénomène Wang et al. [14] ont rajouté un autre terme à l'équation 2.33, appelé le module d'élasticité K , permettant un meilleur accord entre la théorie et les expériences jusqu'à des forces d'approximativement 50 pN . La force s'écrit alors :

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{l}{L} + \frac{F}{K}\right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{l}{L} - \frac{F}{K} \right) \quad (2.34)$$

2.5.3 Préparation de l'expérience

La configuration adoptée pour exercer des forces sur l'ADN double brin consiste à accrocher une extrémité d'un brin à la surface et l'extrémité de l'autre brin sur la bille piégée. L'ADN

2.5 Etirement d'oligonucleotides

doit donc posséder deux fonctionnalisations différentes pour assurer une accroche spécifique à la bille et à la surface. L'accroche sur la bille se fait entre une digoxigénine attachée chimiquement à une extrémité 5' d'un brin et l'anti-digoxigénine fixée sur la bille. L'extrémité 5' du brin complémentaire est fonctionnalisée avec une biotine pour s'attacher spécifiquement à une neutravidine sur la surface. La figure 2.27 schématise les différentes attaches depuis la bille jusqu'à la surface.

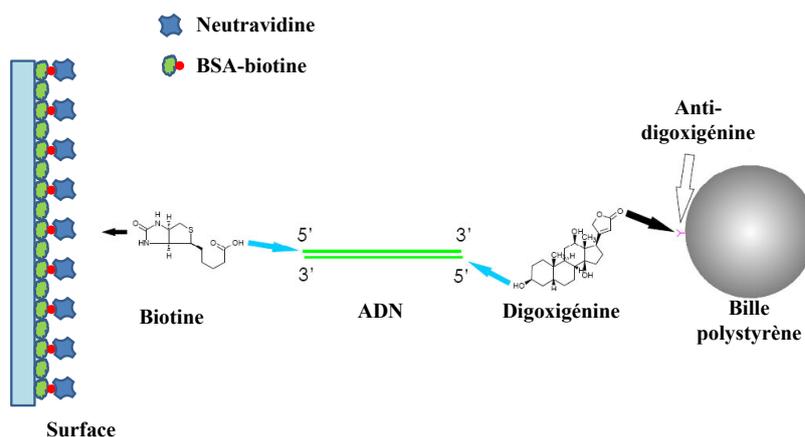


FIGURE 2.27 – Fonctionnalisation d'un double brin d'ADN. Chaque extrémité 5' des deux brins possède soit une biotine soit une digoxigénine pour se lier respectivement à l'avidine attachée à la surface ou l'anti-digoxigénine fixée sur la bille.

Préparation de la chambre microfluidique Les cellules microfluidiques utilisées sont constituées d'une lamelle d'épaisseur $170\mu\text{m}$ fixée à une lame de microscope par deux bandes de scotch double face espacées l'une de l'autre par environ 5mm. Des volumes d'une dizaine de microlitres sont injectés dans le canal pour incuber les différents constituants. L'extrémité biotine de l'ADN devant se fixer sur une fonction avidine à la surface, de la BSA-biotine (Bovine Serum Albumin) à 0.1 g/L est incubée pendant 2h dans le canal microfluidique suivie d'une incubation de Neutravidine à 0.1g/L pendant 15 minutes. La Neutravidine est une protéine possédant quatre sites d'accroche spécifiques avec la biotine. Cette protéine est donc utilisée pour faire le lien entre la biotine de la BSA et celle fixée sur l'ADN. La cellule est finalement rincée avec une solution de BSA à 1 g/L permettant de rincer les neutravidines non fixées et de passer la surface afin d'éviter les interactions non spécifiques de l'ADN ou des billes avec la surface.

Revêtement des billes Des billes carboxyles (COOH) en polystyrène de diamètre $0.98\mu\text{m}$ (Bangs Laboratories, Inc) sont fonctionnalisées avec l'anticorps anti-digoxigénine. Les tampons utilisés sont disponibles chez le même fournisseur que les billes (PolyLink Protein Coupling Kit) et la fonctionnalisation est inspirée du protocole fourni avec le kit (protocole détaillé en annexe). La réaction consiste à faire réagir un carbodiimide (EDAC, Sigma) avec la fonction COOH de la bille pour créer un ester actif réagissant avec une fonction amine de l'anti-digoxigénine comme schématisé sur la figure 2.28.

Après fonctionnalisation, les billes sont rincées afin de retirer les anti-digoxigénines n'ayant pas réagi, évitant ainsi de bloquer les sites digoxigénines des ADN avec des anticorps libres.

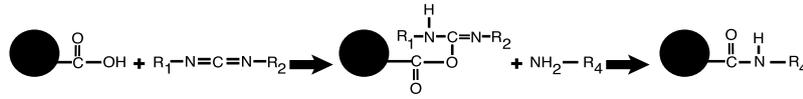


FIGURE 2.28 – La fonctionnalisation des billes carboxyles ($COOH$) avec l’anti-digoxigénine se fait en deux étapes. La première réaction consiste à créer une fonction ester sur les billes en faisant réagir l’EDAC avec la fonction $COOH$ des billes. La seconde réaction se fait ensuite entre la fonction amine de la protéine d’intérêt avec la fonction ester de la bille.

Les billes sont ensuite diluées dans une solution contenant de la BSA à 1 g/L pour éviter la formation d’agrégats et limiter les interactions non spécifiques des billes avec la surface. Cette solution de billes est finalement mélangée avec l’ADN pendant une nuit avec un ratio de 100 ADN par bille. La solution est ensuite centrifugée et le surnageant contenant les ADN non accrochés aux billes est remplacé par une solution de TRIS+BSA. Comme on le verra par la suite, ce rapport d’ADN par bille reste encore un paramètre à optimiser puisque, a priori, avec un tel ratio chaque bille possède à sa surface plusieurs molécules d’ADN. En les injectant dans la cellule, les billes peuvent donc se lier à la surface via plusieurs ADN. Dans la pratique, on a observé qu’en diminuant cette quantité d’ADN dans le mélange on obtenait moins de billes accrochées à la surface, ce qui laisse penser que toutes les billes n’ont pas chacune un ADN. Le ratio de 100 ADN par bille que nous utiliserons permet de trouver une quantité raisonnable d’accroches de billes à la surface de la lamelle de microscope via l’ADN (entre 5 et 10 sur le champ de $30 \times 20 \mu m$ de la caméra).

2.5.4 Etirement d’un brin d’ADN

Après une incubation de plusieurs heures du mélange de billes-ADN dans la cellule, les billes non accrochées à la surface sont rincées avec une solution de tampon TRIS+BSA (1 g/L). Les billes accrochées à la surface par un ADN sont identifiées par le fait que leur position fluctue autour d’un emplacement fixe sur la lamelle. Pour déterminer le point d’ancrage de la bille sur la surface, la bille est piégée puis ramenée à une hauteur inférieure à un micron de la lamelle. A l’aide de la platine piézoélectrique, un déplacement sinusoïdal de l’échantillon autour de sa position initiale est effectué tout en mesurant sur la QPD la déviation du faisceau laser par la bille lorsque l’ADN force celle-ci à sortir de sa position d’équilibre. La position initiale de la platine est alors ajustée de sorte que le signal mesuré par la QPD sur l’axe parallèle au déplacement de la platine soit maximisé et centré. Une fois la position du piège et le point d’ancrage de la bille superposés, la platine est à nouveau translatée sinusoïdalement avec une vitesse de 100 nm/s et le signal de la QPD ainsi que la position correspondante de la platine sont enregistrés pour être analysés.

La calibration du piège (en utilisant les méthodes décrites dans les paragraphes 2.4 et 2.3.4) est faite après les mesures de force-extension de l’ADN, ceci afin de minimiser le temps d’exposition de l’ADN avec le laser de pince. Bien que la longueur d’onde du laser soit choisie pour éviter d’endommager les échantillons biologiques étudiés, dans le proche infrarouge des oxygènes singulets sont générés par le faisceau laser et dégradent l’ADN réduisant son temps de vie [31].

Une fois les données enregistrées et le piège calibré, les mesures sont analysées sous IGOR PRO. La sensibilité β étant connue grâce à la calibration, la position de la bille par rapport

2.5 Étirement d'oligonucléotides

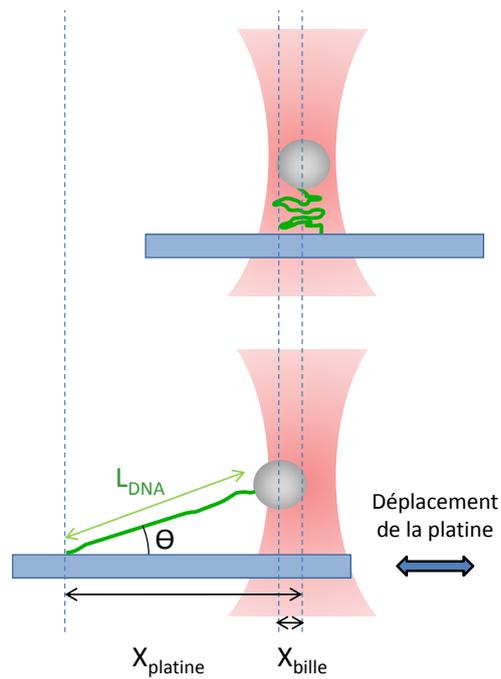


FIGURE 2.29 – Schéma représentant l'étirement d'un brin d'ADN accroché entre la surface et la bille piégée. Alors que la platine piézoélectrique déplace l'échantillon, l'ADN tire la bille hors de sa position d'équilibre. La direction de la force appliquée entre la bille et l'ADN dépend alors de la hauteur de la bille.

au centre du piège peut être déterminée à partir des déviations du spot laser sur la QPD. La position de la bille dans le piège et la raideur de celui-ci nous permettent alors de remonter à la force appliquée pour chaque position de la platine. Pour connaître l'extension de l'ADN pour chaque position de la platine, il convient ensuite de corriger le signal de celle-ci du rayon de la bille r_{bille} , du déplacement de la bille X_{bille} par rapport à son point d'équilibre mais aussi de l'angle entre la surface et l'ADN. Ce dernier peut être déterminé connaissant la hauteur h_{bille} de la bille piégée. Dans le cas idéal, une calibration de la raideur du piège dans le plan longitudinal serait nécessaire pour connaître la composante de la force appliquée dans cette direction. Cependant, en positionnant la bille à une distance inférieure à $1 \mu m$ de la surface et en travaillant avec un ADN d'une longueur théorique de $2.5 \mu m$, la mesure de la composante transversale uniquement introduira une erreur faible ($< 10\%$) par rapport à la force réelle impliquée.

En utilisant les notations de la figure 2.32, l'extension de l'ADN l est donnée par :

$$l = \left((X_{platine} - X_{bille} - r_{bille})^2 + h_{bille}^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.35)$$

A ce stade on a donc la force appliquée pour chaque extension de l'ADN. Bien que l'on ait pris soin de superposer le piège avec la position d'ancrage de l'ADN, il reste souvent un offset résiduel. Pour le déterminer et le corriger, on utilise le fait que la courbe de force-extension obtenue expérimentalement doit être symétrique par rapport à ce point d'ancrage puisque le déplacement de la platine est sinusoïdal par rapport à celui-ci. Dans [14], les auteurs déterminent le centre de symétrie de leur courbe de force-extension en effectuant un ajustement de la courbe de force-extension de leur ADN par un polynôme de degré 7 dont l'expression pour une fonction impaire peut s'écrire :

$$y = g(x) = y_0 + b_1(x - x_0) + b_3(x - x_0)^3 + b_5(x - x_0)^5 + b_7(x - x_0)^7 \quad (2.36)$$

où les termes x_0 et y_0 sont les coordonnées du centre de symétrie de la courbe. Le graphique 2.30 représente une courbe d'extension avec l'ajustement de l'équation 2.36.

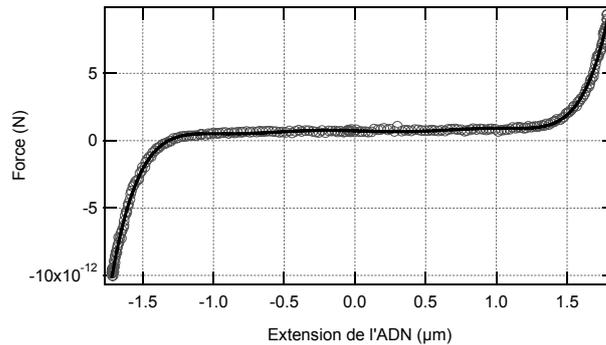


FIGURE 2.30 – Courbe de force-extension d'un ADN double brin de 7500bp (cercle) pour un piège de 0.072 pN/nm et son ajustement par l'équation 2.36 (trait plein). L'ajustement permet alors de déterminer le point de symétrie de la courbe, ici de $x_0 = 0.058 \mu m$ et $y_0 = 0.72 \text{ pN}$.

En utilisant la formule 2.33 il est possible de connaître à présent la longueur de contour, la

2.6 Conclusions et perspectives

longueur de persistance ainsi que le facteur d'élasticité de l'ADN étudié. Seuls ces paramètres sont utilisés pour effectuer un ajustement des données expérimentales.

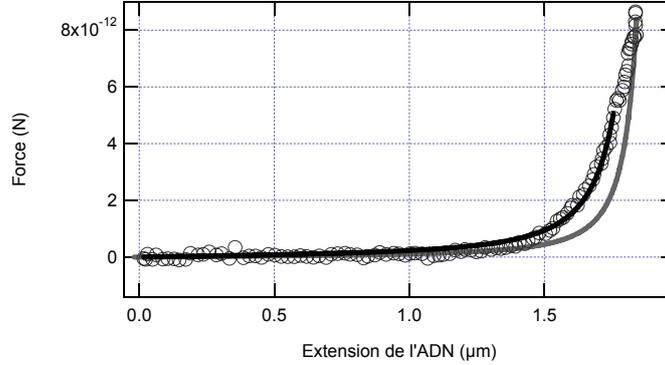


FIGURE 2.31 – Données expérimentales d'une courbe force-extension d'un ADN double brin de 7500bp (cercle). L'ajustement (trait plein noir) de ces données par l'équation 2.33 pour des forces inférieures à 5pN donne une longueur de contour de 1.94 μm et une longueur de persistance de 23.7nm. La courbe de force-extension théorique pour un ADN double brin de même longueur de contour et de longueur de persistance de 50 nm est tracée en trait plein gris.

Sur le graphique 2.31 l'ajustement des données expérimentales de force-extension d'un ADN double brin de 7500 paires de bases par l'équation 2.33 donne une longueur de contour de 1.94 μm et une longueur de persistance de 23.7 nm. Les valeurs théoriques attendues pour un tel ADN sont de 2.5 μm pour la longueur de contour et 50nm pour la longueur de persistance. L'écart entre les valeurs expérimentales et théoriques peut provenir soit d'une erreur de calibration du piège, soit du fait que l'accroche de l'ADN sur la bille n'est pas unique. Cette dernière explication est très probable puisque les ratios d'ADN par bille utilisés ici sont élevés (100 : 1). Dans le cas où on tire sur une bille accrochée à la surface via plusieurs ADN, on doit logiquement mesurer une longueur de contour plus courte que celle d'un ADN unique, ce qui est bien ce que l'on observe. Lorsque l'on tire sur plusieurs ADN entre la bille et la surface, alors pour une extension donnée on doit exercer une force plus élevée par rapport au cas où on tire sur un ADN unique : d'après l'équation 2.33 on doit donc avoir une longueur de persistance qui est plus faible. Ceci est également en accord avec nos mesures. Pour trouver un meilleur accord entre la théorie et nos mesures, nous avons cherché à obtenir des accroches d'ADN unique entre les billes et la surface en ajustant les ratios d'ADN par bille. Avec 100 ADN par bille dans le mélange le nombre d'accroches de billes à la surface est optimal, par contre la majorité des billes observées fluctuent peu autour de leur point d'ancrage ce qui peut effectivement laisser penser que plusieurs ADN relient les billes et la surface. En diminuant le nombre d'ADN par bille le nombre d'accroches diminue sans laisser observer des accroches uniques. La fonctionnalisation des billes et les quantités d'ADN à mélanger avec les billes restent donc encore actuellement les paramètres à optimiser pour la suite des expériences.

2.6 Conclusions et perspectives

Nous avons dans ce chapitre décrit le dispositif de pince optique développé pour l'étude de structures secondaires d'acides ribonucléiques. Afin de minimiser le temps des expériences mais

aussi celui d'exposition de l'échantillon biologique par le faisceau laser nous avons mis au point une nouvelle méthode de calibration permettant de connaître simultanément la raideur du piège et la sensibilité de la détection. En attachant un ADN double brin entre la surface et la bille piégée et en mesurant la hauteur de la bille, nous avons montré qu'il était possible, en déplaçant l'échantillon par rapport au piège, de mesurer la force appliquée en fonction de l'extension de la molécule. L'état actuel du dispositif permet d'appliquer des forces de quelques centaines de femtoNewtons à plusieurs dizaines de picoNewtons sur des ADN attachés entre une bille de polystyrène de diamètre $1 \mu\text{m}$ et la surface. Les résultats préliminaires pour les longueurs de contour et de persistance obtenues à partir de ces courbes de force-extension s'écartent cependant de ce que la littérature prévoit. Une explication pourrait être que plusieurs ADN sont accrochés entre la bille et la surface ce qui impliquera d'optimiser les protocoles de mélanges des billes avec l'ADN. La longueur de l'ADN utilisé ici étant relativement grande ($2.5 \mu\text{m}$), la composante longitudinale de la force appliquée est faible et la raideur du piège a pu être considérée isotrope sans que cela induise une erreur trop importante sur la mesure de la force totale appliquée. Ceci ne sera par contre pas vrai dans la situation où l'on tire sur des brins d'ARN, plus courts, pour étudier leur structure et il conviendra de soit calibrer la raideur longitudinale du piège, soit tirer dans le plan transversal uniquement. Pour satisfaire cette deuxième condition nous avons commencé à fonctionnaliser des billes de polystyrène de $2 \mu\text{m}$ de diamètre avec de la neutravidine. Celles-ci seront alors immobilisées sur la BSA-biot de la surface. Les brins d'ARN seront quant à eux hybridés à deux oligonucléotides ADN, chacun fonctionnalisés avec une biotine ou une digoxigénine, pour pouvoir s'accrocher d'un côté à la bille piégée et de l'autre à la bille fixée à la surface. En rapprochant dans un plan transversal une bille piégée ayant déjà été incubée avec l'hybridation ARN/ADN de la bille neutravidine, l'attache devra se faire dans ce même plan où la raideur du piège sera connue. Cette configuration devrait être plus adaptée à l'étude de structures secondaires d'acides ribonucléiques.

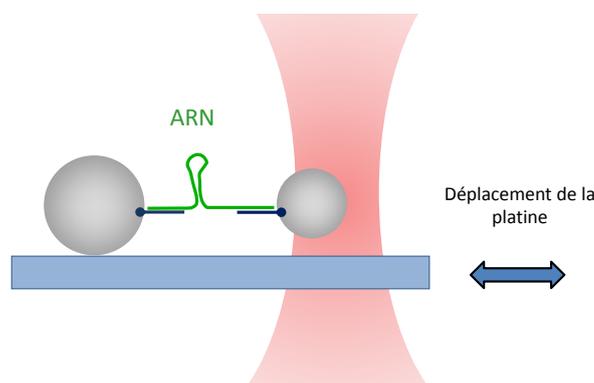


FIGURE 2.32 – Schéma représentant l'étirement d'un brin d'ARN entre une bille collée à une surface et la bille piégée. L'ARN est hybridé à deux "poignées" ADN, l'une possédant une fonction digoxigénine s'accrochant spécifiquement à la bille piégée et l'autre une fonction biotine s'accrochant à la bille collée à la surface. Cette configuration permet d'étirer l'ARN dans le plan transversal uniquement.

Dispositif expérimental pour la microscopie de fluorescence

La fluorescence est basée sur l'absorption de photons par un échantillon organique ou inorganique ré-émettant presque simultanément des photons d'énergie plus faible. C'est le principe à la base de la microscopie de fluorescence, une technique maintenant classique utilisée par la communauté scientifique pour marquer des éléments subrésolution d'un échantillon pour les localiser, améliorer le contraste de structures déjà visibles ou encore pour identifier par leur signature spectrale des éléments spécifiques de l'échantillon. Différents types de microscopes ont été développés à partir de ce principe pour observer et étudier des phénomènes biologiques à l'échelle de la molécule unique. Nous allons détailler dans ce chapitre le dispositif de microscopie à onde évanescente et les différents éléments du montage utilisés pour l'étude du ribosome et de la photophysique d'un fluorophore, le Bodipy-Fl, qui font l'objet des deux prochains chapitres. Nous exposerons en particulier le dispositif de détection multicouleurs, qui permettra l'observation de différents marqueurs fluorescents utilisés pour étudier la cinétique de la traduction ainsi que les diverses améliorations apportées au montage (contrôle en température, mise au point automatique...) pour se placer dans les conditions optimales pour le bon déroulement des expériences sur le ribosome.

3.1 Principe du TIRF

En microscopie de fluorescence classique, ou épifluorescence, un faisceau laser est collimaté en sortie d'un objectif de microscope afin d'exciter les fluorophores d'un échantillon. Le faisceau, aligné sur l'axe optique de l'objectif, traverse alors toute l'épaisseur de ce dernier excitant ainsi tous les fluorophores sur son trajet. La limite principale de cette technique vient du fait que le signal émis par les fluorophores localisés dans le plan d'observation est superposé avec celui des autres fluorophores, beaucoup plus nombreux, diffusant dans la solution. Pour pouvoir observer un fluorophore unique avec un bon rapport signal sur bruit il est donc essentiel de limiter le volume d'excitation. C'est le cas notamment de la microscopie confocale qui consiste à focaliser le faisceau d'excitation dans le plan de l'échantillon et à filtrer spatialement la fluorescence issue d'un autre plan que le plan focal de l'objectif. La résolution spatiale de cette technique est alors reliée au produit du volume d'excitation par celui de la détection et permet typiquement une résolution de l'ordre de la centaine de nanomètres latéralement et quelques centaines de nanomètres axialement, suffisante pour visualiser des molécules uniques avec un excellent rapport signal sur bruit. La limitation principale de cette technique reste la résolution temporelle pour des zones d'observation plus grandes que le volume de détection, ce qui nécessite un balayage de la zone d'observation avec le faisceau laser.

La microscopie de TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) consiste à exciter les fluorophores avec une onde évanescente localisée près de la surface de l'échantillon [117]. Cette onde, créée par la réflexion totale du faisceau laser entre la lamelle de microscope et le milieu de l'échantillon, excite les fluorophores localisés dans un volume défini en profondeur par la distance de pénétration de l'onde évanescente (typiquement 100 nm) permettant l'observation des fluorophores avec un excellent rapport signal sur bruit, et en largeur par la taille du faisceau à l'interface autorisant un champ d'observation suffisamment large pour détecter un grand nombre de fluorophores. La résolution temporelle de cette technique est alors limitée par le temps d'intégration de la caméra nécessaire pour obtenir le rapport signal à bruit souhaité (typiquement quelques dizaines de millisecondes pour observer des fluorophores organiques en molécule unique).

La réflexion totale est un phénomène qui se produit lorsque la lumière rencontre une interface entre un milieu d'indice n_1 supérieur à celui d'un second milieu, n_2 . D'après la loi de Snell-Descartes, on peut définir un angle d'incidence au-delà duquel la lumière est totalement réfléchie, il s'agit de l'angle critique :

$$i_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1} \quad (3.1)$$

Dans ce cas où toute la lumière est réfléchie à l'interface, il existe toutefois une fraction du champ électromagnétique qui pénètre le milieu d'indice inférieur. Ce champ, dit évanescent, pénètre le second milieu sur une faible distance permettant d'exciter des fluorophores près de la surface. L'énergie de ce champ suit alors une décroissance exponentielle en fonction de la distance à la surface :

$$I(z) = I(0)e^{-z/d} \quad (3.2)$$

où z est la distance à la surface et d la profondeur de pénétration de l'onde évanescente qui elle-même dépend de la longueur d'onde, de l'angle d'incidence de la lumière ainsi que des indices des deux milieux selon :

$$d = \frac{\lambda}{4\pi} (n_1^2 \sin^2 i_1 - n_2^2)^{-1/2} \quad (3.3)$$

La figure 3.1 représente la distance de pénétration de l'onde évanescente en fonction de l'angle d'incidence d'un faisceau de longueur d'onde $\lambda = 532 \text{ nm}$ à l'interface verre/eau (d'indices respectifs 1.512 et 1.33). On voit que cette distance décroît très rapidement de quelques centaines à quelques dizaines de nanomètres pour des angles supérieurs à l'angle critique (ici $i_c = 61.6^\circ$).

Deux configurations sont couramment utilisées pour exciter un échantillon avec un angle supérieur à l'angle critique. L'une consiste à placer un prisme sur l'échantillon et à collecter la fluorescence de l'autre côté avec un objectif à immersion. L'autre méthode utilise l'objectif à immersion à la fois pour exciter les fluorophores et pour collecter la fluorescence (figure 3.2). C'est la deuxième méthode qui a été adoptée sur notre montage. Bien qu'elle ne permette pas de contrôler précisément l'angle d'incidence et donc la distance de pénétration de l'onde évanescente, elle laisse néanmoins la possibilité de combiner le montage de TIRF avec celui de pince optique qui nécessite des optiques à immersion de part et d'autre de l'échantillon.

3.2 Dispositif expérimental

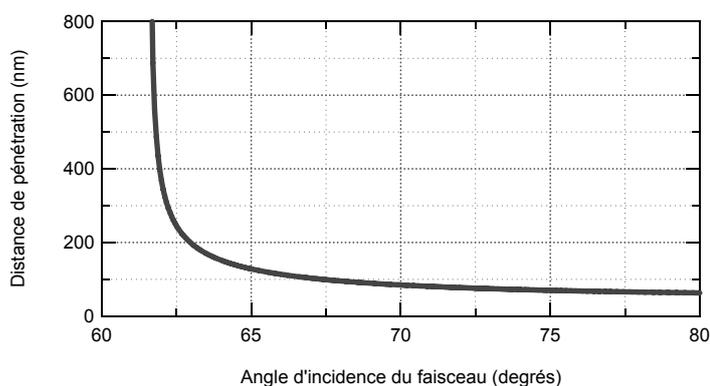


FIGURE 3.1 – Distance de pénétration de l'onde évanescente en fonction de l'angle d'incidence d'un faisceau de longueur d'onde $\lambda = 532 \text{ nm}$ à l'interface verre/eau (d'indices respectifs 1.512 et 1.33).

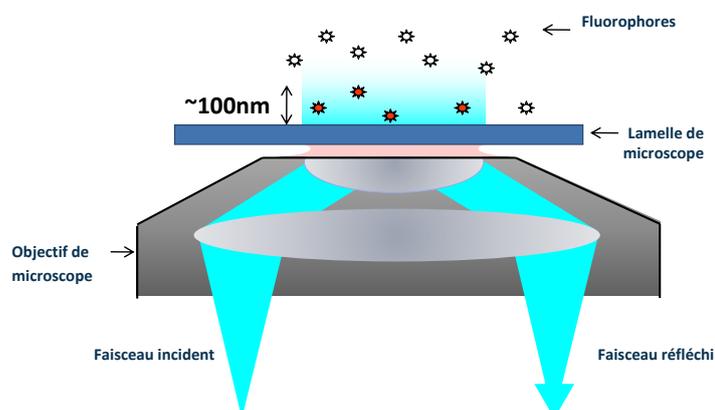


FIGURE 3.2 – Excitation à travers l'objectif de microscope. Le faisceau d'excitation est translaté par rapport à l'axe optique de sorte que l'angle d'incidence à l'interface lamelle/échantillon soit supérieur à l'angle critique. Les fluorophores hors du champ évanescent ne sont pas excités (marqueurs blancs) tandis que les fluorophores dans le champ le sont (marqueurs rouges) et leur fluorescence est collectée par l'objectif.

3.2 Dispositif expérimental

3.2.1 Dispositif de TIRF

Pour que le faisceau soit réfléchi à l'interface lamelle/échantillon, l'angle d'incidence du faisceau doit être supérieur à l'angle critique de $i_c = 61.6^\circ$. Il est donc nécessaire que l'objectif ait une ouverture numérique qui permette d'accéder à cet angle (et permettant par la même occasion de bénéficier d'une grande efficacité de collection des photons de fluorescence). L'objectif que nous utilisons est un Olympus d'ouverture numérique 1.45, soit un angle d'incidence maximal accessible de 73.2° . Une huile d'indice 1.512 est utilisée entre l'objectif et la lamelle afin d'assurer la continuité d'indice. Le faisceau laser est quant à lui translaté par rapport à l'axe optique pour être dévié par l'objectif de façon à ce qu'il en ressorte avec un angle supérieur à l'angle critique. Pour que la zone d'excitation soit suffisamment grande et pour que

tous les rayons sortent de l'objectif avec le même angle, le faisceau est focalisé par un doublet achromatique dans le plan focal arrière de l'objectif et est donc collimaté en sortie (figure 3.3). Le faisceau réfléchi ressort de l'objectif systématiquement translaté par rapport au faisceau entrant.

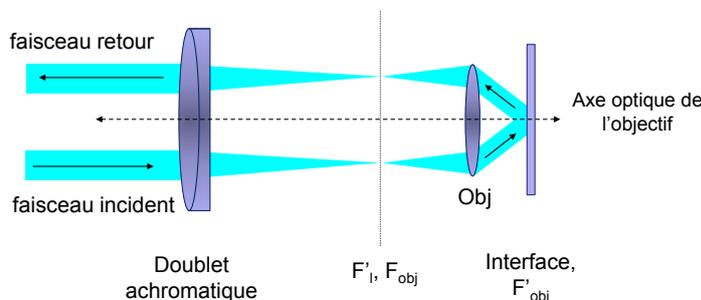


FIGURE 3.3 – Le faisceau incident est focalisé dans le plan focal arrière de l'objectif par un doublet de focale 300 mm. En translatant ce faisceau parallèlement à l'axe optique de l'objectif on obtient un faisceau retour dû à la réflexion totale sur l'interface lamelle/échantillon.

Le dispositif de TIRF est schématisé sur la figure 3.4. Trois lasers sont utilisés pour exciter différents fluorophores : un laser solide doublé en fréquence émettant à 488 nm (488-200 CDRH, Coherent, 200 mW continu, nommé “laser bleu” par la suite), une diode laser à 638 nm (DL-5038-021, Sanyo, 17 mW continu, “laser rouge”) et un laser solide Nd :YAG solide doublé en fréquence à 532 nm (Crystal Laser, 100 mW continu, “laser vert”). Le faisceau de la diode laser étant fortement elliptique, deux prismes anamorphoseurs sont placés sur le trajet du faisceau pour le circulariser. Cette diode laser sera remplacée au cours de ma thèse par une diode laser plus puissante dont le faisceau est déjà circularisé (LBX-638-100, Oxxius, 100 mW continu). Afin de coupler les différentes longueurs d'onde sur le même axe optique, deux montures basculantes, notées EM1 et EM2 sur le schéma, permettent de réfléchir respectivement le laser vert ou rouge sur le trajet du bleu. La monture basculable EM1 est équipée d'un miroir réfléchissant le vert, tandis que la monture basculable EM2 est équipée d'un miroir dichroïque (q550spxr, AHF) réfléchissant le rouge et transmettant le vert et le bleu. Il est donc possible avec ce dispositif d'exciter deux types de fluorophores différents simultanément.

Parce que les fluorophores peuvent photoblanchir (perte de fluorescence de la molécule) il est nécessaire de contrôler le temps d'excitation et le limiter uniquement au temps d'acquisition des images. Pour ce faire, un miroir galvanométrique placé sur le trajet des trois faisceaux détourne ou dirige les faisceaux vers le port d'épifluorescence du microscope. La synchronisation entre le miroir galvanométrique et les caméras est effectuée à l'aide d'un séquenceur, piloté depuis l'ordinateur sous LabView 8.2 (National Instrument). Ce système nous permet de réaliser des séries d'images avec une durée d'exposition minimale de 5 ms (limité par le temps de basculement du miroir galvanométrique) et un temps de pause entre chaque image de 10 ms (limité par le temps de transfert des images des caméras vers l'ordinateur). Lorsque le miroir galvanométrique est en “mode excitation”, les faisceaux passent par un télescope x10 ou x5 (Linos) afin d'agrandir leur taille et donc d'agrandir également la zone excitée dans l'échantillon (typiquement $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ avec un grossissement x10 du télescope). Le doublet de la figure 3.3 de focale 300 mm permet finalement de focaliser les faisceaux dans le plan focal arrière de l'objectif de microscope. Juste avant l'objectif, un miroir dichroïque adapté selon les fluorophores observés réfléchit les faisceaux d'excitation et transmet les photons de fluorescence

3.2 Dispositif expérimental

collectés par l'objectif vers les caméras.

Dans la situation où il n'est pas souhaité d'exciter simultanément deux types de fluorophores différents, un obturateur placé sur le trajet des lasers bleu et vert permet de bloquer ces derniers pendant l'excitation avec le laser rouge, ou bien de les laisser passer lorsque le laser rouge est éteint. Le contrôle de l'obturateur des lasers vert et bleu ainsi que de l'alimentation du laser rouge se fait par ordinateur via le séquenceur. Le temps de basculement de l'obturateur étant de l'ordre de la durée typique d'acquisition d'une image (100 ms) on utilisera toujours le miroir galvanométrique pour contrôler la durée d'excitation par les lasers.

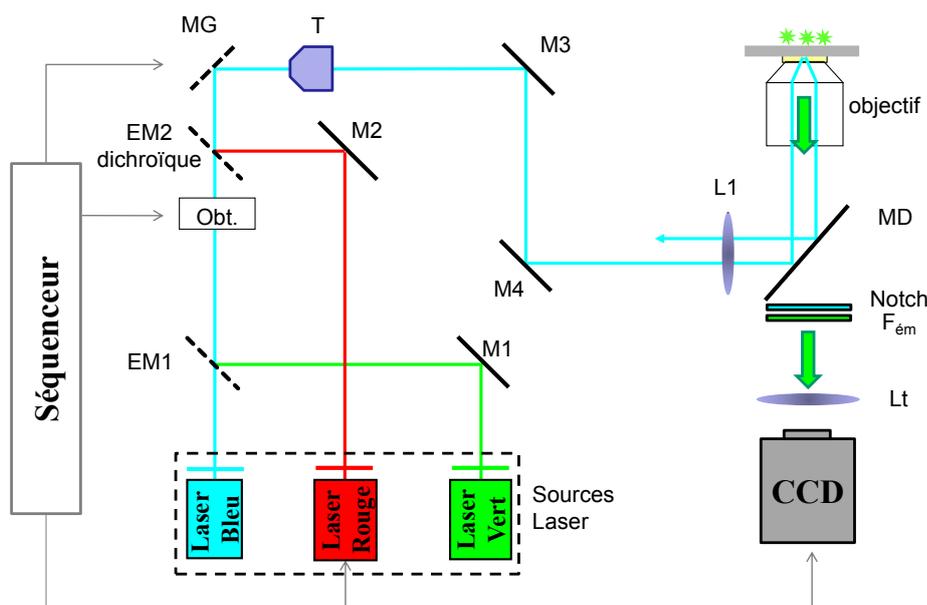


FIGURE 3.4 – Schéma du dispositif d'excitation. Trois lasers de longueurs d'onde d'émission 488, 532 et 638 nm sont utilisés pour exciter différents types de fluorophores. EM1 et EM2 sont deux montures amovibles équipées respectivement d'un miroir argentique et d'un miroir dichroïque. MG et Obt. dénotent le miroir galvanométrique et l'obturateur contrôlés par le séquenceur, T le télescope ($\times 5$ ou $\times 10$) et MD le miroir dichroïque séparant les faisceaux d'excitation de la fluorescence des fluorophores. Après avoir été transmis par le MD, la fluorescence collectée est à nouveau filtrée par un filtre Notch et un filtre d'émission (F_{em}) avant d'être focalisée par la lentille de tube (L_t) sur une caméra CCD.

3.2.2 Détection de la fluorescence

Dispositif de détection Pour les expériences ne faisant intervenir qu'un seul de type de fluorophore, la fluorescence collectée par l'objectif de microscope est séparée des lasers d'excitation par le miroir dichroïque, un filtre Notch¹ ainsi qu'un filtre d'émission² situés dans un cube de la tourelle du microscope en-dessous de l'objectif. L'image du plan d'observation est ensuite faite sur une caméra EM-CCD (C9100, Hamamatsu, qui sera remplacée au cours de la thèse par une EM-CCD Ixon, Andor) placée dans le plan focal de la lentille de tube du microscope.

1. filtre coupe-bande étroite permettant de bloquer les lasers d'excitation

2. filtre passe-bande, généralement large, permettant de ne laisser passer que la lumière de fluorescence

Dispositif de détection multi-couleurs Lorsque deux types de fluorophores sont utilisés pour marquer le système biologique, il est nécessaire, pour les observer avec une échelle de temps compatible avec celle des processus biologiques étudiés, d'acquérir les images des fluorophores rapidement voire simultanément. Dans cette situation, un dichroïque (réfléchissant les lasers d'excitation et transmettant la fluorescence des deux fluorophores) et deux filtres Notch (stopant les faisceaux d'excitation) sont placés dans le cube de la tourelle du microscope et deux caméras sont utilisées pour imager les deux marqueurs fluorescents (voir figure 3.5). Un miroir dichroïque (z620sprdc, AHF) est placé après la lentille de tube pour séparer les longueurs d'onde de la fluorescence collectée. Les faisceaux dont la longueur d'onde est inférieure à 620 nm sont transmis et donc directement focalisés dans le plan focal de la lentille de tube sur une caméra EM-CCD (Ixon, Andor), tandis que ceux dont la longueur d'onde est supérieure à 620 nm sont réfléchis et refocalisés par un couple de doublets L_1 et L_2 sur une caméra CCD refroidie (Coolnap, Roper Scientific). Un couple de doublets utilisés en configuration infini/foyer a été choisi plutôt qu'une seule lentille afin de limiter les problèmes d'aberrations. Deux filtres d'émission, F_1 et F_2 , sont placés respectivement devant les caméras Andor et Roper afin de détecter sur chaque voie uniquement la fluorescence correspondant à l'un des fluorophores. Notons que ces filtres sont placés sur le trajet de faisceaux non collimatés et que donc leurs caractéristiques de transmission ne seront pas rigoureusement les mêmes que celles données par le constructeur.

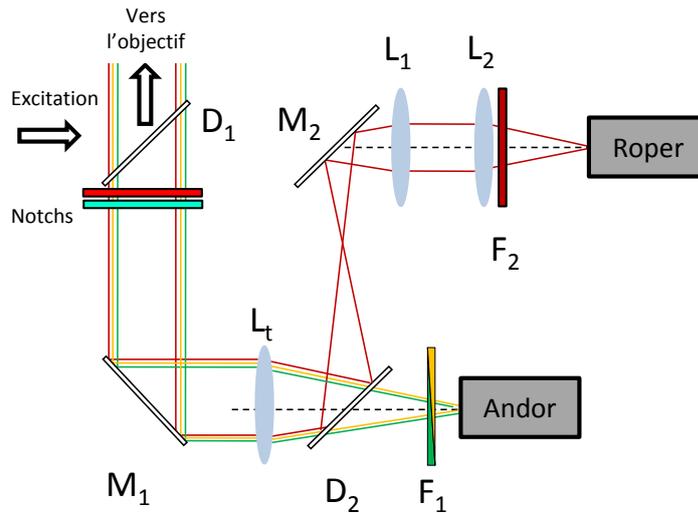


FIGURE 3.5 – Dispositif de détection de fluorescence multi-couleurs. D_1 est le miroir dichroïque permettant de réfléchir les lasers d'excitation vers l'échantillon et de transmettre la fluorescence collectée par l'objectif de microscope. Les filtres Notch placés sous D_1 stoppent efficacement les lasers d'excitation. D_2 est un miroir dichroïque (z620sprdc, AHF) réfléchissant plus de 90% des photons de longueur d'onde supérieure à 620 nm et transmettant 90% de ceux de longueur d'onde comprise entre 480 et 585 nm. M_1 et M_2 sont des miroirs argentiques. Les lentilles L_1 et L_2 (de focales respectives 120 mm et 150 mm) relaient l'image de l'échantillon faite par la lentille de tube L_t sur la caméra Roper. F_1 et F_2 sont des filtres d'émission adaptés aux fluorophores observés.

L'avantage majeur de ce système de détection multicolore par rapport au système précédent monté par David Dulin, du type Dual View, est que l'on peut facilement passer de une couleur à deux couleurs sans perdre sur la taille du champ d'observation. En effet, sur

3.2 Dispositif expérimental

le système précédent il était nécessaire de séparer le capteur pour observer les deux types de fluorophore sur la même caméra, d'où la perte du champ d'observation. On remarquera que l'on peut également compenser plus facilement le chromatisme de l'objectif de microscope et de la lentille de tube en déplaçant l'une des caméras.

Pour superposer les images prises par les deux caméras avec une précision du pixel pour permettre la colocalisation de fluorophores uniques, il convient de connaître les paramètres de superposition des deux images. Des billes de diamètre 200 nm marquées de différents types de fluorophores (de pics d'absorption/émission : 360/430 nm, 505/515 nm, 560/580 nm et 660/680 nm, TetraSpeck microspheres, Invitrogen) sont fixées non spécifiquement sur la surface d'une lamelle de microscope et une image est prise par chaque caméra avec les lasers d'excitation appropriés. Les images sont ensuite importées sous Metaview (Roper Scientific) et les paramètres de colocalisation sont obtenus manuellement (figure 3.6).

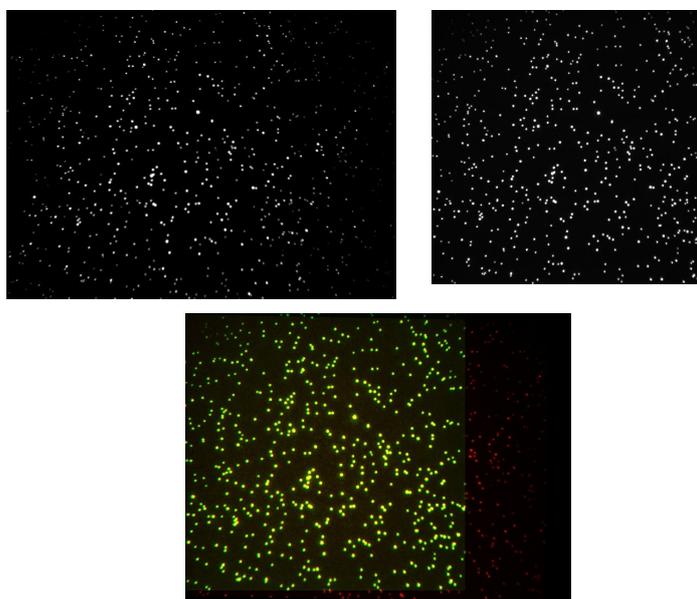


FIGURE 3.6 – Calibration de la position des images sur les deux caméras de détection à l'aide de billes fluorescentes à plusieurs marqueurs. En haut à gauche : image de billes fluorescentes excitées à 638nm prise avec la caméra Roper. En haut à droite : image des mêmes billes excitées à 532nm prise avec la caméra Andor. En bas : superposition des deux images avec des couleurs artificielles. L'image de la Roper est colorée en rouge et celle de la Andor en vert. La superposition des signaux donne alors un signal en jaune. Dans cet exemple, les paramètres utilisés pour la superposition de ces images sont une rotation de 358.5 degrés et une translation de 38 pixels horizontalement et 1 pixel verticalement de l'image de la Roper.

3.2.3 Protocole de chimie de surface et optimisations

Parce qu'en microscopie de TIRF le volume d'excitation est confiné près de la surface, les marqueurs fluorescents et donc le système biologique doivent être fixés à celle-ci. Un traitement de la lamelle est donc nécessaire afin d'y accrocher spécifiquement le système étudié, mais aussi pour minimiser les interactions de nature électrostatique entre ce système et la surface. Une fonctionnalisation de la surface avec de la BSA ou du PEG sera utilisée selon que le système

biologique étudié comprend des protéines ou non. Dans les deux cas, un lavage des lamelles est nécessaire afin d'éliminer les résidus fluorescents. Les lamelles (25 x 25, réf. 12-542C, Fisherbrand ou 24 x 65 mm, Deckgläser, Menzel-Gläser toutes deux de faible autofluorescence) sont rangées dans un rack en verre et soniquées une première fois dans de l'acétone pendant 20 minutes puis deux fois dans de l'eau ultra-pure pendant 20 minutes, cela afin d'enlever les grosses particules et les corps gras. Elles sont ensuite séchées sous une hotte à flux laminaire classe 100 avant de subir un plasma d'oxygène ($P_{O_2} = 0.4$ millibar) pendant 10 minutes pour éliminer les dernières impuretés.

Surface BSA Une fonctionnalisation de la surface avec de la BSA (Bovine Serum Albumin) convient généralement dans les cas où il n'y a pas de protéines impliquées. Son point isoélectrique relativement bas ($pI = 4.7$ dans l'eau) lui confère une charge globale négative à pH 7.5 évitant ainsi que les molécules chargées négativement ne s'y collent. Les oligonucléotides ayant une charge globale négative due à leur chaîne phosphatée, ces surfaces sont donc appropriées. Par contre dans le cas des protéines (où la charge varie selon les protéines), elles présentent un risque de se coller non spécifiquement à une surface BSA. Sur les lamelles préalablement lavées on incube de la BSA-biotinylée (Sigma Aldrich) dissoute à 1g/L dans du tampon TRIS (100 mM) salé (250 mM, NaCl) pendant 10 minutes. La BSA-biotine non adsorbée à la surface est ensuite rincée avec ce même tampon TRIS. Sur cette surface de BSA-biotine, on incube ensuite de la Streptavidine ou bien de la Neutravidine (Invitrogen, Molecular Probes) possédant quatre sites d'accroche à la biotine, puis on rince à nouveau avec du tampon TRIS. On dispose alors d'une surface passivée avec de la BSA ayant des sites d'accroche sur les fonctions avidine pour y fixer le système biologique qui devra donc lui-aussi posséder une biotine.

Surface PEG Lorsque la charge du système biologique n'est pas connue ou n'est pas homogène, le meilleur moyen d'éviter les interactions avec la surface est de fonctionnaliser celle-ci avec une molécule neutre électrostatiquement. C'est le cas du polyéthylène glycol(PEG). Ce polymère ne se fixant pas naturellement à la surface, il est nécessaire de lui créer un site d'accroche. Le PEG utilisé ici comporte une terminaison NHS réagissant avec une fonction amine, une étape intermédiaire consistera donc à fixer une amine à la surface. Le protocole initialement utilisé consiste à activer la surface des lamelles lavées pour y fixer un amino-silane (silanisation), le 3-(aminopropyl) triéthoxysilane (APTES) puis le PEG. Le protocole est le suivant :

1. L'étape de silanisation commence une journée après le nettoyage des lamelles. Ceci afin d'éviter des artefacts potentiels lors de la silanisation dus à une modification de la charge de la surface suite au nettoyage plasma. Les lamelles disposées dans le rack en verre sont placées dans un bain d'acide chlorhydrique à 6M pendant une heure. On rince ensuite abondamment à l'eau ultra-pure puis à l'acétone.
2. Les lamelles sont ensuite placées dans une solution d'APTES diluée dans de l'acétone (2% en rapport des volumes) pendant une heure. Les lamelles sont ensuite rincées avec de l'acétone puis abondamment à l'eau ultra-pure et finalement séchées sous la hotte à flux laminaire pendant une nuit.
3. On utilise ensuite deux types de PEG mélangés : du PEG "simple" (methyl-PEG-succinimidyl Glutarate, MW 5000 Daltons, Laysan Bio, figure 3.7) et du PEG-biotine (Biotin-PEG-succinimidylcarbonate, MW3 5000 Daltons, Laysan Bio, figure 3.8), ces deux types ayant

3.2 Dispositif expérimental

une fonction N-hydroxysuccinimide (NHS) à une extrémité pour les fixer à la surface terminée amine. Ces deux PEG sont dissous dans un rapport 1.25%/12.5% (masse/volume³) dans une solution de bicarbonate de sodium NaHCO₃ (100 mM) à pH = 8.3, fraîchement préparée car elle n'est pas tamponnée. Cette solution est ensuite immédiatement déposée sur les lamelles et incubée pendant 4 heures avant d'être rincée avec du tampon bicarbonate puis du tampon TRIS.

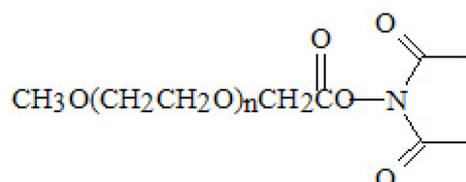


FIGURE 3.7 – Structure du PEG sans biotine terminé NHS (*N*-hydroxysuccinimide).

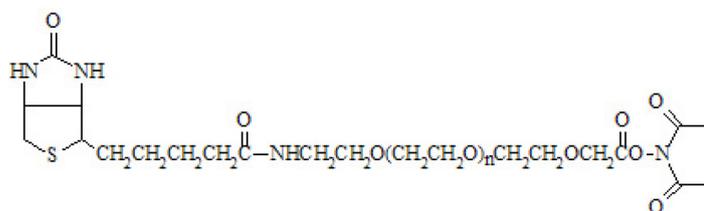


FIGURE 3.8 – Structure du PEG-biotine terminé NHS (*N*-hydroxysuccinimide).

4. Enfin, une solution de Streptavidine ou Neutravidine (respectivement à 0.2 ou 0.1 g/L) est incubée pendant 30 minutes et rincée avec du tampon TRIS pour y accrocher ensuite le système biologique biotinylé.

Le résultat de la fonctionnalisation des lamelles avec du PEG est systématiquement testé en injectant sur deux lamelles une solution à 1 nM d'oligonucléotides marqués en 5' d'un fluorophore et en 3' d'une biotine dans un cas et sans biotine dans l'autre. Dans le cas où l'oligonucléotide est biotinylé, on vérifie que l'on observe bien des fluorophores fixés à la surface après rinçage avec du tampon TRIS, tandis qu'on peut vérifier l'absence de fluorophores dans le cas où l'oligonucléotide n'est pas biotinylé (fig.3.9).

Au cours de cette thèse nous avons pu optimiser ces 3 premières étapes du protocole afin d'écourter leur durée mais aussi d'améliorer certains points critiques pour le bon déroulement des expériences.

1. La première étape d'activation de la surface à l'acide chlorhydrique a été supprimée du protocole. Il s'est en effet avéré que le nettoyage plasma remplissait déjà la fonction d'activation de la surface. Les lamelles sont donc nettoyées au plasma d'oxygène pendant 5 minutes juste avant l'étape d'incubation dans l'APTES.
2. L'étape de fixation de l'aminosilane APTES sur la surface, bien que nécessaire, posait un problème pour l'observation de fluorophores uniques dont le spectre d'émission est en-dessous de 600 nm. Bien que les produits utilisés soient ultra-purs, on observait un fond

3. La concentration en pourcentage massique est le rapport de la masse du soluté (en grammes) sur le volume de la solution (en millilitres) multiplié par 100.

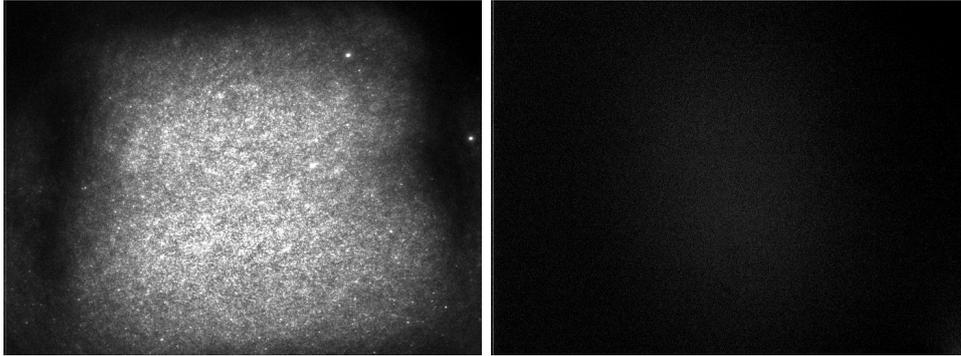


FIGURE 3.9 – Test de la fonctionnalisation PEG-biotine-streptavidine des lamelles. Des oligonucléotides marqués Cy5, avec (gauche) et sans biotine (droite). Puissance laser à 638 nm à l'entrée du microscope : 17mW. Durée d'exposition : 100ms. Niveaux de gris min-max de l'image de gauche : 158-365 et de l'image de droite 158-242.

de fluorescence assez important apparaissant juste après l'étape de silanisation. L'origine de cette fluorescence est en fait due à la fluorescence dans le vert de l'aminosilane lui-même [118]. En réduisant le temps d'incubation de celui-ci à 15 minutes, nous n'avons pas observé de différence sur la qualité de passivation du PEG mais par contre une nette diminution de la fluorescence de la couche d'aminosilane accrochée à la surface.

3. La dissolution de la poudre de bicarbonate s'accompagnant d'un dégagement de CO_2 , des bulles apparaissent alors dans le canal de la cellule microfluidique. La présence de ces bulles pose plusieurs problèmes puisque d'une part elles créent des zones inhomogènes sur la surface (zones non fonctionnalisées), et d'autre part elles peuvent se déplacer jusqu'à une zone d'observation pendant une expérience. Pour remédier à ce problème nous avons remplacé la solution de dissolution du PEG par du tampon borate de pH 8.8. La fonction NHS du PEG étant extrêmement instable en solution aqueuse (temps de demi-vie de 17 minutes à pH 8) les durées d'incubation du PEG sur les lamelles ont également été écourtées de 4 heures à 1 heure.

3.3 Compléments apportés au montage

3.3.1 Cellules microfluidiques

Travailler avec des cellules microfluidiques permet de faire des économies considérables en produits à injecter. Etant donné que seuls quelques mm^2 de la surface de la lamelle de microscope sur une profondeur n'excédant pas les 100 nm sont utilisés pour observer des processus biologiques, il suffit d'injecter les produits dans des canaux microfluidiques de section de quelques centaines de μm^2 . Au cours de cette thèse nous avons travaillé avec deux types de cellules microfluidiques "faites maison". Les premières, qui consistaient à injecter les produits en les poussant (pression positive dans la cellule), ont été remplacées par des cellules plus économes dont le principe est d'injecter les produits en les aspirant (pression négative).

Cellules à pression positive Les cellules sont constituées d'une lame de microscope standard en verre d'épaisseur 3 mm, percée de deux trous de diamètres \varnothing 0.8 mm espacés de 33 mm,

3.3 Compléments apportés au montage

scotchée à une lamelle de microscope (préalablement nettoyée ou silanisée). Le scotch double face d'épaisseur $200\ \mu\text{m}$ est d'abord déposé sur la lame et un canal de largeur $3\ \text{mm}$ et de longueur $35\ \text{mm}$ est découpé avec une lame de rasoir. La lamelle est ensuite déposée sur le scotch et est ainsi solidement attachée à la lame. Le capillaire pour l'injection possède un diamètre interne de $150\ \mu\text{m}$ pour une longueur de $30\ \text{cm}$ et est connecté à une seringue par un adaptateur (P-662 Microtight, Upchurch scientific) et par son autre extrémité à la lame par un adaptateur différent (6-32 FB NanoPort, Upchurch scientific). Le plot de sortie de la cellule est quant à lui constitué de PDMS dans lequel est inséré un tube de $300\ \mu\text{m}$ de diamètre interne pour l'évacuation des produits.

De telles cellules nécessitent d'injecter $40\ \mu\text{l}$ de produits pour remplir le canal dont plus de la moitié est "perdue" dans les volumes morts du tuyau et des connecteurs. Un pousse-seringue (PHD 2000, Harvard-Apparatus) permet d'injecter les produits avec un débit constant (typiquement $100\ \mu\text{l}/\text{min}$). L'utilisation de seringues pour l'injection pose toutefois un problème lors de l'utilisation de produits visqueux tels que les extraits cellulaires pour les expériences avec le ribosome. Lors de l'insertion du produit dans la seringue, il est souvent difficile d'empêcher la formation de bulles dans la solution. Pour éviter alors d'injecter ces bulles en même temps que le produit, il convient d'insérer un volume plus important dans la seringue et d'en injecter une partie seulement tout en penchant la seringue pour que les bulles se regroupent au niveau du piston.

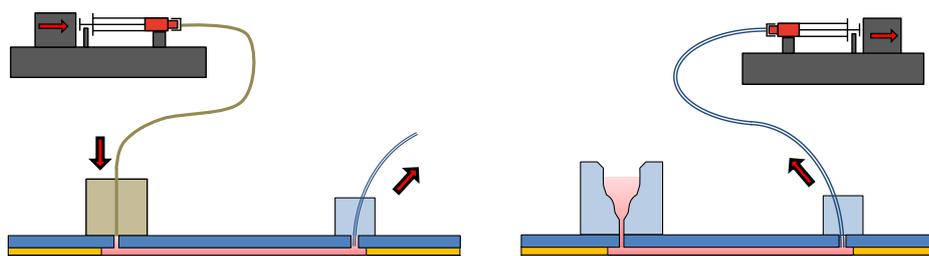


FIGURE 3.10 – Cellules microfluidiques. A gauche : les produits déposés dans une seringue sont injectés dans la cellule via un capillaire de diamètre interne $150\ \mu\text{m}$ et de longueur $30\ \text{cm}$. A droite : les produits sont déposés dans un réservoir à l'entrée du canal microfluidique et sont injectés en aspirant avec une seringue par l'autre extrémité de la cellule. Pour les deux types de cellules microfluidiques la vitesse d'injection est contrôlée par un pousse-seringue.

Cellules à pression négative Un deuxième type de cellule microfluidique a été mis au point. Celui-ci possède un réservoir dans lequel les produits sont déposés avant d'être aspirés dans le canal. Pour ce faire, la seringue est branchée sur le tuyau de sortie et le pousse-seringue a été modifié de sorte que la partie amovible tire sur le piston de la seringue au lieu de pousser. On garde ainsi un système d'injection des produits à débit constant et contrôlable. Ce système possède trois avantages majeurs par rapport au premier type de cellules. D'une part il n'y a plus de perte de produits dans les volumes morts des tuyaux d'injections. Pour ces cellules il ne faut déposer dans le réservoir que le volume nécessaire pour remplir le canal, soit une vingtaine de microlitres. D'autre part, on évite l'injection de bulles dans les cellules puisque la seringue n'est utilisée qu'au niveau de la sortie. Enfin, en aspirant, on applique dans la cellule une pression négative limitant les risques de fuites des produits.

Vitesse d'injection Lors du rinçage des produits incubés ou même de l'injection des extraits cellulaires pour les expériences avec le ribosome, on peut se poser la question de l'influence des forces de friction qui s'appliquent sur le système biologique par le flux dans le canal. Ces forces de friction s'expriment comme le produit du coefficient de friction du milieu par la vitesse du liquide à l'endroit considéré dans le canal. Pour un débit d'injection de $100 \mu\text{l}/\text{min}$ dans un canal de section $200 \mu\text{m}$ sur 3mm , la vitesse moyenne du liquide vaut alors $2.78 \text{mm}/\text{s}$. Nous allons voir ci-après comment estimer la vitesse locale connaissant cette vitesse moyenne. Le coefficient de friction est quant à lui corrigé des effets de surface en utilisant la loi de Faxen (equ. 2.20) connaissant la distance à la surface et la dimension du système biologique considéré.

Le nombre de Reynolds est un nombre sans dimension permettant de caractériser la nature d'un écoulement. Ce nombre s'écrit :

$$Re = \frac{Ud}{\nu} \quad (3.4)$$

avec U la vitesse du fluide, d la dimension caractéristique du système et ν la viscosité cinématique du liquide. Pour un écoulement d'eau (de viscosité cinématique de $0.884 \cdot 10^{-6} \text{m}^2/\text{s}$ à 25 degrés) de vitesse moyenne $2.78 \text{mm}/\text{s}$ dans notre canal d'épaisseur $200 \mu\text{m}$, le nombre de Reynolds vaut $Re = 0.63$. Or, lorsque la valeur de ce nombre est inférieure à 1, l'écoulement est laminaire (absence de turbulences). Le champ de vitesse d'un liquide entre deux plaques situées en $z = \pm h/2$ pour un écoulement laminaire s'écrit :

$$v(z) = v_{max} \left(1 - \frac{4z^2}{h^2} \right) \quad (3.5)$$

On peut en utilisant cette équation exprimer la vitesse moyenne sous la forme :

$$v_{moy} = \frac{v_{max} \int_{-h/2}^{h/2} \left(1 - \frac{4z^2}{h^2} \right) dz}{h} \quad (3.6)$$

d'où la vitesse maximale $v_{max} = 3v_{moy}/2$. On peut donc en utilisant l'équation 3.5 calculer la vitesse locale dans le canal et donc calculer les forces de friction sur un système biologique fixé à la surface. Dans le cas d'un ribosome complexé sur un ARNm assimilé à une sphère de rayon 15nm à une distance de 50nm de la surface, cette force vaut alors 1.4fN (pour une vitesse d'injection de $100 \mu\text{l}/\text{min}$ dans notre canal d'épaisseur $200 \mu\text{m}$) tandis que dans le cas d'une bille de rayon 500nm positionnée à $2 \mu\text{m}$ de la surface via un ADN, la force de friction s'élève à 1.8pN .

Ces calculs ne prétendent pas donner des valeurs exactes des forces de friction mais permettent néanmoins d'avoir un ordre de grandeur des forces exercées sur le système biologique lors du rinçage des cellules microfluidiques. On pourra ainsi être confiant lors des expériences sur le ribosome que le rinçage ne risque pas de décrocher notre système biologique de la surface. Pour les expériences de pince optique il sera cependant plus prudent de rincer les canaux avec des débits plus faibles, de l'ordre de $10 \mu\text{l}/\text{min}$ (soit des forces de friction de 0.18pN).

3.3.2 Contrôle en température de la cellule microfluidique

La température est souvent un paramètre important pour les études de processus biologiques. C'est le cas par exemple de la synthèse des protéines par le ribosome dont la cinétique

3.3 Compléments apportés au montage

dépend fortement de la température. Il est donc préférable pour se placer dans les conditions optimales de pouvoir contrôler ce paramètre. Nous avons conçu à cet effet un support permettant d'accueillir une cellule microfluidique et de réguler sa température à une trentaine de degrés (figure 3.11). Pour ce faire un module Peltier est fixé à une extrémité d'un support en cuivre afin de chauffer ou refroidir l'ensemble. Une sonde placée à environ 1 cm du module Peltier mesure la température et un asservissement électronique régule le courant traversant le Peltier de sorte que la valeur mesurée par la sonde corresponde à une température de consigne. Ce système permet ainsi de thermaliser la cellule microfluidique placée sur le support à une trentaine de degrés en quelques minutes. Pour éviter une déperdition de chaleur de la cellule microfluidique à travers l'objectif de microscope, ce dernier est entouré d'une gaine chauffante permettant de contrôler indépendamment sa température. On obtient par ce système un contrôle de la température de la cellule microfluidique avec une précision de l'ordre de ± 1 degré.

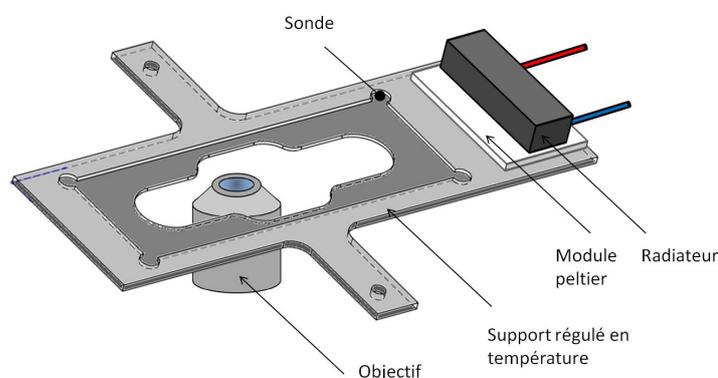


FIGURE 3.11 – Contrôle en température de la cellule microfluidique. La cellule est placée sur un support en cuivre sur lequel est monté un module Peltier chauffant ou refroidissant l'ensemble pour atteindre une valeur de consigne. Un radiateur monté sur le module Peltier permet d'aider ce dernier à dissiper sa chaleur. Une gaine chauffante est enroulée autour de l'objectif pour thermaliser celui-ci avec la cellule microfluidique et ainsi éviter des fuites de chaleur vers le bâti du microscope.

3.3.3 Autofocus

Garder la mise au point sur un échantillon sur des échelles de temps relativement longues (plusieurs minutes) pose souvent des difficultés dues aux dérives lentes du système (dérives mécaniques de l'objectif par exemple). De plus, dans notre cas, l'injection des produits entraîne une dilatation ou une compression de la chambre microfluidique causant une perte de la mise au point sur l'échantillon. Pour pallier ce problème, nous avons incorporé au montage un système de mise au point automatique. Celui-ci utilise la position du faisceau totalement réfléchi à l'interface lamelle-échantillon pour rétroagir sur la position verticale de la platine piézoélectrique [119, 120]. Une dérive verticale de la position relative de l'échantillon par rapport à l'objectif entraîne une déviation du faisceau retour (figure 3.12). En imposant une position à ce dernier on peut alors contrôler la distance entre l'échantillon et l'objectif et donc la mise au point. Pour ce faire le signal mesuré par une photodiode à quatre quadrants (QPD) positionnée sur le trajet du faisceau retour est numérisé et exploité sous Labview. Un régulateur PID

(proportionnel intégral dérivé) est programmé pour réguler la position verticale de la platine piézoélectrique afin que le faisceau totalement réfléchi soit toujours positionné au même endroit sur la QPD.

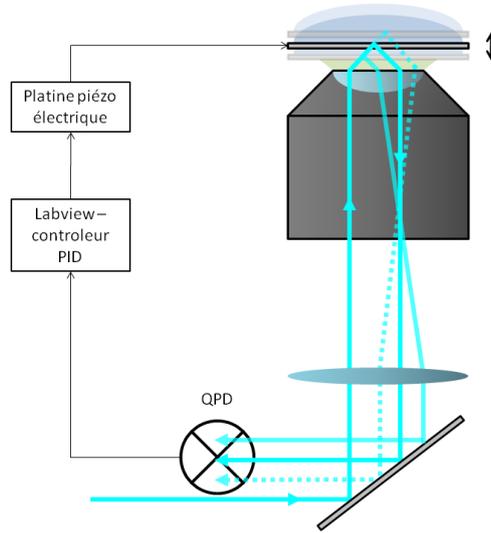


FIGURE 3.12 – Principe du contrôle automatique de la mise au point. La direction du faisceau totalement réfléchi à l'interface lamelle/échantillon dépend de la distance séparant l'objectif de l'échantillon et donc de la mise au point. En rétroagissant sur la position verticale de la platine piézoélectrique pour que le faisceau retour prélevé par une lame séparatrice soit toujours positionné au même endroit sur une photodiode quatre quadrants on peut alors garder la mise au point sur l'échantillon.

Parce que dans notre situation l'éclairement de l'échantillon n'est pas continu mais synchronisé avec l'acquisition des images, on ne peut pas utiliser le faisceau d'excitation pour contrôler suffisamment rapidement la mise au point sans détériorer la qualité de l'image. On utilise alors un second faisceau (faisceau sonde) issu du même laser (bleu ou vert) légèrement décalé afin qu'il n'excite pas les fluorophores dans la zone d'observation. Pour ce faire un cube séparateur de polarisation est placé après une lame demi-onde sur le trajet des faisceaux vert et bleu afin de prélever une fraction du faisceau en tournant une lame réglable demi-onde (figure 3.13). Un second cube séparateur de polarisation placé après le télescope permet de recombinaison le faisceau sonde sur le trajet du faisceau d'excitation avec un léger décalage introduit à l'aide du miroir M5. Le faisceau sonde n'étant pas agrandi par le télescope, sa zone d'excitation dans le plan de l'échantillon sera petite (typiquement quelques microns de côté) et située en dehors de la zone d'observation. Le faisceau sonde totalement réfléchi à l'interface lamelle/échantillon est séparé du faisceau principal d'excitation par un diaphragme et un polariseur et sa position est mesurée par une photodiode à quatre quadrants.

Le signal issu de la QPD est amplifié et filtré par un circuit électronique (le filtre, de fréquence de coupure 10 Hz, permet d'amortir les oscillations de la rétroaction). Le signal est ensuite numérisé (USB-6008, National instrument) pour être traité sous Labview. Typiquement on observe une relation linéaire de la réponse de la QPD sur 2 V pour un déplacement vertical de la platine de $1.2 \mu\text{m}$ (celle-ci dépend de la taille des quadrants de la QPD, ici de 3 mm, et de la taille du faisceau sonde, ici de $\approx 1 \text{ mm}$). La gamme de tensions analogiques de la carte USB-6008 étant de -10 à 10 V codées sur 12 bits, on a donc une résolution théorique de 3 nm

3.4 Conclusion

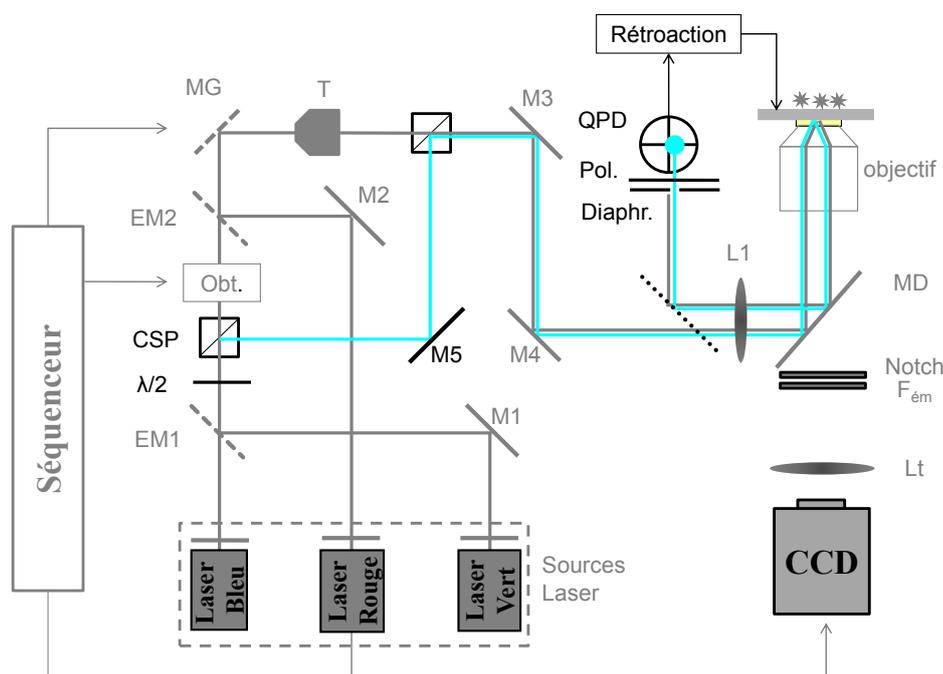


FIGURE 3.13 – Mise en place du faisceau sonde pour la mise au point automatique sur l'échantillon. Une fraction du faisceau d'excitation est prélevée par un cube séparateur de polarisation (CSP) et renvoyée sur le trajet du faisceau principal avec un léger décalage à l'aide du miroir M5. Une lame demi-onde ($\lambda/2$) placée devant le premier CSP permet d'ajuster la puissance du faisceau sonde. Ce dernier, totalement réfléchi à l'interface lamelle/échantillon, est ensuite séparé du faisceau principal d'excitation par un diaphragme (Diaphr.) et un polariseur (Pol.) et sa position est mesurée par une photodiode à quatre quadrants (QPD).

sur la mise au point limitée par la conversion analogique/numérique. Le temps de réponse de la rétroaction est quant à lui d'une centaine de millisecondes, limité par le filtre passe bas du circuit électronique de la QPD.

Ce système de mise au point automatique possède donc une résolution spatiale et temporelle suffisante pour nos expériences, tout en fonctionnant sur une gamme de déplacements supérieure aux pertes de mise au point observées lors de l'injection des produits dans nos cellules microfluidiques. On notera cependant que l'asservissement reste très sensible à la présence de bulles d'air, souvent présentes dans l'huile pour l'immersion de l'objectif de microscope, ainsi qu'à des variations de l'indice du milieu d'observation (passage d'une bulle d'air par exemple) puisqu'elles provoquent des variations de l'intensité du faisceau sonde réfléchi et donc une perte de la mise au point.

3.4 Conclusion

Nous avons dans ce chapitre décrit le montage de TIRF qui sera utilisé pour les expériences de fluorescence pour l'étude de la photophysique d'un fluorophore, le Bodipy-Fl, et de la cinétique du ribosome, qui font l'objet des deux chapitres suivants. Nous avons adapté notre dispositif de microscopie de fluorescence afin d'observer des systèmes biologiques marqués par

un ou deux types de fluorophores dont les images sont faites sur deux caméras différentes. Le dispositif actuel ne permet cependant la visualisation que de deux fluorophores uniquement et nécessite un recadrage des images pour permettre a posteriori la colocalisation de fluorophores uniques. De nouvelles modifications du montage de détection sont en cours afin de visualiser successivement sur la même caméra plusieurs fluorophores. Pour ce faire une roue motorisée permet de positionner sur le trajet optique un filtre d'émission parmi les six disponibles dans les différents emplacements de la roue, avec un temps de réponse de 50 ms. Cette roue est synchronisée avec l'acquisition des images via le séquenceur et est placée entre deux lentilles permettant de relayer l'image du plan d'observation, faite par la lentille de tube du microscope, sur la caméra CCD Andor. Une fois finalisé, ce dispositif permettra de simplifier le montage de détection ainsi que l'analyse des images (pour la colocalisation), mais aussi de visualiser davantage de fluorophores, avec des échelles de temps toujours compatibles avec celles des processus biologiques observés, sans avoir à accéder au montage pour changer les filtres d'émission.

Les systèmes biologiques étudiés seront fixés sur des lamelles de microscope dont la surface est chimiquement modifiée pour y accrocher une biotine et éviter les interactions non spécifiques. L'optimisation des protocoles de chimie de surface a permis de considérablement réduire le temps de préparation des expériences ainsi que de réduire le fond de fluorescence de l'aminosilane. La principale limitation au rapport signal sur bruit des signaux de molécules uniques reste l'autofluorescence des impuretés contenues dans les lamelles de microscope en silice utilisées. Pour pallier ce problème nous testons actuellement des lamelles de quartz qui devront être détachables des cellules microfluidiques pour pouvoir être recyclées et ainsi limiter le coût des expériences (le prix d'une lamelle de quartz étant d'environ 30 euros). Pour se placer dans les conditions optimales d'observation de la cinétique de traduction du ribosome, nous avons également incorporé au montage un support permettant de thermaliser la cellule microfluidique à une température d'une trentaine de degrés ainsi qu'un système de mise au point automatique sur l'échantillon.

Amélioration des propriétés photophysiques de fluorophores organiques

La microscopie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique permet entre autres d'accéder aux états conformationnels et à la dynamique de processus biologiques avec des résolutions spatiale et temporelle inaccessibles par des mesures d'ensembles. Cette technique repose sur le choix de marqueurs fluorescents performants mais aussi compatibles avec les phénomènes biologiques étudiés (toxicité, encombrement stérique et possibilité de marquage). Les fluorophores organiques sont très populaires pour leur petite taille et leur compatibilité de marquage avec les systèmes biologiques, mais leur utilisation reste limitée due à leur clignotement et leur photoblanchiment inhérents. Leurs propriétés photophysiques sont très étudiées afin d'étendre leur stabilité et leur durée de vie sur des échelles de temps toujours plus longues. Il est maintenant connu que l'oxygène joue un rôle important dans la photostabilité de tels fluorophores en solution. A la fois responsable de la mort prématurée du fluorophore mais aussi limitant son clignotement, il ne peut être simplement retiré de la solution. Tinnefeld et al. ont développé une technique pour substituer l'oxygène par un couple d'oxydant et réducteur et ont montré son efficacité pour l'amélioration des propriétés photophysiques sur différentes familles de fluorophores émettant dans des longueurs d'onde du jaune au rouge [121–123]. Dans ce chapitre, nous nous inspirons de leur technique et montrons son applicabilité à un fluorophore émettant dans le vert : le Bodipy-Fl. Ces travaux ont donné lieu à une publication [2]. Du fait de sa très petite taille, ce fluorophore a un intérêt particulier pour le marquage de systèmes biologiques où l'encombrement stérique est un enjeu. C'est le cas notamment pour nos études sur le ribosome puisque le Bodipy-Fl est commercialisé attaché sur un acide aminé, la lysine, avec son ARN de transfert. Sa petite taille lui permet alors de passer le tunnel de sortie du ribosome et donc d'être incorporé dans une protéine lors de la traduction. On peut donc espérer, en prolongeant la durée de vie du Bodipy-Fl, suivre l'incorporation des lysines dans une protéine. Pour clore ce chapitre, nous montrerons que l'étude effectuée ici sur le Bodipy-Fl pourrait également être étendue à d'autres fluorophores de la même famille ainsi que d'autres fluorophores émettant dans le vert.

4.1 Cas général : mécanisme de la fluorescence

4.1.1 Principe de la fluorescence et problèmes intrinsèques aux fluorophores

La fluorescence La fluorescence est la propriété d'une molécule à absorber un rayonnement lumineux et à restituer l'énergie absorbée sous forme de rayonnement de lumière d'énergie plus faible. Le diagramme de Jablonski de la figure 4.1 permet de comprendre ce phénomène

à partir des niveaux énergétiques de la molécule. Une fois le photon d'excitation absorbé, la molécule passe d'un état fondamental S_0 à un état excité S_1 , suite à quoi elle se désexcite non radiativement pour descendre à des niveaux plus bas de l'état excité, avant d'émettre un photon d'énergie plus faible pour retourner au niveau fondamental. La durée de vie de l'état excité dépend des fluorophores et de l'environnement mais est généralement de l'ordre de la nanoseconde. Plus celui-ci sera court et plus le fluorophore pourra être considéré comme un bon émetteur.

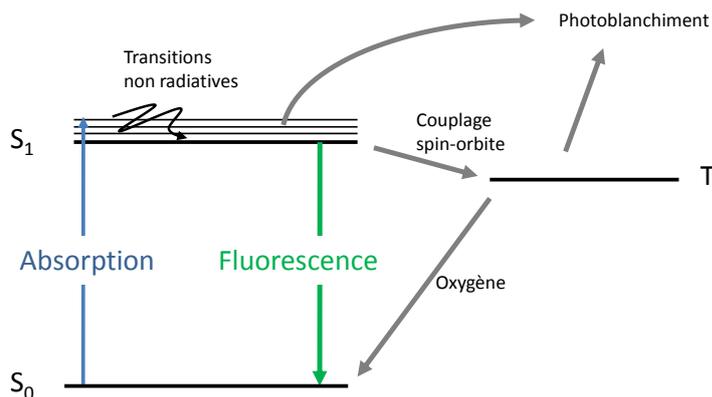


FIGURE 4.1 – Diagramme de Jablonski. Le fluorophore absorbe un photon d'excitation l'emmenant de son état fondamental S_0 à un état excité S_1 , puis redescend à l'état S_0 en émettant un photon de fluorescence. Depuis l'état S_1 la molécule peut passer dans un état triplet T dans lequel elle n'émet plus de photons. L'oxygène présent dans l'environnement permet de réduire la durée de vie de cet état mais est également responsable du photoblanchiment de la molécule.

Le clignotement Lorsque l'intensité de fluorescence d'un fluorophore est mesurée, on peut observer des variations d'intensités assimilables à des états allumés ou éteints de la molécule. L'existence de ces états "noirs" de la molécule dans lesquels elle n'émet plus de photons peut avoir plusieurs origines.

- Passage de la molécule dans un état triplet. Par couplage spin-orbite, la molécule peut passer de son état excité à l'état triplet. Selon les fluorophores la durée de vie dans cet état peut durer de quelques microsecondes à plusieurs centaines de millisecondes, pendant lesquelles la molécule cesse d'émettre des photons. Parce que l'oxygène possède également un état fondamental triplet, un échange d'électron est alors possible entre le fluorophore et l'oxygène, renvoyant le fluorophore dans son état fondamental et créant un oxygène dans un état singulet, alors très réactif.
- Par transfert d'électron. Le fluorophore dans son état excité est susceptible de gagner ou céder un électron à son environnement. La molécule rentre alors dans un état noir jusqu'à ce qu'un nouveau transfert d'électron lui permette de revenir dans son état fondamental.
- Par réactions photo-chimiques réversibles. C'est le cas par exemple des fluorophores de la famille des Cyanines susceptibles de changer de conformation depuis leur état excité. Si les deux formes de la molécule possèdent des propriétés optiques différentes alors celle-ci est susceptible de clignoter.

4.1 Cas général : mécanisme de la fluorescence

Le photoblanchiment Le photoblanchiment est la perte définitive de la fluorescence de la molécule. Ses mécanismes sont encore mal connus et dépendent probablement des fluorophores et de leur environnement. L'oxygène a toutefois pu être identifié comme étant un acteur majeur des processus de photoblanchiment de la plupart des fluorophores. Cependant, comme on l'a vu précédemment, il accélère aussi la désexcitation de l'état triplet des fluorophores et le retirer de l'environnement va rallonger la durée des clignotements.

4.1.2 Améliorations des propriétés photophysiques des fluorophores

De nombreuses études visant à remédier aux problèmes de clignotements dus à l'état triplet et de photoblanchiment des fluorophores peuvent être trouvées dans la littérature. Extraire l'oxygène du milieu allonge la durée de vie des fluorophores mais ne permet pas de résoudre leur problème de clignotement. On peut trouver dans la littérature des solutions fonctionnant au cas par cas en rajoutant un ou plusieurs anti-oxydants dans une solution anaérobie, ceci afin de remplacer l'oxygène pour vider l'état triplet. Récemment une solution plus générale a été proposée par Tinnefeld et al. qui a priori fonctionne pour la plupart des fluorophores [121]. Celle-ci consiste à ajouter à la solution déplétée en oxygène un oxydant et un réducteur, afin de vider l'état triplet et ramener le fluorophore dans l'état fondamental, et son efficacité a été démontrée pour des fluorophores émettant du jaune au rouge. Après un descriptif du ROXS, nous montrerons dans la suite de ce chapitre son applicabilité à un fluorophore émettant dans le vert : le Bodipy-Fl.

4.1.2.1 Description du mangeur d'oxygène

Pour dépletter le milieu en oxygène, de nombreuses études utilisent le GODCAT. Ce système est basé sur une première réaction entre du glucose et du glucose oxydase consommant l'oxygène du milieu, ainsi qu'une seconde réaction entre le peroxyde d'hydrogène produit par la première réaction et une catalase pour former des molécules d'eau (figure 4.2).

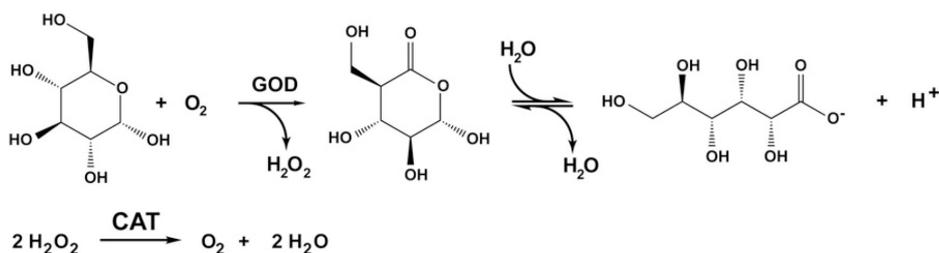


FIGURE 4.2 – Principe du GODCAT. La glucose oxydase réagit avec le glucose pour former de l'acide gluconique qui se transforme spontanément en gluconolactone. La catalase réagit ensuite avec le peroxyde d'hydrogène pour former de l'eau.

Nous avons testé ce système pour l'étude de la photophysique du Bodipy-fl et avons observé que lorsque l'on dépletait le milieu en oxygène on perdait en grande partie la fluorescence du Bodipy, tandis qu'en rinçant avec du tampon TRIS, contenant de l'oxygène, on recouvrait cette fluorescence (figure 4.3). Ce résultat est cohérent avec le fait que l'oxygène est un inhibiteur de l'état triplet de la molécule. En effet, en retirant l'oxygène du milieu, le Bodipy passe plus de temps dans un état noir et donc la quantité de photons émis diminue fortement. Ce résultat

montre l'utilité d'utiliser un substitut de l'oxygène pour ramener le fluorophore de l'état triplet vers l'état fondamental lorsque l'on travaille en milieu anaérobie.



FIGURE 4.3 – Images d'un échantillon de Bodipy-Fl prises successivement (sur des zones différentes) avant injection de GODCAT (gauche), avec GODCAT (milieu) et après rinçage du GODCAT avec un tampon tris salé (droite). L'appauvrissement en oxygène conduit à une diminution du signal de fluorescence (milieu) que l'on restaure en réoxygénant (droite). Durée d'acquisition : 100 ms. Intensité moyenne du faisceau incident $I = 400 \text{ W/cm}^2 @ 488 \text{ nm}$.

Nous avons toutefois observé un phénomène gênant lié à l'utilisation du GODCAT. Systématiquement, après quelques minutes d'incubation dans la cellule, une augmentation du fond de fluorescence apparaît sur la lamelle. Ce fond, peu perceptible pour l'observation de fluorophores émettant dans le rouge, est critique pour la visualisation de fluorophores émettant dans le vert. L'origine de celui-ci n'ayant pu être déterminée et l'incompatibilité de ce système enzymatique avec l'utilisation de certains extraits cellulaires [124,125] dont nous nous servons pour les études sur la traduction, nous ont donc amenés à chercher une alternative au GODCAT.

Dans [125], Aitken et al. décrivent un autre système enzymatique pour retirer l'oxygène du milieu de façon plus efficace que le GODCAT, tout en étant compatible avec l'utilisation d'extraits cellulaires. Ce système, décrit sur la figure 4.4, utilise la réaction de l'acide protocatéchuïque (PCA) avec l'oxygène en présence d'une enzyme, le protocatéchuate 3,4 - dioxygénase (PCD). En utilisant ce système, les auteurs ont observé une consommation de l'oxygène plus efficace par rapport au GODCAT et une meilleure extension de la durée de vie des fluorophores Cy3, Cy5 et Alexa488. Nous avons appliqué ce système pour l'observation du Bodipy-Fl en mi-

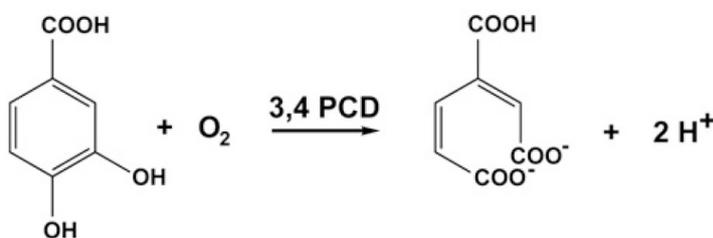


FIGURE 4.4 – En présence de protocatéchuate 3,4 - dioxygénase (PCD) l'acide protocatéchuïque (PCA) réagit avec une molécule d'oxygène pour former deux protons et une molécule d'acide β -carboxy-cis, cis-muconique.

lieu anaérobie et avons pu faire les mêmes constatations qu'avec le GODCAT, à savoir une

4.1 Cas général : mécanisme de la fluorescence

nette diminution de la fluorescence de la molécule en l'absence d'oxygène. Nous n'avons par contre pas observé d'apparition de fond de fluorescence sur la lamelle, d'où notre choix de ce système enzymatique pour l'étude de la photostabilité du Bodipy-Fl.

4.1.2.2 Ajout d'anti-oxydants

Afin de maximiser les taux de transition entre l'état fondamental et excité des fluorophores, de nombreuses études proposent l'ajout d'anti-oxydants dans la solution [125–127] afin d'inhiber l'état triplet. Le Trolox étant l'un des plus populaires et de ceux qui ont un effet sur le plus grand nombre de fluorophores, nous l'avons testé. Nous avons confirmé son efficacité sur du Cy5 ou l'ATTO655 mais il s'est montré insuffisant sur le Bodipy-Fl. Nous avons alors testé différents anti-oxydants pour restituer la fluorescence du Bodipy en milieu anaérobie tels que le BME, le n-Propylgallate ou encore l'acide ascorbique mais sans résultat satisfaisant.

4.1.2.3 Solution générale : le ROXS

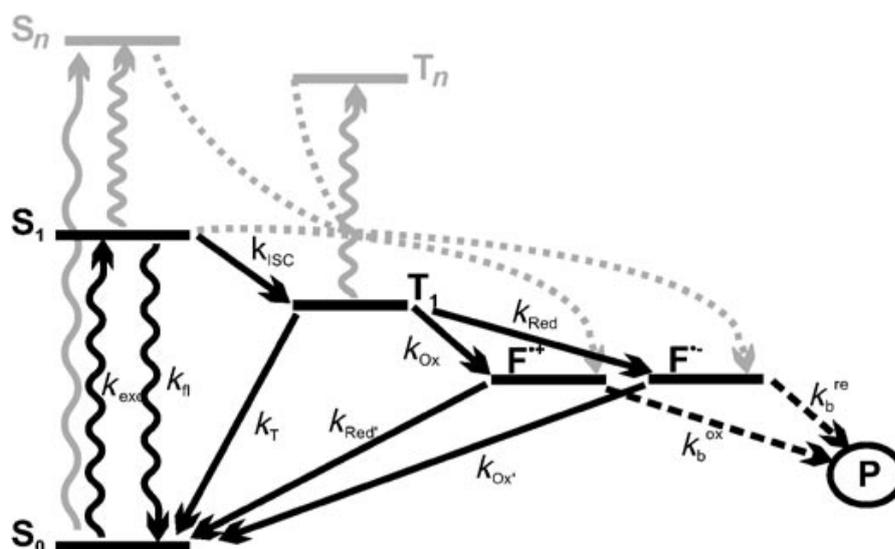


FIGURE 4.5 – Schéma de principe du ROXS. Après absorption d'un photon d'excitation, le fluorophore peut soit directement retourner vers l'état fondamental par émission d'un photon de fluorescence avec un taux k_{fl} , soit passer dans l'état triplet par un processus non radiatif de taux k_{ISC} . Le fluorophore peut ensuite prendre deux "chemins" pour redescendre à son état fondamental en passant par des états intermédiaires : soit en étant oxydé il passe alors par un état radical cation $F^{\bullet+}$, soit en étant réduit il passe par un état radical anion $F^{\bullet-}$. Le fluorophore retourne ensuite vers son état fondamental en étant respectivement réduit ou oxydé. La rapidité de ces processus d'oxydation et de réduction permet ainsi de concurrencer et donc de limiter les réactions emmenant la molécule dans un état photoblanchi P. Les niveaux d'énergie représentés en gris indiquent les possibilités d'autres processus intermédiaires.

Une étude récente de Tinnefeld et al. a permis de comprendre les mécanismes d'action des anti-oxydants sur les fluorophores et de prévoir leur efficacité [121]. En se basant sur cette étude, ils proposent une stratégie afin de substituer efficacement l'oxygène pour une grande catégorie

de fluorophores. Cette stratégie, nommée ROXS (Reducing and OXydizing System) consiste en l'utilisation d'un réducteur et d'un oxydant pour vider l'état triplet des fluorophores en milieu anaérobie. Le principe du fonctionnement du ROXS est détaillé sur la figure 4.5. Après que le fluorophore est passé dans l'état triplet, il peut être réduit par l'agent réducteur l'emmenant dans un état radical anion $F^{\bullet-}$. Celui-ci est ensuite rapidement oxydé par l'agent oxydant vers le niveau fondamental. De la même manière, le fluorophore dans l'état triplet peut d'abord être oxydé vers un état radical cation $F^{\bullet+}$ puis réduit vers l'état fondamental. La rapidité de ces processus permet de concurrencer les réactions susceptibles de photoblanchir le fluorophore, tout en limitant le clignotement.

En utilisant les équations de Rehm-Weller [128] pour calculer la variation d'énergie libre de chaque réaction, il est possible de prévoir si le choix de l'oxydant et du réducteur est approprié pour ramener le fluorophore jusqu'à son état fondamental. Les auteurs détaillent leurs calculs dans le cas du Cy5 et confirment expérimentalement que dans un milieu déplété en oxygène (par une solution de GODCAT) l'ajout d'un réducteur, l'acide ascorbique (AA), et d'un oxydant, le methyl viologène (MV), améliore grandement la durée de vie ainsi que la stabilité du fluorophore.

4.2 Photophysique du Bodipy-FL

4.2.1 Le Bodipy-FL

Le Bodipy-Fl est un petit fluorophore dont l'absorption est maximale à 502 nm et l'émission à 511 nm. Il est particulièrement intéressant dans nos études sur le ribosome car il est disponible commercialement attaché sur un acide aminé, la lysine, avec son ARN de transfert. Du fait de sa petite taille, il peut passer le tunnel de sortie du ribosome et donc être incorporé dans une protéine lors de la traduction. Ce complexe est d'ailleurs couramment utilisé par les biologistes pour marquer les lysines incorporées dans les protéines et ainsi confirmer l'activité du ribosome.

Les propriétés photophysiques de ce fluorophore sont toutefois médiocres pour une observation en molécule unique. Il photoblanchit rapidement et émet peu de photons. Nous avons donc été amenés à l'étudier en vue de caractériser ses propriétés photophysiques et d'améliorer ses conditions d'observation, à savoir les puissances optimales d'excitation mais aussi l'environnement le mieux adapté. Pour ce faire, nous avons caractérisé la photophysique du Bodipy dans deux environnements : dans du tampon TRIS salé et dans un tampon optimisé, à savoir le ROXS, pour lequel nous nous sommes inspirés des études de Tinnefeld et al.

Dans le cas du tampon ROXS, en utilisant l'équation de Rehm-Weller [128] il est possible de calculer les changements d'énergie libre, ΔG , pour les réactions des divers niveaux d'énergie du Bodipy avec un oxydant ou un réducteur donné :

$$\Delta G = e [E_{ox} - E_{red}] - E_{0,0} + C \quad (4.1)$$

où e est la charge élémentaire, E_{ox} et E_{red} les potentiels d'oxydation du donneur et de réduction de l'accepteur, et $E_{0,0}$ l'énergie du niveau fondamental du fluorophore. C décrit quant à lui le coefficient d'attraction électrostatique du solvant qui sera ici négligé dû à la haute polarité de l'eau. Il nous reste donc à déterminer les différents potentiels redox du Bodipy-FL ainsi que l'énergie de son niveau fondamental. Celle-ci peut être déterminée connaissant la longueur d'onde du pic d'absorption ($\lambda_{abs} = 502 \text{ nm}$) et d'émission du fluorophore ($\lambda_{exc} =$

4.2 Photophysique du Bodipy-FL

511 nm) :

$$E_{0,0} = \frac{hc}{2} \left(\frac{1}{\lambda_{abs}} + \frac{1}{\lambda_{exc}} \right) \quad (4.2)$$

avec h la constante de Planck et c la vitesse de la lumière dans le vide. On obtient alors $E_{0,0} = 2.45 \text{ eV}$ pour le Bodipy-Fl. Cette valeur est en accord avec celle obtenue dans [129] ($E_{0,0} = 2.43 \text{ eV}$). Ces auteurs donnent par ailleurs le potentiel de réduction du Bodipy pour passer de l'état fondamental S_0 à l'état radical anion $F^{\bullet-}$ et vaut pour une électrode au calomel saturé (ECS) $E^\circ(S_0/F^{\bullet-}) = -1.07 \text{ V}$. Le potentiel d'oxydation pour passer de l'état fondamental vers l'état radical cation $F^{\bullet+}$ peut également être trouvé dans la littérature [130] et vaut $E^\circ(S_0/F^{\bullet+}) = 1.17 \text{ V}$ (ECS). A partir de ces valeurs et de celle de l'énergie de l'état fondamental du Bodipy on détermine les potentiels de l'état excité singulet S_1 :

$$E^\circ(S_1/F^{\bullet-}) = \frac{E_{0,0}}{e} + E^\circ(S_0/F^{\bullet-}) = 1.38 \text{ V}$$

$$E^\circ(F^{\bullet+}/S_1) = -\frac{E_{0,0}}{e} + E^\circ(F^{\bullet+}/S_0) = -1.28 \text{ V}$$

De la même façon on détermine les potentiels de l'état triplet, en choisissant un écart de $\Delta E = -0.28 \text{ eV}$ entre l'état excité S_1 et l'état triplet T [121] :

$$E^\circ(T/F^{\bullet-}) = \frac{\Delta E}{e} + E^\circ(S_1/F^{\bullet-}) = 1.10 \text{ V}$$

$$E^\circ(F^{\bullet+}/T) = -\frac{\Delta E}{e} + E^\circ(F^{\bullet+}/S_1) = -1.00 \text{ V}$$

Les différents potentiels du Bodipy-Fl étant déterminés, il reste à choisir l'oxydant et le réducteur appropriés. Dans [121], les auteurs suggèrent l'utilisation du méthylviologène (MV) et de l'acide ascorbique (AA) de potentiels respectifs $E^\circ(MV/MV^{\bullet-}) = -0,45 \text{ V}$ et $E^\circ(AA^{\bullet+}/AA) = 0,06 \text{ V}$. On peut résumer les différents couples redox et leurs potentiels respectifs sur le diagramme 4.6.

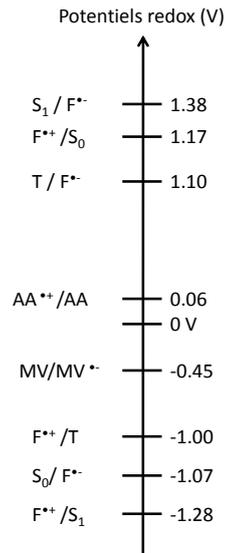


FIGURE 4.6 – Diagramme récapitulatif des potentiels redox du Bodipy-Fl ainsi que de l'acide ascorbique (AA) et du méthylviologène (MV).

Il est donc possible pour le fluorophore dans l'état triplet de redescendre vers l'état fondamental par deux chemins selon qu'il est d'abord réduit par AA (chemin 1) ou oxydé par MV (chemin 2). Nous allons en utilisant l'équation de Rehm-Weller (equation 4.1) vérifier la spontanéité de ces réactions.

chemin 1 L'énergie libre de la réaction de la réduction du fluorophore dans l'état triplet par l'acide ascorbique s'écrit en utilisant les notations utilisées précédemment :

$$\begin{aligned}\Delta G_{11} &= e[E(AA^{\bullet+}/AA) - E(S_0/F^{\bullet-})] - (E_{0,0} - \Delta E) \\ &= e(E(AA^{\bullet+}/AA) - E(T/F^{\bullet-})) = -1.04 \text{ eV}\end{aligned}$$

Le fluorophore passe alors dans l'état $F^{\bullet-}$ et peut donc ensuite être oxydé par le méthylviologène pour être ramené à l'état fondamental selon :

$$\begin{aligned}\Delta G_{12} &= e[E(S_1/F^{\bullet-}) - E(MV/MV^{\bullet-})] - (E_{0,0}) \\ &= e(E(S_0/F^{\bullet-}) - E(MV/MV^{\bullet-})) = -0.62 \text{ eV}\end{aligned}$$

Ces deux réactions possèdent donc chacune une énergie libre négative ce qui signifie qu'elles sont thermodynamiquement possibles. On pourra remarquer que, une fois le fluorophore retourné dans son état fondamental, les $AA^{\bullet+}$ et $MV^{\bullet-}$ alors créés pourront réagir ensemble pour régénérer du AA et du MV. On notera également que la réaction de l'acide ascorbique sur le fluorophore dans l'état excité est possible, toutefois elle sera peu probable compte tenu de la durée de vie du fluorophore dans cet état (de l'ordre de la nanoseconde).

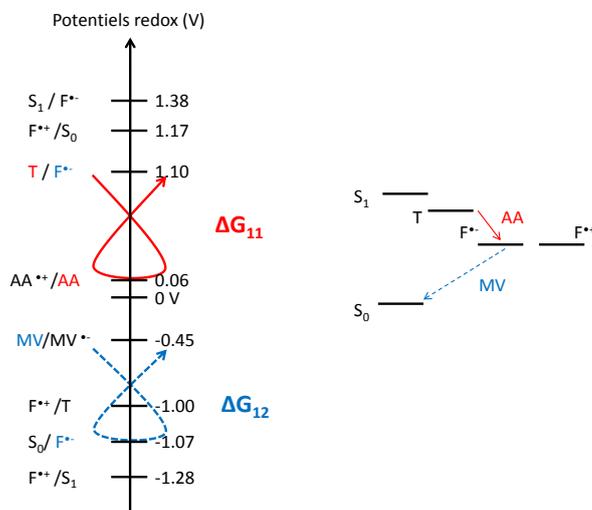


FIGURE 4.7 – En trait plein rouge, la première réaction de l'acide ascorbique avec le Bodipy-Fl dans l'état triplet. En trait discontinu bleu, la seconde réaction du méthylviologène avec le Bodipy-Fl dans l'état radical anion. L'enchaînement de ces deux réactions permet de ramener le fluorophore de l'état triplet vers son état fondamental.

chemin 2 L'énergie libre de la réaction d'oxydation du fluorophore dans l'état triplet par le méthylviologène s'écrit :

4.2 Photophysique du Bodipy-FL

$$\begin{aligned}\Delta G_{21} &= e [E(F^{\bullet+}/S_0) - E(MV/MV^{\bullet-})] - (E_{0,0} - \Delta E) \\ &= e (E(F^{\bullet+}/T) - E(MV/MV^{\bullet-})) = -0.55 \text{ eV}\end{aligned}$$

Le fluorophore passe alors dans l'état $F^{\bullet-}$ et peut donc ensuite être réduit par l'acide ascorbique pour être ramené à l'état fondamental selon :

$$\begin{aligned}\Delta G_{22} &= e [E(AA^{\bullet+}/AA) - E(F^{\bullet+}/S_1)] - (E_{0,0}) \\ &= e (E(AA^{\bullet+}/AA) - E(F^{\bullet+}/S_0)) = -1.11 \text{ eV}\end{aligned}$$

Ici encore les énergies libres sont négatives et donc les réactions possibles.

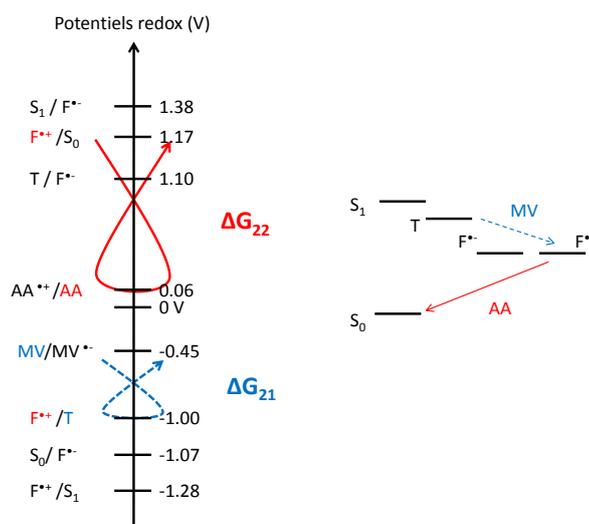


FIGURE 4.8 – En trait discontinu bleu, la première réaction du méthylviologène avec le Bodipy-Fl dans l'état triplet. En trait plein rouge, la seconde réaction de l'acide ascorbique avec le Bodipy-Fl dans l'état radical cation. L'enchaînement de ces deux réactions permet de ramener le fluorophore de l'état triplet vers son état fondamental.

En utilisant le méthylviologène et l'acide ascorbique en milieu anaérobie, on dispose alors d'un système auto-régénérant permettant de vider efficacement l'état triplet du Bodipy-Fl. Toutefois, dans notre situation où la solution est déplétée en oxygène avec le système PCA/PCD, on s'aperçoit que le PCA joue déjà le rôle du réducteur avec le Bodipy-Fl : $E^\circ(PCA^{\bullet+}/PCA) = 0,79 \text{ V}$ [131]. L'acide ascorbique ne sera donc pas utilisé dans les études qui suivront sur ce fluorophore. Cette situation est particulière au Bodipy-Fl puisqu'il possède des potentiels redox suffisamment bas pour être réduits par le PCA, ce qui n'est pas le cas d'autres fluorophores tels que le Cy5 ou encore l'ATTO 655.

4.2.2 Accroche à la surface et préparation du tampon ROXS

Le dispositif de microscopie de fluorescence pour l'étude du Bodipy-Fl est le TIRF qui a été décrit dans le chapitre précédent. Pour étudier la photophysique de ce fluorophore on doit l'accrocher spécifiquement à la surface. Pour ce faire, on dispose d'oligonucléotides simples brins biotinylés à l'extrémité 3' et marqués du fluorophore à leur extrémité 5' de la façon suivante : Bodipy FL-5'-CAT TCG CCA TTC AGG CTG AAC-3'-biotine. Des études ont pu

démontrer que la présence d'une base, la guanine, pouvait fortement inhiber la fluorescence de certains fluorophores dont le Bodipy-Fl [129,132]. Ici la guanine la plus proche du fluorophore est espacée de 5 bases, son influence devrait donc être limitée.

Les cellules microfluidiques sont les mêmes que celles utilisées pour les expériences de pince optique, à savoir une lamelle fixée à une lame de microscope par deux bandes de scotch double face espacées de 5 mm environ. La surface, fonctionnalisée à base de BSA biotine (Bovine Serum Albumin) et de streptavidine, est quant à elle décrite dans le paragraphe 3.2.3 du chapitre précédent. Les oligonucléotides marqués sont incubés à 1 nM pendant cinq minutes sur ces surfaces puis sont rincés avec du tampon TRIS salé.

Pour l'étude du Bodipy-Fl dans le tampon ROXS, celui-ci est préparé juste avant utilisation et est injecté après le rinçage de la cellule. Ce tampon est préparé de la façon suivante pour un volume final de 50 μl : 5 μl d'acide protocatéchuique (PCA, préparé dans une solution de TRIS à pH 8) à 100 mM sont mélangés avec 44.5 μl de l'enzyme, le protococatechuate 3,4 - dioxygénase (PCD, dilué dans une solution de TRIS salé) pour dépléter la solution en oxygène, puis 0.5 μl de methylviologène (MV, dilué dans du TRIS salé) à 50 mM sont ajoutés afin d'inhiber l'état triplet du fluorophore en combinaison du PCA. On a alors comme concentrations finales : PCA 10 mM, PCD 22.5 nM et MV 0.5 mM.

4.2.3 Analyse des images

La réflexion totale du faisceau laser à 488 nm (ici polarisé TE) permet d'exciter des zones elliptiques de diamètre 100 μm sur 80 μm sur l'échantillon. L'acquisition des images avec la caméra Hamamatsu, placée dans le plan focal de la lentille de tube du microscope, est synchronisée avec l'illumination de l'échantillon (voir chapitre précédent) et des séries de 200 images de 100 ms chacune (suivies de 100 ms de temps de pause) sont utilisées pour étudier l'intensité de chaque Bodipy-Fl au cours du temps. Chaque image est analysée à l'aide de routines programmées sous Igor Pro en fixant des critères sur le rapport signal à bruit, la taille du spot correspondant à la limite de diffraction et le photoblanchiment en une seule étape. Les paragraphes suivants précisent la mise en œuvre de ces critères.

Rapport signal sur bruit Afin de distinguer un spot, correspondant à l'émission d'un fluorophore, du bruit de fond d'une image il convient de définir un critère d'identification : le rapport signal sur bruit. Le faisceau d'excitation étant gaussien, chaque fluorophore reçoit une intensité d'excitation différente et le bruit de fond, qui dépend de cette intensité, est différent pour chacun d'entre eux. Il convient donc de définir le bruit local pour chaque fluorophore σ_{loc} .

Celui-ci a deux origines : le bruit de lecture de la caméra $\sigma_{lecture}$, identique en tout point, et le bruit de photons issu de l'autofluorescence de la lamelle σ_{phot} (en racine carrée de l'intensité d'autofluorescence), qui dépend de la position de chaque spot sur l'image. Le bruit de lecture dépend uniquement de la caméra et peut donc être simplement mesuré en calculant l'écart type sur une image prise avec un obturateur devant le capteur (soit dans notre cas 9 niveaux de gris). Le bruit de photons est quant à lui lié à l'intensité d'excitation locale et doit donc être déterminé localement. Le bruit de fond (égal à la racine carrée de la somme quadratique de $\sigma_{lecture}$ et σ_{phot}) est alors plus élevé au centre de l'image, où l'intensité d'excitation est maximale, que sur les bords où l'intensité est minimale. Le profil d'intensité étant gaussien (avec un étirement du profil selon l'angle d'incidence du faisceau), on détermine un bruit de photons sur des tranches de l'image en faisant un ajustement gaussien à deux dimensions. Celui-ci est effectué sur la dernière image de chaque série où tous les fluorophores ont photoblanchi (voir figure 4.9).

4.2 Photophysique du Bodipy-FL

L'intensité maximale d'excitation I_{max} étant déterminée par l'ajustement gaussien (en niveaux

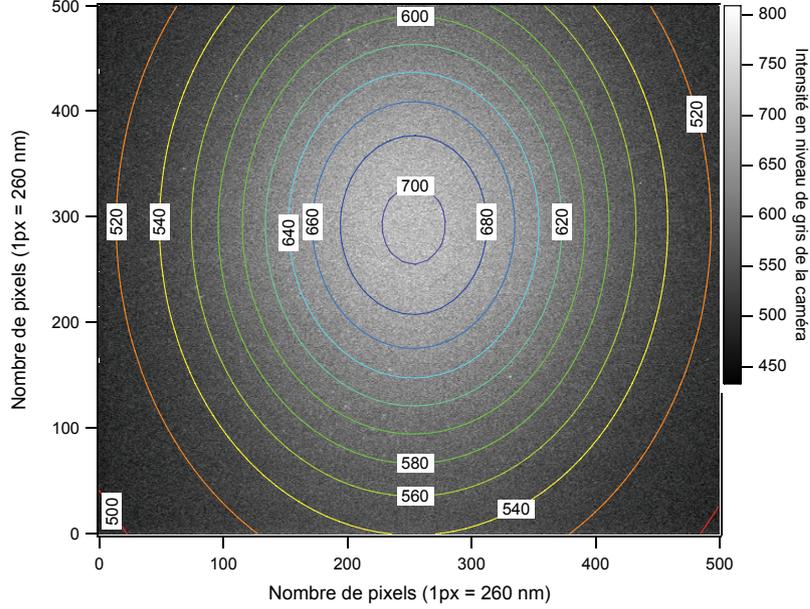


FIGURE 4.9 – Détermination du bruit de photons. La dernière image de chaque série est ajustée par une gaussienne à deux dimensions puis découpée en tranches dont l'intensité vaut entre n et $n+1$ fois le rapport $I_{max}/10$ (n allant de 0 à 9 et I_{max} étant l'intensité maximale de l'image déterminée à partir de l'ajustement). Le bruit de photon est ensuite déterminé sur chaque tranche de l'image en utilisant l'expression de l'équation 4.3.

de gris), on définit 10 tranches de l'image pour lesquelles l'intensité d'excitation vaut entre n et $n+1$ fois le rapport $I_{max}/10$ (n allant de 0 à 9). Sur chaque tranche on définit le bruit de photons de la façon suivante :

$$\sigma_{loc} = \frac{\sqrt{\sum_1^{N_{pix}} (I_{pix}^2 - I_{moy}^2)}}{N_{pix}} \quad (4.3)$$

où σ_{loc} est l'écart-type du bruit de la tranche considérée, I_{pix} l'intensité de chaque pixel et I_{moy} la moyenne de l'intensité des N_{pix} pixels de la tranche étudiée.

Connaissant ce bruit on peut alors définir un rapport signal sur bruit minimal, que nous prendrons égal à 4, permettant d'identifier chaque fluorophore quelque soit sa position sur l'image.

Taille du spot Un fluorophore individuel est perçu sur les images comme un spot limité par la diffraction. Le diamètre d de ces spots dans le plan de l'échantillon est alors donné par la relation :

$$d = 1.22 \frac{\lambda}{ON} \quad (4.4)$$

où λ est la longueur d'onde d'émission du fluorophore et ON l'ouverture numérique de l'objectif de microscope ($ON=1.45$ pour l'Olympus PlanApo). Pour le Bodipy-F1 ($\lambda_{em} = 511 \text{ nm}$), ces spots ont un diamètre de 430 nm et recouvrent sur chaque image, dont un pixel représente 260 nm dans le plan de l'échantillon, une surface de 4 pixels (en binning¹ 2 avec la caméra).

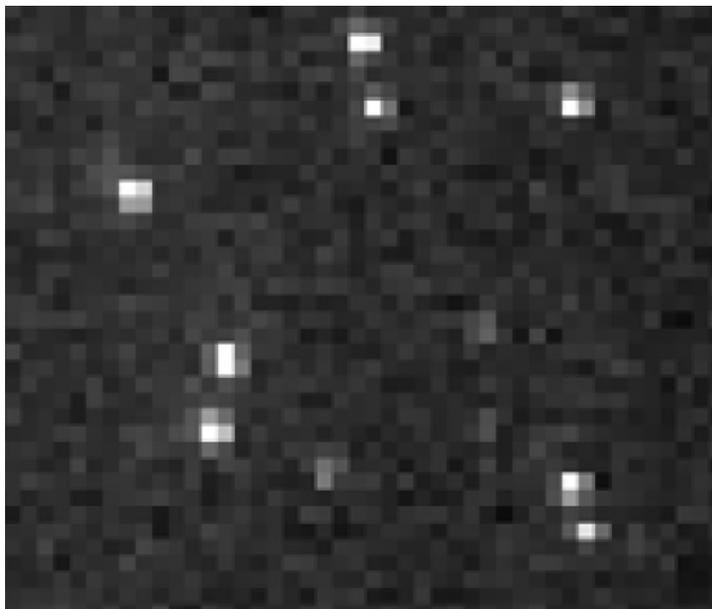


FIGURE 4.10 – Agrandissement d'une zone de l'image pour visualiser l'extension spatiale des spots de Bodipy-F1 individuels. On observe que chaque spot est bien contenu sur une surface de 4 pixels.

Lors de la détection des spots sur les images, ceux dont la surface est supérieure à 4 pixels sont systématiquement exclus de l'analyse. En effet, un spot de dimension supérieure signifie qu'il ne s'agit pas d'un fluorophore unique, mais peut être dû à plusieurs fluorophores espacés d'une distance que l'objectif de microscope ne peut résoudre, ou bien d'impuretés collées non spécifiquement sur la lamelle et qui fluorescent dans la même gamme spectrale que le fluorophore étudié.

Photoblanchiment Une signature caractéristique d'un fluorophore unique est que lorsque celui-ci photoblanchit, il cesse d'émettre des photons en seule étape. Cela signifie que lorsque l'on regarde la trace temporelle de l'intensité d'un fluorophore, on doit observer la transition de l'état excité du fluorophore, que l'on appellera "ON", vers un état où il n'émet plus de photons, que l'on appellera "OFF", en une seule image. Un spot dont l'intensité décroît graduellement jusqu'au bruit de fond de l'image (passage de l'état ON à OFF en une durée supérieure à une image) sera donc retiré des analyses et seuls ceux dont le photoblanchiment se produit en une seule étape seront gardés. Cette sélection permet de retirer de l'analyse des images, les spots correspondant à plusieurs fluorophores ou bien à des impuretés collées non spécifiquement à la surface de la lamelle de microscope.

1. Binning 2 : chaque groupement de 2 pixels de côté du capteur de la CCD est groupé en un seul pixel pour augmenter le rapport signal sur bruit.

4.2 Photophysique du Bodipy-FL

Conversion des niveaux de gris en nombre de photons Ce paragraphe ne décrit pas un critère pour sélectionner les spots correspondant à des fluorophores uniques, mais la conversion des niveaux de gris d'un spot en nombre de photons émis lorsque celui-ci a passé les critères précédents. Chaque image de la série temporelle ("stack") est soustraite de la moyenne des dix dernières images afin de retirer le fond de fluorescence de la lamelle ainsi que l'offset de la lecture de l'image par la caméra. On récupère ainsi sur chaque image un niveau de gris proportionnel à l'intensité des fluorophores, qui est converti en nombre de photons de la façon suivante :

$$N_{photons} = \frac{I_{gris}K}{G_{EM}\eta_{quantique}T_{obj}T_{filtre}\eta_{collection}} \quad (4.5)$$

avec I_{gris} l'intensité en niveaux de gris du spot sur la caméra correspondant au fluorophore, K le facteur de conversion des photons en électrons (4.4 électrons par photon), G_{EM} le gain de la caméra (6 au minimum), $\eta_{quantique}$ l'efficacité quantique de la caméra (54% à 511 nm), T_{obj} et T_{filtre} les transmissions respectives de l'objectif et des filtres à la longueur d'onde d'émission du fluorophore (90% et 85% à 511 nm) et $\eta_{collection}$ l'efficacité de collection de l'objectif compte tenu de son ouverture numérique ($\approx 30\%$).

4.2.4 Photostabilité du Bodipy-Fl

Nous allons caractériser dans cette section la photostabilité du Bodipy-Fl dans les deux environnements étudiés. Nous verrons notamment que les propriétés limitées du Bodipy dans le TRIS (en termes de durée de vie et de nombre de photons émis) peuvent être grandement améliorées dans le tampon ROXS. Pour ce faire, des séries de 200 images, de 100 ms d'acquisition et pour une puissance d'excitation de 20 mW à l'entrée du microscope (soit une intensité de 450 W/cm^2 au sommet de la gaussienne), sont analysées sous Igor Pro en appliquant les critères cités précédemment, puis les traces temporelles de chaque fluorophore sont digitalisées en états "ON" lorsque le fluorophore émet des photons et "OFF" lorsqu'il n'en émet pas, comme représenté sur la figure 4.11. Le dernier état OFF de la trace est alors l'état photoblanchi de la molécule.

Nous avons d'abord cherché à estimer la durée de vie caractéristique du Bodipy. On définit pour cela la durée de vie comme étant la somme des durées de tous les états ON de la molécule. La figure 4.12 représente les histogrammes en échelle logarithmique des durées de vie pour un ensemble de 590 fluorophores dans le tampon TRIS et 800 fluorophores dans le tampon ROXS. Dans chaque tampon l'analyse a été effectuée sur plusieurs séries d'images acquises sur des zones différentes de l'échantillon. On remarquera que l'intensité du faisceau étant gaussienne, chaque fluorophore reçoit une intensité d'excitation différente sur une zone d'observation et que les grandeurs que nous donnerons seront caractérisées sur l'ensemble de ces fluorophores. La durée de vie caractéristique est déterminée par un ajustement exponentiel de ces données et vaut $0.20 \pm 0.02 \text{ s}$ dans le tampon TRIS et $3.7 \pm 0.3 \text{ s}$ dans le tampon ROXS, soit un facteur 19 entre les deux. De la même manière on estime la durée caractéristique du premier état initial, c'est à dire la durée pendant laquelle le fluorophore émet des photons avant son premier clignotement, à $0.19 \pm 0.02 \text{ s}$ dans le premier tampon et $1.8 \pm 0.2 \text{ s}$ dans le second.

On extrait également un nombre de photons total émis caractéristique par l'analyse des histogrammes de la figure 4.13. Celui-ci est défini comme étant la somme des photons émis pendant les états ON des molécules. On obtient ainsi un nombre caractéristique de 5000 ± 500 photons émis dans le tampon TRIS et 100000 ± 7000 photons émis dans le tampon ROXS, soit un facteur

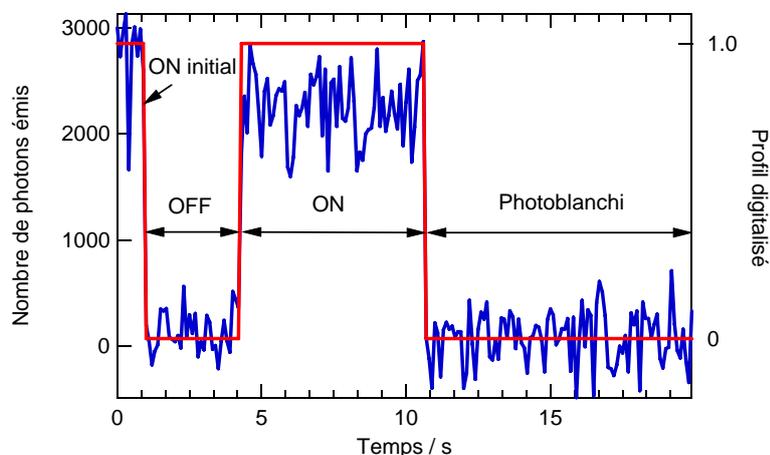


FIGURE 4.11 – Profil d'intensité d'un Bodipy-Fl au cours du temps (en bleu). Ce fluorophore a clignoté une fois, c'est à dire que l'état ON initial est suivi d'un état OFF puis d'un autre état ON. La digitalisation de la trace temporelle du fluorophore (en rouge) permet d'identifier ces états ON et OFF. Seuls les changements d'états de durées supérieures à une image (ici de 100 ms) sont considérés comme du clignotement.

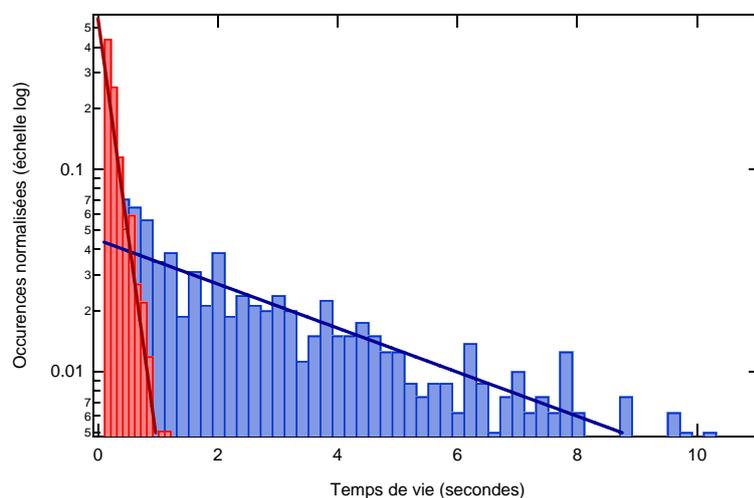


FIGURE 4.12 – Histogrammes des durées de vie du Bodipy-Fl dans le tampon TRIS (en rouge) ou ROXS (en bleu). Les droites rouge et bleue représentent l'ajustement exponentiel de ces données pour en extraire des grandeurs caractéristiques. On obtient une durée de vie de 0.20 ± 0.02 s dans le tampon TRIS et 3.7 ± 0.3 s dans le tampon ROXS soit un facteur 19 entre les deux.

4.2 Photophysique du Bodipy-FL

20 entre les deux. On détermine aussi le nombre de photons caractéristique émis lors de l'état ON initial à 4800 ± 300 dans le premier tampon et 47000 ± 3000 dans le second.

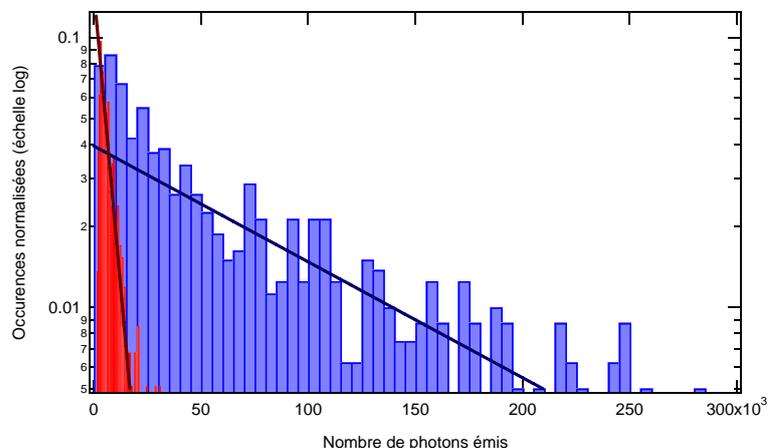


FIGURE 4.13 – Histogrammes des nombres de photons totaux émis par le Bodipy-Fl dans le tampon TRIS (en rouge) ou ROXS (en bleu). Les droites rouge et bleue représentent l'ajustement exponentiel de ces données pour en extraire des grandeurs caractéristiques. On obtient un nombre total de photons émis caractéristique de 5000 ± 500 dans le tampon TRIS et 100000 ± 7000 dans le tampon ROXS soit un facteur 20 entre les deux.

Le gain important dans le tampon ROXS en durée de vie des fluorophores, mais aussi en quantité de photons émis, est en partie dû au fait que l'on a retiré l'oxygène dans ce tampon. Celui-ci étant principalement responsable du photoblanchiment, il est donc naturel qu'en le retirant on retarde le moment où le fluorophore se dégrade définitivement. Comme on l'a vu précédemment, dépléter le milieu en oxygène ne suffit pas pour observer le Bodipy-Fl sur de plus longues durées, puisque celui-ci passe alors plus de temps dans l'état triplet et par conséquent le rapport signal sur bruit n'est plus suffisant pour détecter les molécules. On voit ici que l'oxydant et le réducteur ajoutés dans la solution jouent efficacement le rôle d'inhibiteurs de l'état triplet et, combinés avec l'absence d'oxygène dans le milieu, permettent d'observer le Bodipy-Fl sur de plus longues durées.

Nous avons également cherché à caractériser la stabilité du Bodipy-Fl dans le tampon ROXS (ceci n'est pas possible dans le tampon TRIS où la durée de vie est trop courte). Comme représenté sur la figure 4.11, le clignotement représente le changement d'état du fluorophore (ON ou OFF) que nous sommes capables de détecter avec la résolution temporelle de nos séries d'images (100 ms). Sur les 800 molécules étudiées dans le tampon ROXS, 57% présentent du clignotement. Une moyenne déterminée sur l'ensemble des fluorophores qui présentent ces instabilités, révèle que ceux-ci clignotent en moyenne 5 fois durant leur temps de vie, pour une durée caractéristique des états ON et OFF (hormis l'état ON initial) de 600 ms. Dans [122,123], Tinnefeld et al. ont démontré qu'en jouant sur les concentrations en oxydant et réducteur, il était possible de contrôler le temps passé dans l'état ON ou OFF de la molécule et donc son clignotement. Dans notre situation, du fait de son rôle dans l'élimination de l'oxygène en plus de celui de réducteur, l'acide protocatéchique (PCA) est présent à une forte concentration (10 mM), beaucoup plus élevée que celle en oxydant, le méthylviologène (MV), qui est de 0.5 mM. Ceci pourrait accélérer le transfert de l'état triplet vers l'état réduit de la molécule et donc expliquer ce clignotement résiduel. Nous avons essayé d'augmenter la concentration en

MV pour raccourcir la durée des états OFF (la concentration en PCA étant fixée pour continuer à déléter efficacement l'oxygène du milieu) sans observer d'effet notable sur le clignotement. Une raison pourrait en être que ce clignotement résiduel ne soit pas originaire de l'état triplet ou réduit de la molécule mais d'un autre processus (voir le paragraphe sur le clignotement de la section 4.1.1).

4.2.5 Courbes de saturation du Bodipy-FI

4.2.5.1 Préliminaires

Nous souhaitons caractériser dans cette section l'intensité de saturation du Bodipy-FI dans les deux environnements étudiés : dans le tampon TRIS et dans le tampon ROXS. L'intensité de saturation I_{sat} décrit l'intensité d'excitation nécessaire pour atteindre la moitié du taux d'émission maximal du fluorophore. En d'autres termes, puisque le taux d'émission du fluorophore n'augmente plus beaucoup au-delà de I_{sat} , l'exciter avec une intensité supérieure risque uniquement de faire diminuer le rapport signal sur bruit (si, par exemple, le taux de fluorescence des impuretés de la lamelle continue à augmenter). Il est donc important, lors des expériences, d'illuminer l'échantillon avec une intensité qui soit inférieure ou égale à l'intensité de saturation du fluorophore.

Pour tracer la courbe de saturation du Bodipy-FI nous avons pris des séries de 200 images de l'échantillon (de 100ms chacune) pour des intensités d'excitation croissantes. L'intensité locale d'excitation de chaque fluorophore est déterminée par un ajustement gaussien du fond d'autofluorescence de la lamelle qui est directement proportionnel à l'intensité d'excitation. La durée des films étant choisie suffisamment longue pour que tous les fluorophores aient photoblanchi à la fin, on effectue l'ajustement gaussien sur la dernière image où il ne reste plus de fluorophores. Nous avons au préalable vérifié que cette intensité d'autofluorescence de la lamelle est bien proportionnelle à l'intensité d'excitation et qu'elle ne varie pas au cours des films. Pour estimer la valeur de l'intensité d'excitation dans l'onde évanescence, nous avons pris en compte le facteur de transmission de Fresnel, ici de 1.8 pour un faisceau polarisé TE, incident avec un angle de 70° (supérieur à l'angle critique) à l'interface lamelle/échantillon.

4.2.5.2 Courbes de saturation

Les courbes de saturation obtenues pour le Bodipy-FI dans du tampon TRIS salé (en présence donc d'oxygène) et dans le tampon ROXS (appauvri en oxygène et avec présence d'un oxydant et d'un réducteur) sont données sur la figure 4.14. On y a tracé le taux de fluorescence, pris comme étant le nombre de photons émis pendant une image divisé par la durée de celle-ci, en fonction de l'intensité d'excitation locale.

On remarque sur ces courbes que le taux de fluorescence du Bodipy-FI est plus élevé dans le TRIS que dans le ROXS, pour des intensités d'excitation inférieures à 1300 W/cm^2 . Ceci peut s'expliquer par le fait que l'oxygène, contenu dans le tampon TRIS, joue un meilleur rôle d'inhibiteur de l'état triplet que l'oxydant et le réducteur utilisés dans le tampon ROXS. Au delà de 1300 W/cm^2 on constate que la tendance est inversée et que ce taux de fluorescence sature très rapidement dans le TRIS. Une raison pourrait être que pour des intensités d'excitation élevées, le fluorophore photoblanchit avant la fin de l'acquisition de l'image et donc son taux de fluorescence, calculé en divisant le signal par la durée totale de l'image, est sous-estimé. Dans le ROXS où l'oxygène, en partie responsable du photoblanchiment, est retiré, la durée de vie du fluorophore est bien plus longue et donc le taux de fluorescence est mieux estimé (mis à

4.2 Photophysique du Bodipy-FL

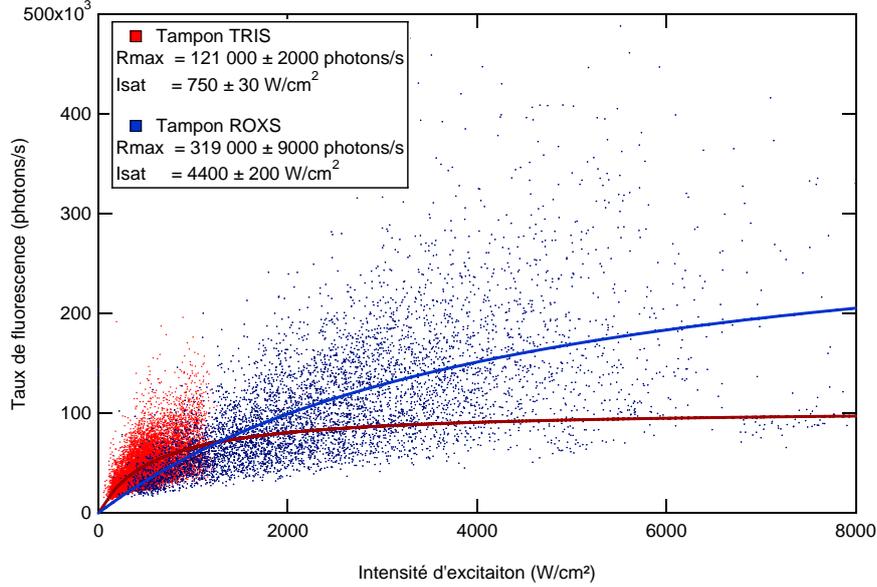


FIGURE 4.14 – Courbes de saturation du Bodipy-Fl dans du tampon Tris (rouge) et ROXS (bleue). Le taux de fluorescence est calculé en prenant le nombre de photons émis pendant une image divisé par la durée de l’image. L’intensité d’excitation locale est calculée à partir d’un ajustement gaussien du fond de fluorescence de la lamelle. Les courbes en trait plein décrivent l’ajustement par l’équation 4.6.

part le clignotement résiduel des Bodipy-Fl qui contribue lui aussi à une sous estimation du taux de fluorescence de la molécule).

Pour extraire l’intensité de saturation de ces courbes expérimentales, nous les avons ajustées par l’équation suivante décrivant le taux de fluorescence, Γ_{fluo} , pour un fluorophore pouvant être assimilé à un système à deux ou trois niveaux (présence de l’état triplet) :

$$\Gamma_{fluo} = \frac{\Gamma_{max}}{1 + \frac{I_{sat}}{I_{exc}}} \quad (4.6)$$

avec Γ_{max} le taux de fluorescence maximal du fluorophore, I_{sat} l’intensité de saturation (ces deux grandeurs étant utilisées comme paramètres ajustables) et I_{exc} l’intensité d’excitation. On obtient ainsi pour le Bodipy-Fl dans le tampon TRIS une intensité de saturation de 750 W/cm^2 pour un taux de fluorescence maximal de 121 000 photons/s, tandis que dans le ROXS on obtient une intensité de saturation de 4400 W/cm^2 pour un taux de fluorescence maximal de 319 000 photons/s. Les valeurs obtenues pour le Bodipy-Fl dans le TRIS sont toutefois potentiellement sous-estimées en raison du photoblanchiment des molécules pendant l’acquisition pour des intensités d’excitation élevées. Une solution pour palier ce problème aurait été de faire des acquisitions plus courtes, toutefois nous étions limités à 100ms du fait du faible rapport signal sur bruit pour ce fluorophore. De ces courbes on pourra retirer le fait que le ROXS est un tampon permettant d’accéder à des taux de fluorescence inaccessibles dans le tampon TRIS en raison de la faible durée de vie du fluorophore dans ce dernier. Ceci est particulièrement intéressant lorsqu’il s’agit d’augmenter le rapport signal sur bruit du fluorophore ou d’améliorer sa localisation (au détriment de sa durée de vie).

4.2.5.3 Origine de la dispersion des données sur les courbes de saturation

Sur les courbes de la figure 4.14, on observe une forte dispersion des données expérimentales. Celle-ci peut avoir plusieurs origines comme le clignotement ou bien le photoblanchiment de la molécule à différents instants durant l'acquisition. Nous avons également observé une forte contribution à cette dispersion des inhomogénéités de l'onde évanescente à la surface de l'échantillon, qui n'est pas prise en compte dans l'ajustement gaussien du fond de fluorescence de la lamelle. Ces inhomogénéités sont en partie dues aux réflexions et diffusions du faisceau laser d'excitation sur les différentes interfaces optiques, créant ainsi des interférences et donc des inhomogénéités sur le profil d'excitation [133, 134].

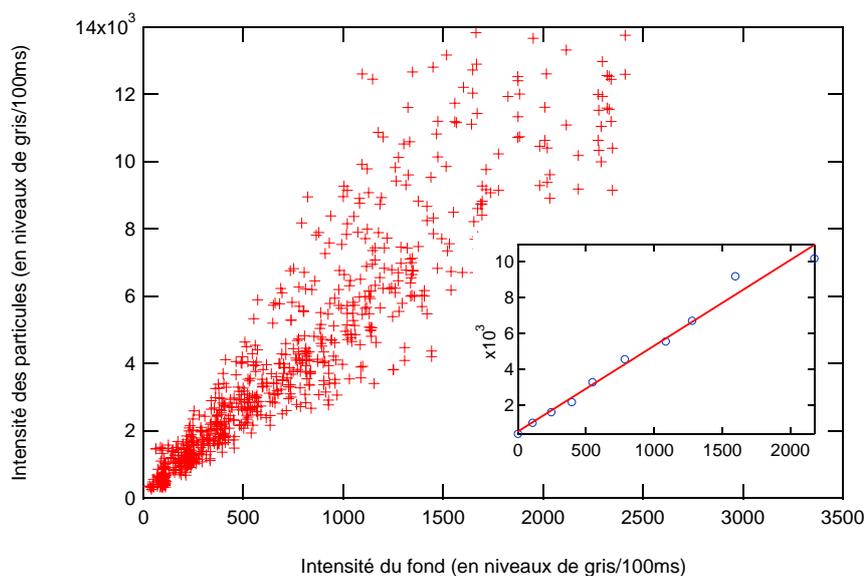


FIGURE 4.15 – Intensité de la diffusion inélastique de nanoparticules d'or en fonction du fond d'auto fluorescence de la lamelle de microscope pour des puissances d'excitation croissantes. L'encart représente cette relation pour une même particule traduisant le fait que l'intensité de la diffusion de la nanoparticule est bien proportionnelle au fond de fluorescence (pour les puissances d'excitation utilisée ici). La figure représente quant à elle l'ensemble de ces profils pour plusieurs nanoparticules positionnées à différents endroits dans la zone d'observation. On y voit une forte dispersion traduisant le fait que le coefficient de proportionnalité entre le fond de fluorescence de la lamelle (extrait de l'ajustement gaussien du fond) et l'intensité de l'onde évanescente n'est pas parfaitement identique selon l'endroit considéré sur la zone d'observation.

Nous avons cherché à quantifier l'impact de ces inhomogénéités sur la dispersion de nos courbes de saturation de deux manières différentes. Une première méthode a été d'utiliser des nanoparticules d'or de diamètre 100 nm, disposées non spécifiquement sur une lamelle de microscope. En excitant ces nanoparticules avec l'onde évanescente de la même façon que les Bodipy-Fl, on observe de la diffusion inélastique du faisceau d'excitation dont une fraction peut être observée aux mêmes longueurs d'onde que le fluorophore étudié. Après avoir vérifié, en faisant varier la puissance d'excitation, que le profil d'intensité de diffusion inélastique était bien linéaire avec le fond de fluorescence local (extrait de l'ajustement gaussien de l'auto fluorescence de la lamelle) pour des particules individuelles (voir l'encart de la figure 4.15), nous avons tracé ces profils d'intensité pour l'ensemble des particules d'une même zone d'observation. On

4.2 Photophysique du Bodipy-FL

observe alors une forte dispersion sur l'ensemble de ces droites, du même ordre de grandeur que celles des figures 4.16 et 4.14. De cette analyse on peut en conclure que l'intensité de l'onde évanescente est bien localement proportionnelle à l'intensité du fond d'autofluorescence de la lamelle (extrait de l'ajustement gaussien du fond) mais que ce facteur de proportionnalité dépend de la position considérée sur la zone d'observation. On peut donc se poser la question de savoir si l'ajustement gaussien du fond d'autofluorescence de la lamelle est légitime, compte tenu des inhomogénéités spatiales de l'intensité dans l'onde évanescente, ou bien si la dispersion observée peut être attribuée à un autre phénomène. En effet, l'onde d'excitation incidente n'étant pas plane, l'intensité de l'onde évanescente est non seulement liée au fait que le profil d'intensité d'excitation est gaussien, mais aussi au fait que chaque angle d'incidence du faisceau génère une onde évanescente avec une efficacité différente.

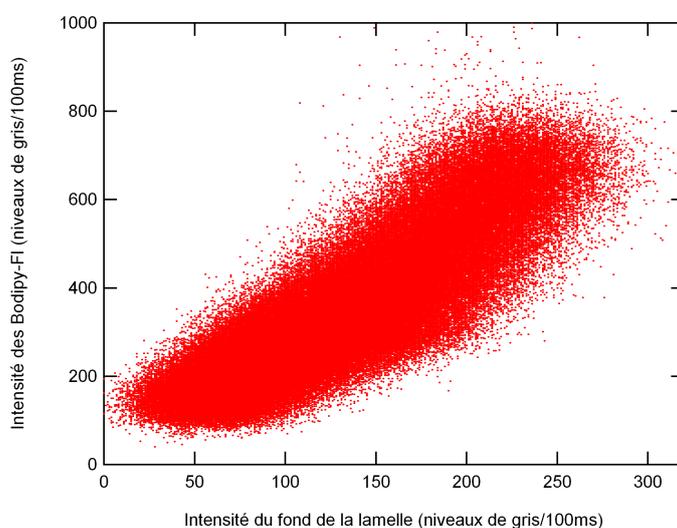


FIGURE 4.16 – Intensité pour une solution concentrée de Bodipy-FL diffusant dans l'onde évanescente en fonction du fond brut d'autofluorescence de la lamelle. On observe une forte dispersion sur la courbe, traduisant le fait que le coefficient de proportionnalité entre l'intensité de l'onde évanescente et l'autofluorescence de la lamelle n'est pas le même sur l'ensemble de la zone d'observation.

Une seconde manière de vérifier cette inhomogénéité de l'onde évanescente, mais cette fois-ci sans passer par un ajustement gaussien du fond, a été d'incuber une solution à 20 nM, donc concentrée, en Bodipy-FL dans la cellule microfluidique et d'observer les fluorophores qui diffusent près de la surface. On acquiert alors un film dont les images renseignent directement sur l'intensité d'excitation de l'onde évanescente puisqu'il y a constamment des fluorophores qui viennent diffuser dans celle-ci. Une fois la cellule rincée on acquiert à nouveau une série d'images du fond d'autofluorescence de la lamelle sur la même zone de l'échantillon. On trace ensuite pour chaque pixel l'intensité de la fluorescence des Bodipy, issue de la première série d'images, en fonction du fond brut d'autofluorescence de la lamelle (sans utiliser un ajustement gaussien du fond), issu de la seconde série d'images (figure 4.16). On remarque alors une forte dispersion (de l'ordre de 80% à 100%) sur la courbe obtenue alors que, si le coefficient de proportionnalité entre l'intensité de l'onde évanescente et le fond de fluorescence de la lamelle avait été le même sur l'ensemble de la zone d'observation, on aurait dû obtenir une droite. Ce second test montre bien que l'intensité de l'onde évanescente ne peut être parfaitement extraite

du fond d'autofluorescence compte tenu de paramètres méconnus, tel que l'angle d'incidence (inhomogène) du faisceau d'excitation.

4.3 Extension à d'autres fluorophores

Nous allons montrer ici l'applicabilité du système ROXS, avec les modifications que nous lui avons apportées (à savoir l'utilisation du PCA/PCD plutôt que le GODCAT et l'omission de l'acide ascorbique dans le milieu), à d'autres fluorophores de la même famille que le Bodipy-Fl ainsi qu'à quelques autres fluorophores communément utilisés en microscopie de fluorescence. La connaissance des potentiels redox ainsi que l'énergie du niveau fondamental nous permet de prédire si le PCA seul suffit à stabiliser le fluorophore dans cet environnement, ou bien si l'addition de l'acide ascorbique, proposé par Tinnefeld et al., est nécessaire.

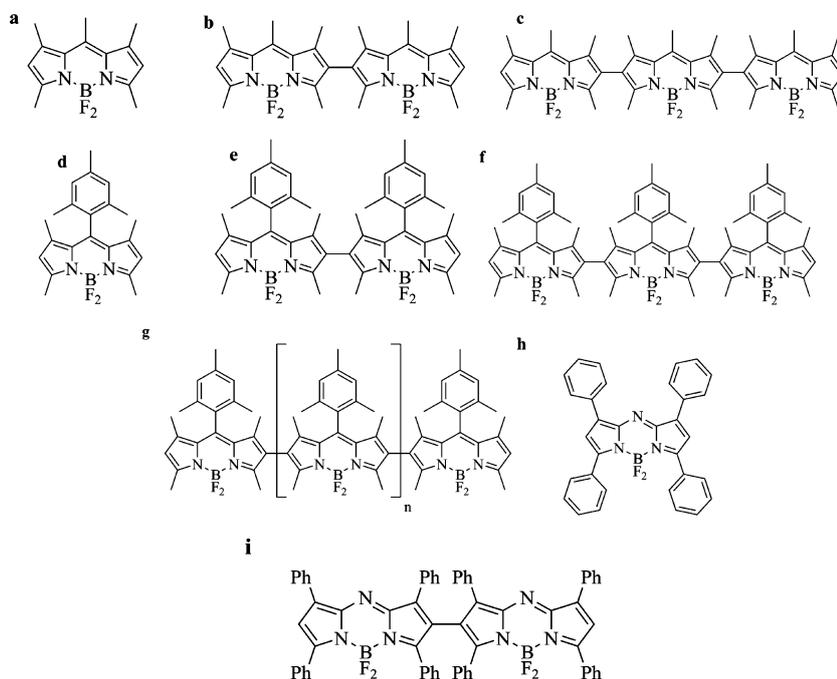


FIGURE 4.17 – Fluorophores membres de la famille des Bodipy, extraits de [135]. (a,d) représentent les monomères 1 et 2, (b,e) dimères 1 et 2, (c,f) trimères 1 et 2, (g) polymère, (h) aza-Bodipy monomère et (i) aza-Bodipy dimère.

Dans [135], les auteurs donnent les potentiels recherchés pour plusieurs fluorophores de la famille du Bodipy, schématisés sur la figure 4.17, tandis que les potentiels des fluorophores cités dans le tableau 4.1 peuvent être trouvés dans [136–138]. Nous avons calculé pour ces fluorophores les énergies libres des différentes réactions dans le tampon ROXS avec le PCA comme réducteur et le MV comme oxydant. Les résultats sont résumés dans le tableau 4.1 où λ_{abs} et λ_{em} dénotent respectivement les longueurs d'onde d'absorption et d'émission du fluorophore (en nm), $E_{0,0}$ l'énergie de l'état fondamental (en eV), $E(S_0/F^{\bullet-})$ et $E(F^{\bullet+}/S_0)$ les potentiels d'oxydation et de réduction. ΔG_{11} , ΔG_{12} , ΔG_{21} et ΔG_{22} sont les énergies libres correspondant aux différentes transitions représentées sur les figures 4.7 et 4.8. Rappelons qu'un ΔG négatif signifie une réaction peu probable. D'après le tableau 4.1, les états triplets de plusieurs fluorophores émettant dans le vert peuvent être inhibés efficacement par le MV

4.3 Extension à d'autres fluorophores

Fluorophore	λ_{abs}	λ_{em}	$E_{0,0}$	$E(S_0/F^{\bullet-})$	$E(F^{\bullet+}/S_0)$	ΔG_{11}	ΔG_{12}	ΔG_{21}	ΔG_{22}
Bodipy-Fl	502	511	2.45	-1.07	1.17	-0.31	-0.62	-0.55	-0.39
monomère 1	497	512	2.43	-1.21	1.12	-0.15	-0.76	-0.58	-0.33
monomère 2	501	513	2.43	-1.19	1.14	-0.17	-0.74	-0.56	-0.35
Bodipy R6G	528	547	2.31	-0.46		-0.78	-0.01		
dimère 1	526	563	2.20	-1.17	1.09	0.04	-0.72	-0.38	-0.30
dimère 2	535	573	2.17	-1.15	1.10	0.05	-0.70	-0.34	-0.31
trimère 1	550	587	2.13	-1.15	1.04	0.09	-0.70	-0.36	-0.25
trimère 2	562	596	2.09	-1.13	1.11	0.11	-0.68	-0.25	-0.32
aza-Bod monomère	647	682	1.82	-0.44	1.14	-0.31	0.01	0.05	-0.35
aza-Bod dimère	696	720	1.72	-0.37	1.10	-0.28	0.08	0.11	-0.31
Fluorescéine	492	520	2.18	-0.84	0.86	-0.27	-0.39	-0.59	-0.07
Alexa 488	499	519	2.44	-0.73		-0.65	-0.28		
Rhodamine 6G	526	555	2.28	-0.95	1.39	-0.26	-0.50	-0.16	-0.60
Perylene Diimide	560	620	2.11	-0.60	1.40	-0.44	-0.15	0.02	-0.61
Texas Red	596	615	2.08	-1.12		0.11	-0.67		
ATTO647N	644	669	1.90	-0.64	1.11	-0.19	-0.19	-0.06	-0.32
ATTO655	663	684	1.86	-0.42	1.31	-0.37	0.03	0.18	-0.52
MR121	661	673	1.86	-0.42	1.31	-0.37	0.03	0.18	-0.52
Cy5	650	670	1.88	-0.84	0.97	0.03	-0.39	-0.18	-0.18

TABLE 4.1 – Calcul des énergies libres des différentes réactions dans le tampon ROXS de différents fluorophores, avec le PCA comme réducteur et le MV comme oxydant. Les potentiels d'oxydation et de réduction des fluorophores sont mesurés avec une électrode à calomel saturé ([135–138]). Les cellules colorées en orange correspondent aux réactions qui sont défavorables dans le cas d'une réduction avec le PCA mais qui seraient favorables avec l'acide ascorbique, tandis que les cellules en rouge correspondent aux réactions qui sont défavorables avec le PCA et AA ou MV.

et le PCA (monomères 1 et 2, Bodipy R6G, fluorescéine, Alexa 488 et Rhodamine 6G). Les états triplets des dimères 1 et 2, des trimères 1 et 2, de la Texas Red et du Cy5 peuvent quant à eux être inhibés uniquement via le MV puis le PCA, l'autre chemin étant peu favorable. Bien que cela ne soit pas nécessaire, puisqu'un seul chemin suffit pour inhiber l'état triplet, on remarquera que l'acide ascorbique permettrait d'inhiber l'état triplet via les deux chemins. Quant aux monomère et dimère aza-Bodipy, à l'ATTO 655 ainsi qu'au MR 121, ils ne pourront pas bénéficier du tampon ROXS à moins d'utiliser un oxydant de potentiel plus élevé que celui du méthylviologène.

4.4 Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre que le système ROXS, proposé et testé par Tinnefeld et al. sur des fluorophores émettant dans le jaune ou le rouge, était également applicable, avec quelques modifications, à des fluorophores émettant dans le vert. Le système enzymatique, le GODCAT, utilisé par ces auteurs pour retirer l'oxygène du milieu étant limitant, du fait qu'il n'est pas compatible avec l'utilisation d'extraits cellulaires et rajoute un bruit de fond dans des gammes spectrales autour de 500nm, nous l'avons remplacé par le couple PCA/PCD. Celui-ci permet non seulement de s'affranchir des problèmes de fond de fluorescence, mais aussi de supprimer plus rapidement et plus efficacement l'oxygène de la solution. Nous avons également montré, par le calcul ainsi que par des mesures expérimentales, que dans le cas du Bodipy-Fl le rôle de réducteur de l'acide ascorbique utilisé par ces mêmes auteurs était déjà joué par le PCA. Nous avons ainsi prouvé l'applicabilité de ce système au Bodipy-Fl, un fluorophore émettant à 511 nm et présentant des propriétés photophysiques médiocres dans un tampon TRIS, et pu rallonger sa durée de vie ainsi que la quantité de photons émis d'un facteur 20. Dans ces conditions, le Bodipy-Fl possède une durée de vie caractéristique de presque 4 secondes pour un nombre total de photons émis de 100 000. 57% des fluorophores présentent du clignotement qui peut être attribué à des états noirs de la molécule autres que l'état triplet. Parmi les molécules qui clignotent, la durée moyenne de ces états ON et OFF est de 600 ms pour 5 clignotements par fluorophore.

Toujours dans ce système, nous avons mesuré la courbe de saturation du Bodipy-Fl. Bien qu'une forte dispersion entache nos données, nous avons déterminé une intensité de saturation de 4400 W/cm^2 pour un taux maximal de 121 000 photons par seconde. Ces mesures permettent de connaître les conditions optimales d'éclairement de ce fluorophore, que ce soit pour une observation avec un rapport signal sur bruit maximal (au détriment de la durée de vie du fluorophore) ou bien pour un compromis entre le rapport signal sur bruit et la durée d'observation.

Ce système ROXS, d'une grande efficacité pour une large gamme de fluorophores, sera d'une grande utilité pour les études du ribosome en microscopie de fluorescence. D'une part pour observer les acides aminés, marqués par des Bodipy-Fl, lorsqu'ils sont incorporés dans la chaîne polypeptidique en croissance lors de la traduction, mais aussi pour observer sur des durées plus longues d'autres marqueurs utilisés pour identifier d'autres éléments impliqués dans la synthèse des protéines. Nous avons en effet pu vérifier l'efficacité de ce système sur des fluorophores tels que l'ATTO 647N utilisés pour marquer des oligonucléotides lors des expériences sur l'étude de la synthèse des protéines par microscopie de fluorescence. Enfin, ce système sera particulièrement adapté pour de futures expériences de type FRET (pour Forster Resonance Energy Transfer) pour lesquelles des fluorophores d'une grande stabilité

4.4 Conclusion

sont nécessaires.

Etude de la cinétique de traduction du ribosome

Le ribosome est le moteur moléculaire permettant la fabrication des protéines à partir de l'ARN messager dans toutes les cellules. La traduction correspond à l'étape de lecture par le ribosome de l'information génétique contenue sur l'ARNm, synchronisée avec l'incorporation des acides aminés dans la chaîne polypeptidique en croissance. La séquence de l'information génétique portée par l'ARNm étant linéaire, le ribosome fabrique a priori une même protéine pour chaque lecture d'un ARNm. Toutefois des structures secondaires ou tertiaires de l'ARNm peuvent induire dans certains cas une altération de la lecture de la séquence par le ribosome, provoquant alors un changement radical dans la séquence et la fonction de la protéine fabriquée. Ces événements n'étant pas systématiques et les mécanismes sous-jacents complexes et asynchrones, les techniques traditionnellement utilisées par les biologistes se trouvent alors limitées pour étudier les interactions du ribosome avec ces structures secondaires de l'ARNm.

Dans ce chapitre nous étudions la cinétique de traduction du ribosome à l'échelle de la molécule unique. L'objectif est d'enrichir les études déjà faites à ce jour par les biologistes, en accédant à des informations sur les interactions du ribosome avec ces structures secondaires de l'ARNm par des méthodes optiques de détection de molécules uniques, qui seront à terme complémentaires des méthodes de manipulation utilisées dans le chapitre 2. Nous nous concentrons dans un premier temps sur l'étude de la cinétique de traduction sans structure secondaire de l'ARNm pour comprendre plus en détail les mouvements du ribosome le long de l'ARNm. Pour cela, deux types de ribosomes seront étudiés : le ribosome procaryote issu de bactéries *E.Coli*, ainsi que le ribosome eucaryote issu de cellules sanguines de lapins. Une fois les étapes de traduction en molécule unique maîtrisées pour ces deux systèmes, nous pourrions envisager des études sur les structures secondaires de l'ARNm.

Après un état de l'art sur les études en molécule unique de la traduction, nous exposerons notre stratégie d'étude du ribosome procaryote, à savoir la configuration de marquage du système biologique et son accroche à la surface, ainsi que les résultats obtenus. De la même façon nous exposerons ensuite notre étude sur le ribosome eucaryote.

5.1 Motivations

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre d'introduction, la synthèse des protéines ne se fait pas toujours linéairement depuis la séquence de bases des ARNm. Des structures secondaires de l'ARNm (pseudonœuds, tiges-boucles) peuvent venir altérer la lecture de la séquence par le ribosome et donc également changer la protéine fabriquée. Deux exemples de lecture alternative du code génétique sont exposés ci-dessous :

Décalage de la phase de lecture Le décalage de la phase de lecture lors de la traduction correspond au glissement du ribosome sur l'ARNm induisant un décalage de la lecture du code génétique de +1 ou -1 nucléotide. Alors que la probabilité de glissement sur l'ARNm est de 10^{-4} en général sur un codon, elle peut atteindre 30% en présence de certaines structures secondaires de l'ARNm. Dans ce deuxième cas, une séquence dite de glissement¹ est située en amont de la structure secondaire. Lorsque le ribosome atteint cette structure, celle-ci résiste à l'activité hélicase du ribosome (permettant de dissocier deux brins complémentaires d'un oligonucléotide) et une force est exercée entre cette structure et la séquence de glissement, alors située au niveau du site A et P du ribosome. Un décalage d'un nucléotide des ARNt et leur réappariement sur l'ARNm permettent alors au ribosome de continuer la traduction dans cette nouvelle phase de lecture et d'ouvrir la structure (voir figure 5.1). Ce mécanisme est particulièrement utilisé par certains rétrovirus (VIH-1, SARS par exemple) pour fabriquer deux protéines différentes avec un ratio fixé, à partir d'un même ARNm.

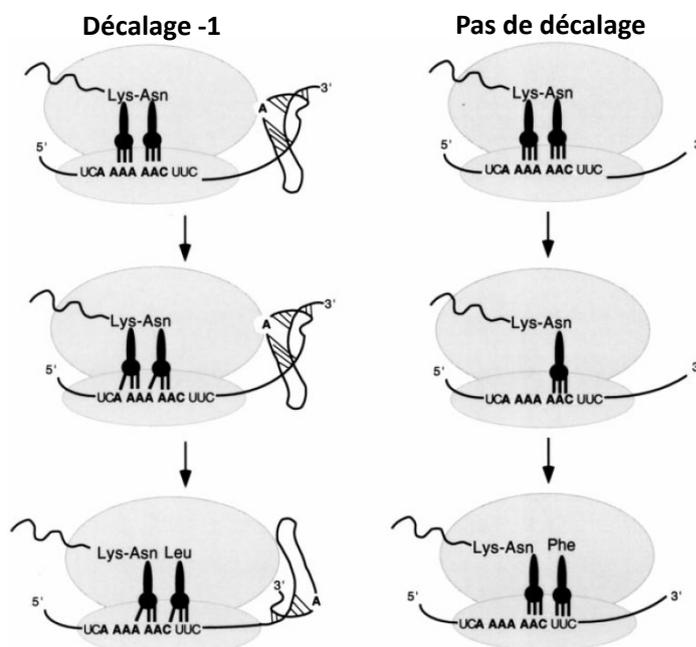


FIGURE 5.1 – Exemple de décalage de la phase de lecture au cours de la traduction. A gauche : le ribosome devant un pseudonœud recule d'un nucléotide sur la séquence de glissement de l'ARNm. Le site A du ribosome permet alors d'accueillir la Leucine. A droite : la même séquence de l'ARNm mais sans la structure secondaire de l'ARNm. Le site A du ribosome accueille alors un autre acide aminé : la Phénylalanine. La figure est extraite de [139].

A ce jour, les connaissances des mécanismes du décalage de la phase de lecture restent incomplètes. Il a par exemple d'abord été suggéré que la structure secondaire de l'ARNm permettait au ribosome de s'arrêter temporairement sur une séquence de glissement, augmentant ainsi les chances que le ribosome décale sa phase de lecture. L'étude dans [82] suggère quant à elle que la pause du ribosome sur cette séquence à elle seule n'est pas suffisante et que les forces nécessaires pour ouvrir la structure secondaire de l'ARNm sont également liées à l'efficacité du décalage de la phase de lecture du ribosome. D'autres facteurs sont également supposés

1. séquence du type X XXY YYZ sur laquelle le ribosome peut décaler sa phase de lecture.

5.1 Motivations

être corrélés à cette efficacité de changement de phase de lecture, tels que la composition de la séquence de glissement ou encore le nombre de nucléotides séparant cette séquence de la structure secondaire. Des études à l'échelle de la molécule unique permettraient d'apporter des informations sur l'influence des paramètres mentionnés mais aussi sur les mécanismes du décalage de la phase de lecture (comme par exemple les changements de conformation des ARN de transfert dans les différents sites du ribosome).

Sélenoprotéines Un deuxième cas de lecture alternative du code génétique concerne l'incorporation de la sélénocystéine dans une protéine (alors appelée sélénoprotéine). Cet acide aminé est codé par la séquence UGA de l'ARNm marquant normalement la fin de la traduction et nécessite l'intervention d'une tige boucle de l'ARNm : l'élément SECIS (SElenoCysteine Insertion Sequence). Chez les organismes procaryotes cette structure sert alors de point d'ancrage à un facteur d'élongation spécifique SelB, portant le sélénocystéyl-ARNt. Ce dernier est un homologue du facteur d'élongation EF-Tu, communément impliqué pour l'incorporation des autres ARN de transfert, et possède un site de reconnaissance spécifique à la structure SECIS [140]. Positionné à proximité du site A du ribosome, SelB permet ainsi de faciliter l'incorporation de la sélénocystéine dans la chaîne polypeptidique.

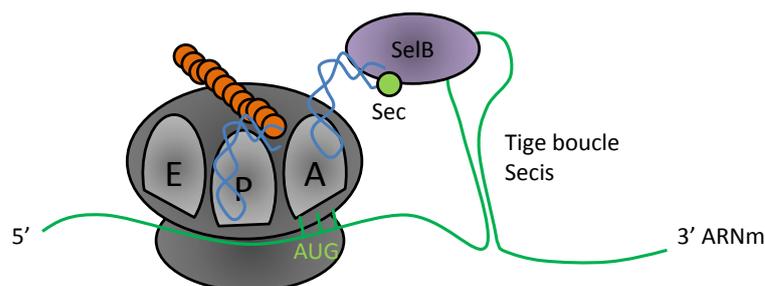


FIGURE 5.2 – Incorporation de la sélénocystéine dans une protéine. La structure SECIS de l'ARNm sert de point d'ancrage au facteur d'élongation SelB portant la sélénocystéine (SEC) et ainsi de faciliter l'incorporation de cet acide aminé dans la chaîne polypeptidique.

Dans ce deuxième exemple de lecture alternative du code génétique certains points restent encore à éclaircir. Le facteur d'élongation SelB interagit avec plusieurs partenaires induisant probablement des changements de conformation, que ce soit avec l'ARNm, l'ARNt ou encore le ribosome. Les sites d'interactions entre SelB et SECIS ont déjà pu être identifiés [140] mais des changements de conformation de SECIS pouvant faciliter son ouverture par le ribosome restent encore à étudier. Les sites d'interactions de SelB avec les sous unités ribosomiques sont également méconnus.

Vers des études en molécule unique Des études en cristallographie et cryo-microscopie ont déjà pu montrer leur potentiel pour connaître la conformation du ribosome à différentes étapes de la traduction avec des résolutions proches de l'atome [51,54,56,57]. Cependant ces techniques ne donnent des renseignements que sur des états figés et pour un ensemble de ribosomes. Or, les lectures alternatives du code génétique faisant intervenir ces structures secondaires ne se produisent que sur une certaine proportion des ribosomes et la dynamique joue une part importante sur l'efficacité du changement de la séquence traduite [79, 80, 141]. Une étude à l'échelle de la molécule unique permettrait de mieux comprendre les mécanismes induisant un

changement de la séquence polypeptidique fabriquée par le ribosome lors de la traduction. Pour initier une étude sur la cinétique de traduction en présence de ces structures secondaires, il convient d'abord de caractériser cette cinétique à l'échelle de la molécule unique en l'absence de celles-ci. C'est pourquoi nous allons nous concentrer dans un premier temps sur l'étude de la cinétique de traduction sans structure secondaire de l'ARNm et ainsi chercher à comprendre plus en détail les mouvements du ribosome le long de l'ARNm.

5.2 État de l'art des études en molécule unique des mécanismes de la traduction

Depuis ces dix dernières années, on peut trouver dans la littérature un nombre croissant d'études des mécanismes de la traduction par microscopie de fluorescence en molécule unique. Pour la plupart, ces études portent sur les changements conformationnels du ribosome ou des ARN de transfert en transit dans celui-ci lors de la traduction [61–69]. Pour pouvoir marquer d'un fluorophore certains facteurs de la traduction sans toutefois être limité par leur bruit de fluorescence lors de leur diffusion dans l'onde évanescente, il est nécessaire de limiter les concentrations de ces facteurs marqués à quelques dizaines de nanomolaires. Le calcul suivant donne une estimation de la concentration maximale en facteurs marqués en microscopie TIRF. Celle-ci est donnée par le fait que le volume élémentaire de détection doit contenir au maximum un fluorophore. Ce volume est donné par :

$$V = \pi \left(\frac{1.22\lambda}{2ON} \right)^2 \delta \quad (5.1)$$

où λ est la longueur d'onde d'émission du fluorophore, ON l'ouverture numérique de l'objectif de microscope et δ la profondeur de pénétration de l'onde évanescente d'excitation. D'où un volume élémentaire de 2.10^{-17} litre pour $\lambda = 600$ nm, $ON=1.45$ et $\delta = 100$ nm. Un seul fluorophore dans ce volume correspond alors à une concentration maximale de 83 nM. Cette concentration s'éloigne donc des conditions physiologiques où les concentrations en facteurs de la traduction sont plutôt de l'ordre du micromolaire. Ces études n'apportent donc pas d'informations représentatives de la cinétique dans les conditions réalistes des processus impliqués, mais donnent néanmoins des renseignements qualitatifs sur les mécanismes de ces processus. Nous allons ici donner un exemple d'une étude récente sur la traduction en molécule unique tirant profit de nanostructures "Zero Mode Waveguides" pour observer les temps de transit d'ARN de transfert dans le ribosome dans des concentrations proches des conditions physiologiques. Un second exemple d'expérience sera donné où les auteurs observent la traduction et la maturation d'une protéine fluorescente en utilisant des extraits cellulaires, donc dans des conditions physiologiques.

5.2.1 Exemple d'étude utilisant des Zero Mode Waveguides

Dans [74], Uemura et al. utilisent trois ARN de transfert portant chacun un acide aminé différent et marqués d'un fluorophore distinctif pour sonder leurs temps d'arrivée et de départ dans les sites A, P ou E du ribosome lors de la traduction. Les nanostructures "zero mode waveguides" (ZMW) utilisées par ces auteurs sont des cavités de quelques dizaines de nanomètres de diamètre dans une couche métallique déposée sur un substrat de silice (voir figure 5.3). L'appellation zero mode waveguides vient du fait qu'il n'y a pas de mode propagatif du

5.2 État de l'art des études en molécule unique des mécanismes de la traduction

faisceau d'excitation dans ces cavités et que seule une partie du champ pénètre celles-ci sur quelques dizaines de nanomètres depuis la surface. Ce confinement du champ d'excitation permet d'accéder à des volumes d'excitation de l'ordre du zeptolitre (10^{-21} L) et donc d'incuber des concentrations plus élevées en marqueurs fluorescents, tout en gardant un rapport signal sur bruit suffisant pour la détection de molécules uniques. Dans chacune de ces cavités, un

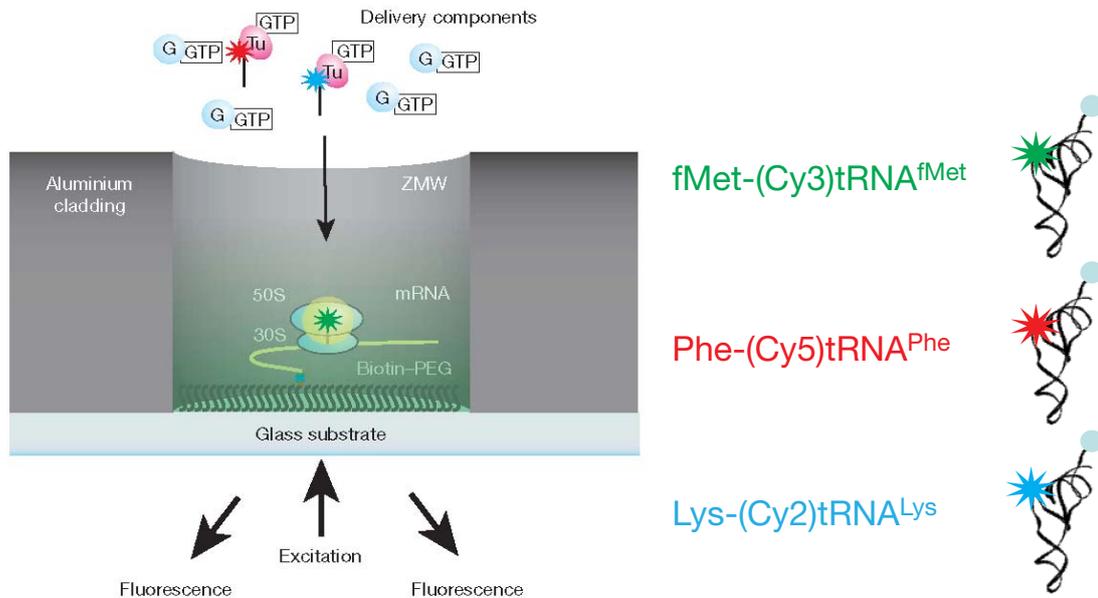


FIGURE 5.3 – *A gauche : schéma d'une des cavités cylindriques dites "zero mode waveguide" (de diamètre 50 à 200 nm). Les ribosomes sont attachés à la surface de ces cavités via un ARNm biotinylé. Les ARN de transfert, marqués d'un fluorophore et représentés sur la figure de droite, portent chacun un acide aminé et sont incubés sur la structure pour observer leur interaction avec le ribosome. La fluorescence des fluorophores Cy2, Cy3 ou Cy5 est excitée simultanément à 488, 532 et 642 nm.*

ribosome complexé à un ARNm est fixé à la surface, puis les ARNt marqués ainsi que des facteurs protéiques nécessaires à la traduction sont incubés sur la nanostructure. En excitant simultanément aux trois longueurs d'onde d'absorption des fluorophores, ces auteurs mesurent les temps d'arrivée, de départ et donc de présence de ces ARNt dans le ribosome en observant directement l'intensité de fluorescence des fluorophores dans leurs gammes spectrales respectives (voir figure 5.4).

L'utilisation des ZMW permet ici d'accéder à des concentrations en ARNt jusqu'à 500 nM, soit 10 fois plus élevées que les concentrations accessibles en microscopie TIRF conventionnelle, se rapprochant ainsi des conditions physiologiques de l'ordre du micromolaire. On remarquera que les auteurs utilisent ici du Trolox en complément d'un système enzymatique consommant l'oxygène du milieu, afin de rallonger la durée de vie des fluorophores et ainsi observer les durées de transit des ARNt dans le ribosome sans être gênés par le photoblanchiment. De cette façon, ils ont pu observer que le ribosome n'est occupé simultanément que par deux ARN de transfert, que le départ de l'ARNt du site E est décorrélié de l'arrivée d'un nouvel ARNt dans le site A, et qu'il intervient rapidement après l'étape de translocation. Les temps de transit et d'arrivée des ARNt sont quant à eux de l'ordre de quelques secondes, là où des expériences similaires

en microscopie TIRF mesurent des durées de l'ordre de plusieurs dizaines de secondes (dus aux concentrations limitées de certains facteurs de la traduction marqués d'un fluorophore). Ces expériences récentes sont une avancée majeure dans l'étude de la traduction en molécule unique, d'une part parce que les auteurs ont observé plusieurs cycles d'élongation du ribosome, là où les études précédentes se limitaient à un voire deux cycles, mais aussi parce que ces observations ont pu être faites à des concentrations en ARNt plus proches de celles rencontrées *in vivo*.

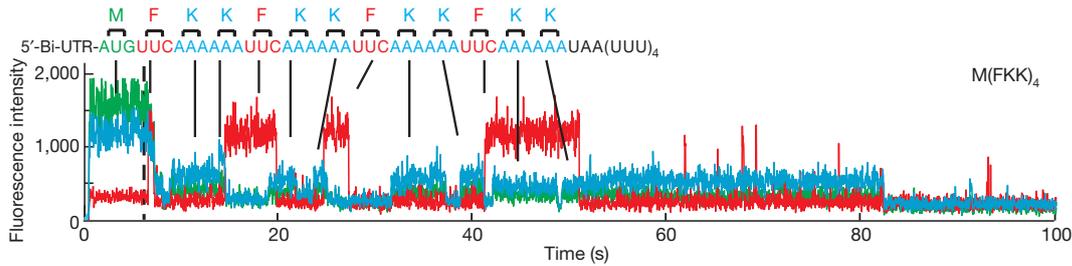


FIGURE 5.4 – Traces temporelles de la présence des ARN de transfert dans une même cavité. Les signaux observés traduisent la présence des ARNt, incubés à 200 nM, en transit dans le ribosome et la durée de ces signaux renseigne directement sur les temps d'arrivée et de départ des ARNt. On voit sur cette trace le transit de 13 ARN de transfert avec la séquence peptidique correspondante sur l'ARNm représentée au-dessus du graphique. M, F et K représentent respectivement les acides aminés Méthionine, Phénylalanine et Lysine.

5.2.2 Exemple d'étude dans des conditions physiologiques

Dans [42], Katranidis et al. s'intéressent au couplage de la fabrication de la protéine et de sa maturation. En utilisant un ARNm codant pour une protéine fluorescente à maturation rapide, la GFP emerald (emGFP), les auteurs mesurent la cinétique d'apparition de la fluorescence de celle-ci, soit le temps nécessaire pour la fabrication et la maturation de la protéine. Une séquence de 31 acides aminés est ajoutée à celle de la protéine, reliant par le tunnel de sortie le ribosome à la protéine en maturation et permettant ainsi le repliement de la séquence complète de la protéine tout en la maintenant attachée au ribosome.

Initialement, des ribosomes mutés sur la protéine L4 pour exprimer une biotine sont fixés à une surface PEG-biotine par l'intermédiaire d'une streptavidine. Ces ribosomes, complexés sur l'ARNm de l'emGFP, sont marqués non spécifiquement sur leurs Lysines par un ATTO 655 afin de les localiser sur la surface. La cinétique de traduction et de maturation de la protéine est mesurée entre l'instant où les extraits cellulaires, contenant tous les facteurs nécessaires à la traduction, sont injectés et le moment où le signal de fluorescence d'une protéine emGFP apparaît sur le même emplacement de la lamelle qu'un signal d'ATTO 655. L'absence de codon STOP sur l'ARNm et l'utilisation de facteurs anti-ARNtm (empêchant le recyclage des ribosomes à l'issue de la traduction) empêchent la dissociation des deux sous-unités. Les auteurs mesurent un temps caractéristique de 5 minutes pour cette cinétique. Ils estiment ainsi une vitesse de traduction supérieure à 1 acide aminé par seconde, soit un ordre de grandeur en dessous des mesures effectuées par Uemura et al. [74] utilisant les zero mode waveguides.

Une étude antérieure très similaire a été réalisée par l'équipe de Funatsu [41], sur la traduction d'une protéine fluorescente, l'uvGFP, par un ribosome fixé à la surface. Ces ribosomes

5.3 Etude de la cinétique de traduction du ribosome procaryote

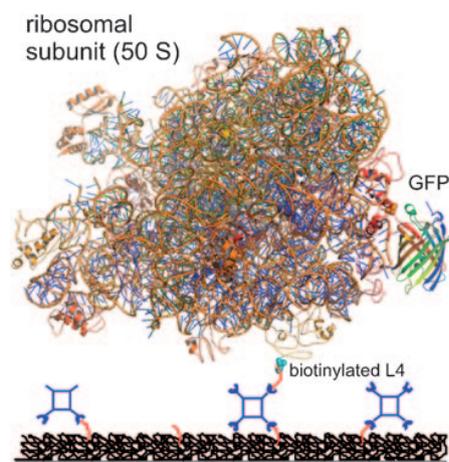


FIGURE 5.5 – Représentation de la configuration de l'étude de [42]. Le ribosome est muté sur la protéine L4 de sa grande sous-unité pour le fixer à une surface PEG-biotine. La fluorescence de la protéine traduite est ensuite colocalisée avec celle de l'ATTO 655 marquant non spécifiquement le ribosome.

sont quant à eux modifiés sur la petite sous-unité pour exprimer une extension de l'ARN ribosomal 16S. Celle-ci leur permet de s'hybrider à un oligonucléotide biotinylé et ainsi de se fixer sur une surface BSA-biotine par l'intermédiaire d'une streptavidine. Ces oligonucléotides sont également marqués d'un fluorophore, le Cy3, pour localiser les ribosomes sur la surface. Pour éviter que la protéine ne soit relâchée dans le milieu environnant une fois la traduction terminée, la séquence de l'ARNm comporte une séquence d'arrêt sur laquelle le ribosome s'immobilise et ne se défait pas du polypeptide en formation, ni de l'ARNm. Les auteurs ont ainsi pu observer la maturation de l'uvGFP en molécule unique et ce, en utilisant du PURE System [142], une solution reconstituée à partir des éléments² nécessaires à la traduction purifiés individuellement.

L'intérêt principal de ces expériences est donc pour nous de faire ces mesures dans des conditions représentant plus fidèlement un environnement physiologique en utilisant des extraits cellulaires ou du PURE system pour sonder la cinétique de la traduction (ainsi que celle de la maturation de la protéine). Ces expériences ont également prouvé l'activité traductionnelle de ribosomes mutés par l'observation d'une protéine fluorescente, dont nous nous inspirerons par la suite.

5.3 Etude de la cinétique de traduction du ribosome procaryote

L'objectif de cette section est d'observer l'activité traductionnelle de ribosomes procaryotes issus de bactéries E.Coli en molécule unique. Ces travaux ont été effectués en collaboration avec l'équipe de D.Fourmy et S.Yoshizawa du Centre de Génétique Moléculaire de Gif-sur-Yvette. Pour localiser le ribosome sur la surface de nos lamelles de microscope, nous utilisons des ribosomes mutés sur la grande sous-unité pour exprimer une protéine reconnue par un anticorps fixé à un cristal semi-conducteur (ou QD pour Quantum Dot). La durée de vie des QD étant

2. Eléments issus d'organismes procaryotes uniquement.

très supérieure à celles de fluorophores organiques, nous pouvons observer leur fluorescence sur de très longues durées (supérieures à une dizaine de minutes). Différentes stratégies ont été utilisées pour prouver l'activité de nos ribosomes en molécule unique ou bien pour mesurer des cinétiques de traduction.

A mon arrivée, l'équipe de biophysique de l'Institut d'Optique venait d'observer pour la première fois l'activité de ribosomes procaryotes sauvages accrochés non spécifiquement à la surface (on peut se référer à la thèse de David Dulin pour plus de détails). Durant ma première année commune avec la dernière année de thèse de D.Dulin, nous avons entrepris des expériences afin de prouver, en molécule unique, l'activité des ribosomes mutés en colocalisant les QDs avec des acides aminés marqués d'un fluorophore incorporés dans la protéine traduite. La difficulté de ces expériences, due en partie à l'utilisation d'acides aminés marqués, nous a amenés à concentrer nos efforts plutôt sur la mesure de la cinétique de la traduction qui, comme on va le voir, peut être caractérisée par la durée avant la disparition du signal du QD. Durant ma deuxième année de thèse nous avons à nouveau cherché à prouver l'activité de ribosomes, cette fois-ci sauvages, avec l'apparition d'un signal. Pour cela, l'ARNm traduit code pour une protéine fluorescente tandis qu'un oligonucléotide marqué est hybridé sur une séquence non codante de l'ARNm afin de le localiser. Selon la stratégie utilisée, nous chercherons donc ou non à visualiser la protéine pour la colocaliser avec le QD ou un oligonucléotide hybridé sur l'ARNm.

5.3.1 Stratégie de l'étude

5.3.1.1 Marquage du ribosome

Quantum Dots Les cristaux semi-conducteurs ou Quantum Dot (QD) sont des particules nanométriques présentant des propriétés photophysiques remarquables. Ils sont particulièrement appréciés pour leur taux d'émission de photons élevé, leur conférant un excellent rapport signal sur bruit pour l'observation en molécule unique, et leur durée de vie supérieure à celle des fluorophores organiques. Les QD utilisés ici sont excités à 638 nm et leur fluorescence collectée à 655 nm. Ils sont achetés avec une fonction amine permettant de se fixer à la fonction thiol d'un anticorps, dans notre cas l'anti-glutathione-s-transferase (anti-GST), suivant le protocole proposé par le fournisseur (Qdot Antibody Conjugation Kits, Invitrogen).

Marquage du ribosome Les ribosomes E.Coli sont préparés par nos collaborateurs du Centre de Génétique Moléculaire suivant un protocole similaire à celui publié dans [42]. Deux types de ribosomes mutés seront utilisés dans nos études. La glutathione-s-transferase (GST) est exprimée soit sur l'extrémité N de la protéine L22, soit sur celle de la protéine L4 de la grande sous-unité 50S comme représentées sur la figure 5.6. Un protocole détaillé peut être trouvé en annexe de la thèse de David Dulin précédant mes travaux de thèse. En résumé, un plasmide contenant la séquence de la protéine GST adjacente à celle de la protéine ciblée est introduit dans une souche d'E.Coli en croissance. Le plasmide vecteur pGEX-2T (Amersham Biosciences) permet la surexpression du gène inséré et donc une majorité de ribosomes contenant une protéine L4 ou L22 modifiée sont fabriqués par ces bactéries. Celles-ci sont ensuite lysées et le lysat est centrifugé puis filtré sur gradient de sucrose pour récupérer les ribosomes. Les ribosomes 70S mutés (petite et grande sous-unité) sont finalement séparés des ribosomes sauvages (non mutés) sur une colonne FPLC Glutathione Sepharose 4B (Fast Protein Liquid Chromatography) puis aliquotés et conservés à -80°C .

5.3 Etude de la cinétique de traduction du ribosome procaryote

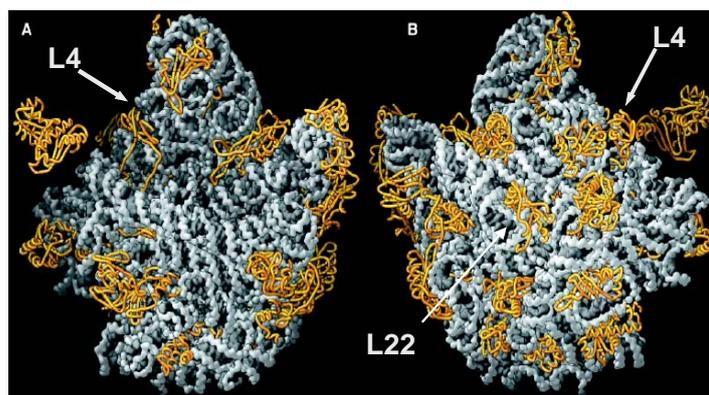


FIGURE 5.6 – Représentation de la grande sous-unité du ribosome avec l'emplacement des mutations effectuées soit sur la protéine L4, soit sur la protéine L22. A gauche est représentée la région à l'interface des deux sous-unités et à droite une vue extérieure de la grande sous-unité.

L'activité de ces ribosomes a été quantifiée en mesure d'ensemble par la mesure de la fluorescence d'une protéine de GFP traduite dans du Rapid Translation System (R.T.S., Roche) contenant les extraits cellulaires nécessaires pour la traduction, et dont les ribosomes sauvages ont été extraits par ultra-centrifugation. Comme le montre la figure 5.7, l'activité de ces ribosomes mutés est comparable à celle de ribosomes sauvages, que ce soit pour des ribosomes mutés en L4, L22 et complexés ou non avec des QDs.

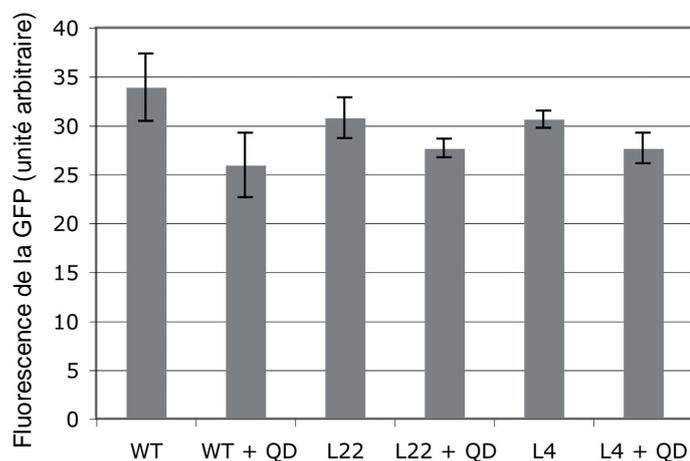


FIGURE 5.7 – Mesures d'ensemble de l'efficacité de la traduction pour des ribosomes sauvages (WT pour Wild Type) et des ribosomes mutés en L4 ou L22, en présence ou non de QDs. L'activité traductionnelle de ces ribosomes est quantifiée par mesure de la fluorescence des protéines de GFP traduites.

5.3.1.2 Complexation du ribosome sur l'ARNm et accroche à la surface

Les ribosomes mutés sont complexés sur un ARNm de la GFP sur lequel une extension est rajoutée en 3'. Sur celle-ci est hybridé un oligonucléotide ADN³ biotinylé en 5' pour fixer le complexe ribosome-ARNm sur une surface PEG-biot par l'intermédiaire d'une avidine (voir figure 5.8). Les ribosomes 70S mélangés aux ARNm-oligoBiot, viennent s'initier sur le codon

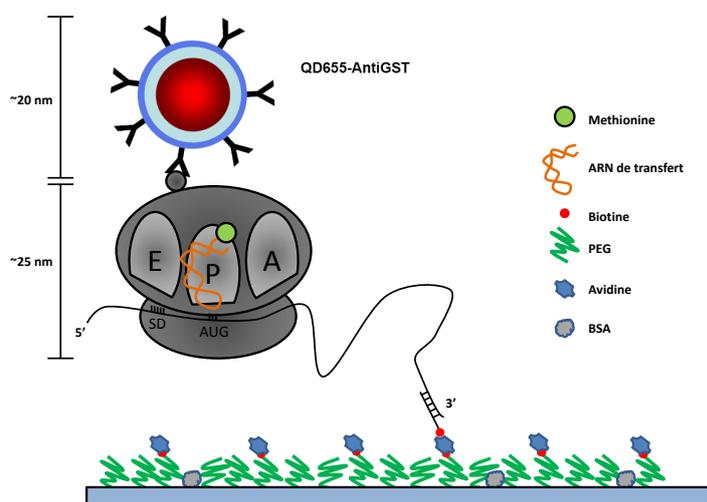


FIGURE 5.8 – Schéma de l'accroche du ribosome à la surface. Le ribosome est complexé sur l'ARNm de la GFP. Celui-ci comporte une extension en 3' afin d'hybrider un oligonucléotide ADN biotinylé. Un QD fixé spécifiquement sur la protéine L4 ou L22 de la grande sous-unité permet de localiser le ribosome sur la surface. La séquence Shine Dalgarno (SD) de l'ARNm ainsi que le *fMet-ARNt^{fMet}* positionné dans le site P permettent de stabiliser le ribosome sur l'ARNm. La surface pegylée est passivée à l'aide de BSA et de caséine afin d'empêcher l'interaction non spécifique du système étudié avec la surface.

start de l'ARNm. Contrairement à ce que beaucoup d'ouvrages laissent penser, en présence de la séquence Shine Dalgarno (SD) l'initiation des ribosomes sur l'ARNm ne nécessite pas obligatoirement une dissociation des deux sous-unités du ribosome ainsi que la présence des facteurs d'initiation (IF1-IF3). Des études ont démontré que les ribosomes 70S sont capables de se complexer seuls à l'ARNm sans avoir à se dissocier ni à balayer la séquence de l'ARN depuis son extrémité 5' [143, 144]. Nos ribosomes 70S, en présence de l'ARNm, viennent donc se positionner sur le codon start (AUG), tandis que la séquence SD en amont du codon AUG permet de les stabiliser sur l'ARNm (via la complémentarité de la séquence SD de l'ARNm et celle de l'ARN ribosomal 16S de la sous-unité). Ces complexes ribosomes-ARNm sont ensuite incubés avec des ARN de transfert (*ARNt^{fMet}*) portant l'acide aminé méthionine formylé (fMet), du codon start. Ces ribosomes, également stabilisés par le *fMet-ARNt^{fMet}* positionné dans leur site P, sont mélangés avec les QDs anti-GST qui se lient à la GST de la protéine mutée de la grande sous-unité. Ce mélange est ensuite dilué à 1 nM en ARNm puis incubé 10 minutes dans les cellules microfluidiques (décrites dans le chapitre 3) avant d'être rincé avec un tampon contenant notamment 1 μ M de *fMet-ARNt^{fMet}* (voir les détails du protocole en annexe). Les complexes sont ainsi fixés sur la surface des cellules et prêts pour la traduction.

3. La séquence de cet oligonucléotide est 5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC GTT GTA-3'

5.3 Etude de la cinétique de traduction du ribosome procaryote

Afin d'éviter les interactions non spécifiques du système biologique avec la surface, celle-ci est non seulement fonctionnalisée avec du PEG (polymère neutre couramment utilisé dans ce type d'expérience en molécule unique pour passiver la surface) mais elle est aussi passivée avec de la BSA (incubée 30 minutes à 3g/L) ainsi qu'avec du Blocking Reagent (Roche, également incubé 30 minutes et à 10g/L), juste avant l'étape d'incubation des ribosomes, afin de bloquer les zones de la surface qui ne seraient pas couvertes de PEG.

5.3.2 Expériences de traduction

5.3.2.1 Cinétique de traduction en molécule unique

Dans cette section nous nous intéressons à la vitesse de traduction des ribosomes mutés, fixés à la surface via l'ARNm comme représenté sur la figure 5.8. Pour ce faire, l'acquisition des images est synchronisée avec l'injection d'extraits cellulaires (RTS 100 E.Coli HY kit, Roche, déplété en ribosomes sauvages). Le moment où les facteurs de traduction atteignent la zone d'observation est estimé connaissant la vitesse d'injection du pousse seringue (100 μ l/min), la longueur et le diamètre du capillaire d'injection (cellules microfluidiques à pression positive, décrites dans le chapitre 3) ainsi que la distance séparant la zone d'observation de l'entrée de la cellule dont la section du canal est connue.

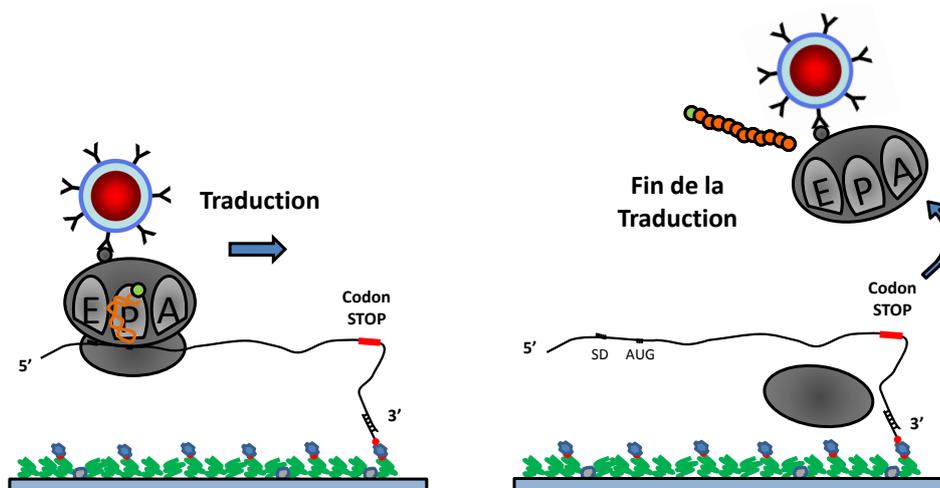


FIGURE 5.9 – Principe de l'expérience. A l'instant initial (image de gauche) les ribosomes sont fixés à la surface par l'intermédiaire de l'ARNm. L'ARN de transfert portant la méthionine permet de stabiliser le ribosome initié sur l'ARNm. Au moment où les extraits cellulaires atteignent le ribosome, celui-ci avance sur l'ARNm en synthétisant un polypeptide. Une fois le codon STOP atteint (image de droite), les deux sous-unités du ribosome se dissocient et la sous-unité 50S diffuse hors de l'onde évanescente.

En présence des extraits cellulaires, les ribosomes initiés sur l'ARNm avec le $fMet$ – $ARNt^{fMet}$ dans le site P, commencent la traduction et avancent sur l'ARNm jusqu'au codon stop. Lorsque celui-ci est atteint, les deux sous-unités des ribosomes se dissocient et se séparent de l'ARNm, diffusant alors hors de l'onde évanescente (voir figure 5.9). La fin de la traduction est donc marquée par la disparition du signal des QD.

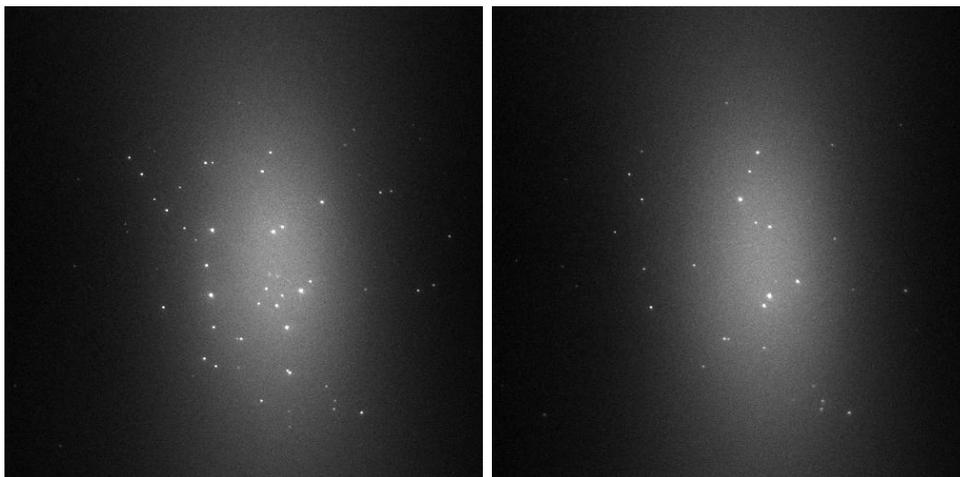


FIGURE 5.10 – Première et dernière images de la série d’acquisition de la synthèse de la protéine de la GFP. A gauche, les ribosomes mutés L22 sont initiés sur l’ARNm. La fluorescence des QDs accrochés à la grande sous-unité permet de localiser ces ribosomes sur la surface. A droite, même zone de l’échantillon après injection des extraits cellulaires. Sur les 43 QDs initialement présents, 21 sont partis à l’issue de la série d’images de durée totale 3 minutes et 40 secondes.

Cinétique de départ des QDs Des séries de 200 images de 100 ms d’acquisition, durant lesquelles l’échantillon est éclairé par la diode laser émettant à 638 nm, avec 1 seconde de temps de pause entre chaque image, sont réalisées durant l’injection du RTS. Ces images sont ensuite analysées sous IGOR Pro pour repérer la position initiale (avant l’arrivée des extraits cellulaires) des ribosomes fixés à la surface par la fluorescence des QD (voir figure 5.10) puis pour tracer l’histogramme cumulatif des disparitions des QDs, et donc a priori des ribosomes ayant traduit, en fonction du temps comme représenté sur la figure 5.11. On voit qu’à partir de l’instant où les extraits cellulaires arrivent sur la zone d’observation, on a un nombre croissant de QDs qui disparaissent. En effectuant un ajustement exponentiel sur cette courbe et en prenant en compte le temps d’arrivée des extraits cellulaires, on obtient une cinétique de disparition de 5 à 6 acides aminés par seconde soit 1 acide aminé en 170 ms, en supposant que le départ des QDs est bien lié à la traduction. Cette cinétique serait du même ordre de grandeur que celle mesurée dans [42] et inférieure à celle in vivo (environ 15 acides aminés par seconde [145]). La présence de la surface [146] ou la température (ici à 22°C) sont probablement ici des facteurs limitant la vitesse de la traduction.

Contrôle à l’érythromycine Pour confirmer le fait que la courbe de la figure 5.11 représente bien une cinétique de traduction, nous avons réalisé la même expérience mais en présence d’un antibiotique, l’érythromycine. Celui-ci se lie à la grande sous-unité 50S pour bloquer la translocation et par conséquent la traduction. L’expérience précédente a été reproduite avec 3mM d’érythromycine dans les extraits cellulaires pour empêcher le ribosome d’avancer sur l’ARNm. Nous avons obtenu aux temps initial et final les images de la figure 5.12.

Sur les 96 QDs détectés sur la première image, 78 sont toujours présents à la fin du film. On a donc bien un effet de l’antibiotique sur la cinétique de disparition des QDs puisque de 49% de QDs dissociés de la surface, on passe ici à 19% en présence de l’antibiotique. Une raison pouvant expliquer le fait que tous les QDs ne soient pas restés à la surface à l’issue du film serait que des

5.3 Etude de la cinétique de traduction du ribosome procaryote

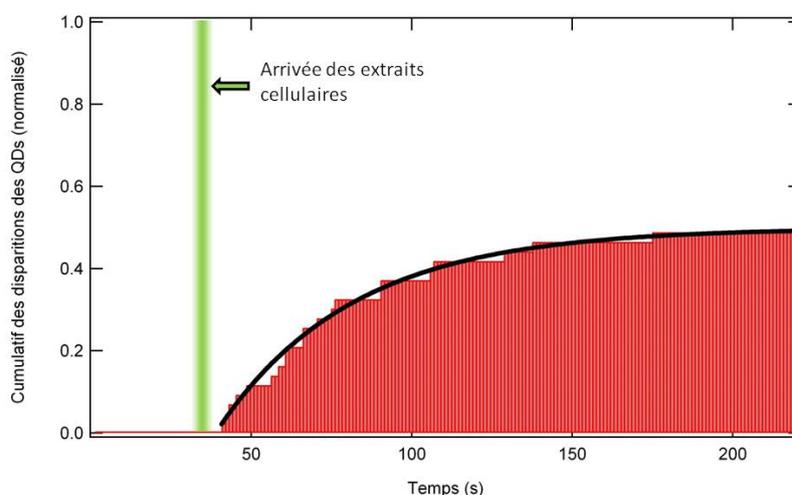


FIGURE 5.11 – Cinétique de disparition des QDs. L'analyse des images permet de tracer l'histogramme cumulatif des disparitions des QDs en fonction du temps. En effectuant un ajustement exponentiel (courbe noire) sur ces histogrammes et en prenant en compte le temps d'arrivée des extraits cellulaires (représenté par la ligne verte sur le graphique), on obtient une cinétique de disparition de 5 à 6 acides aminés par seconde.

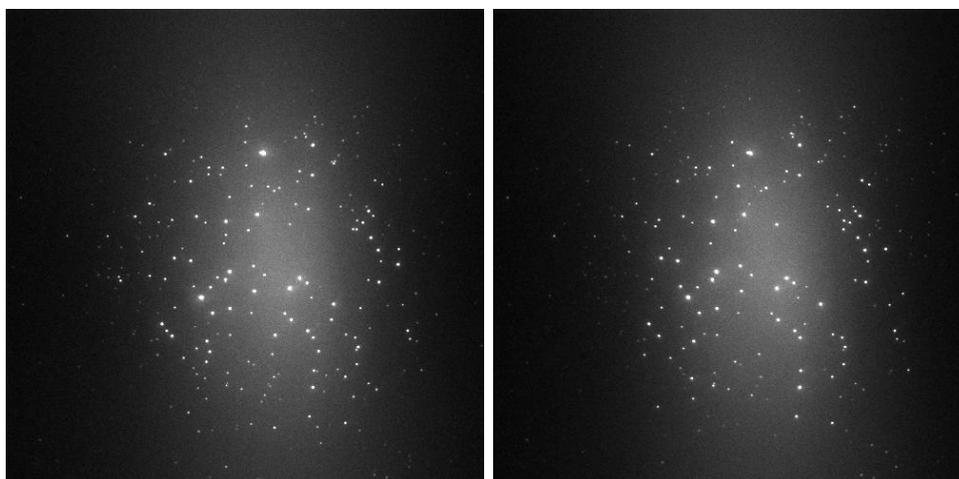


FIGURE 5.12 – Première et dernière images de la série d'acquisition de la synthèse de la protéine de la GFP en présence de l'antibiotique érythromycine. Sur les 96 QDs initialement présents (à gauche), 18 sont partis à l'issue de l'acquisition des 200 images.

facteurs de dissociation, présents dans les extraits cellulaires, soient à l'origine de la séparation des deux sous-unités de certains ribosomes. En effet, lors du rinçage des complexes ribosomes-ARNm non fixés à la surface, le tampon utilisé ne contenait pas les $fMet-ARNt^{fMet}$. Certains de ces ARN de transfert seraient alors susceptibles de s'être dissociés des ribosomes lors du

rinçage, ce qui serait perçu par les facteurs de dissociation comme une erreur dans l'initiation du ribosome sur l'ARNm (pour rappel, lors de l'initiation "classique", la grande sous-unité 50S s'associe à l'aide des facteurs d'initiation sur l'unité 30S déjà complexée sur l'ARNm et l' $ARNt^{fMet}$). Une seconde explication viendrait du mécanisme d'action de l'érythromycine, encore mal connu. Les études dans [147, 148] démontrent que l'inhibition de cet antibiotique sur la traduction se jouerait principalement au niveau de l'initiation du ribosome, empêchant l'association des deux sous-unités, et que les complexes formés par les ribosomes bloqués par l'érythromycine au cours de la traduction seraient instables.

En traçant sur le même graphique la cinétique de disparition des QDs avec et sans l'érythromycine, nous avons un moyen de comparer également l'influence de l'antibiotique sur la cinétique de disparition des QDs (voir figure 5.13). En se plaçant dans le cas où il s'agirait bien d'une cinétique de traduction, de 5 acides aminés incorporés par seconde dans l'expérience précédente on passe à 2 acides aminés par seconde en présence de l'érythromycine. Ce ralentissement de la cinétique de traduction serait dû à l'instabilité des complexes formés entre l'antibiotique et les ribosomes.

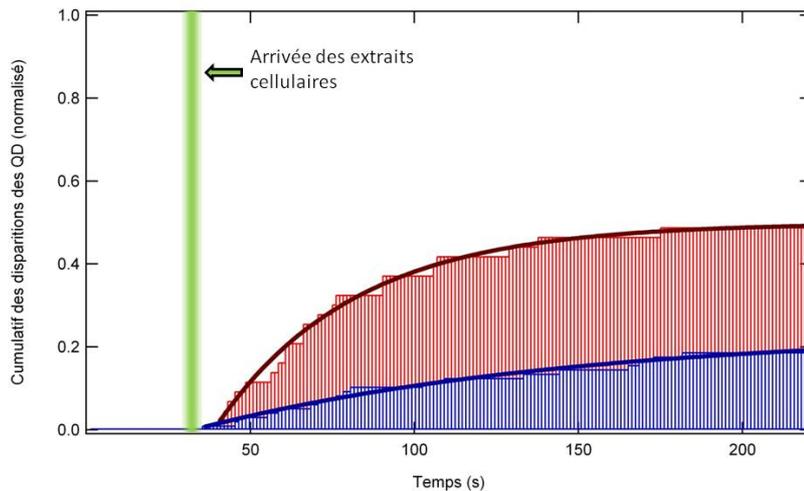


FIGURE 5.13 – Cinétique de disparition des QDs en présence de l'antibiotique érythromycine, représenté par l'histogramme bleu, comparée à la cinétique sans érythromycine, en rouge. Le rôle de l'antibiotique est ici de bloquer la traduction. L'ajustement exponentiel donne une vitesse caractéristique de 2 acides aminés par seconde en présence de l'antibiotique (courbe bleue) contre 5 à 6 acides aminés par seconde sans l'antibiotique (courbe rouge).

Ces expériences sont donc très encourageantes sur le fait que nous sommes bien témoins de l'activité traductionnelle de ribosomes en molécule unique. Elles ne constituent cependant pas une preuve formelle de cette activité. Des facteurs de dissociation ou bien des activités RNAses (dégradant l'ARNm) pourraient également être responsables de la disparition des QDs de la surface, bien que ceci n'expliquerait pas l'inhibition observée avec l'antibiotique.

5.3 Etude de la cinétique de traduction du ribosome procaryote

5.3.2.2 Mise en évidence de l'activité des ribosomes-QDs

Pour avoir une preuve absolue de l'activité des ribosomes mutés en molécule unique, notre stratégie consiste à colocaliser la protéine traduite par le ribosome avec le QD fixé au ribosome. Pour visualiser la protéine, deux possibilités ont été envisagées. L'une consiste à incorporer des acides aminés marqués d'un fluorophore à la protéine en cours de traduction : les lysines Bodipy-Fl. L'autre est de faire traduire une protéine fluorescente à maturation rapide, l'emGFP.

Marquage des acides aminés La première stratégie pour prouver l'activité de nos ribosomes mutés en molécule unique a été testée au tout début de ma thèse. Celle-ci consiste à localiser la protéine synthétisée par un fluorophore, le Bodipy-Fl, fixé sur chacune des lysines incorporées, et de colocaliser son signal avec celui du QD. Des ARN de transfert de la lysine, chargés avec des lysines déjà marquées par le Bodipy-Fl sont disponibles commercialement (FluorotectTM Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System, Promega). La taille de ce fluorophore est suffisamment petite pour entrer dans le tunnel de sortie du ribosome sans trop perturber son activité.

Pour ces expériences, nous avons synthétisé un ARNm comprenant du côté 5' la séquence Shine Dalgarno ainsi que le codon start AUG, et du côté 3' une quarantaine d'adénines dont chaque triplet code pour une lysine marquée. Cet ARNm est en plus biotinylé en son extrémité 3', permettant de l'accrocher directement à la surface sans l'intermédiaire d'un oligonucléotide ADN biotinylé, et ne comprend pas de codon STOP.

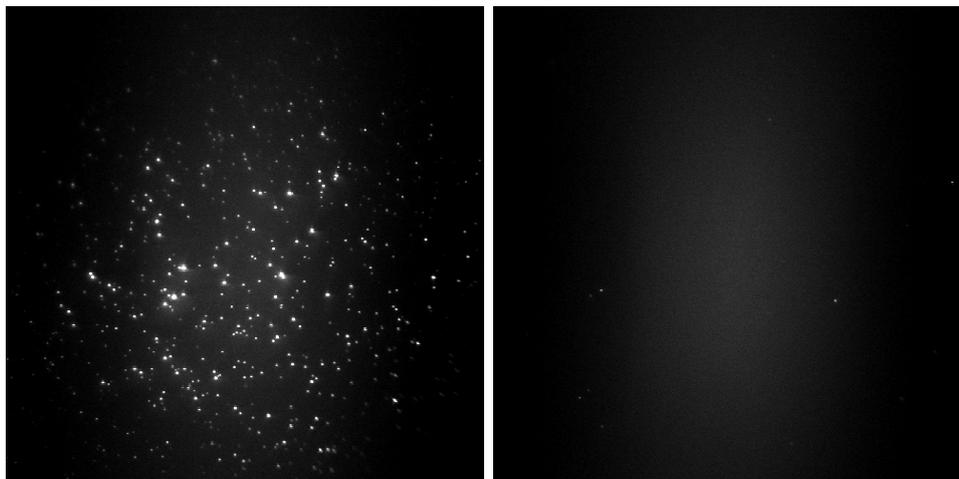


FIGURE 5.14 – Traduction d'un ARNm Poly-Adénines dans un microtube avec une reconstitution des facteurs de la traduction. Le résultat de la traduction est ensuite injecté dans la cellule microfluidique. On obtient à gauche : du signal des QDs fixés aux ribosomes en l'absence du facteur d'élongation, l'EF-G, nécessaire au ribosome pour avancer sur l'ARNm. A droite : l'absence de signal lorsque l'EF-G est présent avec les autres facteurs de la traduction. Ce dernier résultat laisse suggérer une activité traductionnelle du ribosome dans le mélange des facteurs de la traduction.

Les premières expériences de traduction ont été effectuées dans un microtube contenant une reconstitution des facteurs de la traduction avec notamment de l'EF-G et des ARNt-Lysine-Bodipy-Fl (voir en annexe pour le détail du protocole). Le résultat a ensuite été injecté sur les surfaces fonctionnalisées. En l'absence du facteur d'élongation EF-G, nécessaire aux ribosomes

pour avancer sur l'ARNm, ces derniers s'accrochent bien à la surface via l'ARNm, tandis qu'en présence de l'EF-G nous n'observons pas, ou peu, de signal des QDs à la surface (voir figure 5.14). Ces tests ont été réalisés plusieurs fois avec le même résultat. Deux hypothèses peuvent expliquer ces observations. La première serait que la biotine, d'une taille similaire à celle de l'adénine, soit entrée dans le ribosome à l'issue de la traduction, ne donnant pas accès à l'avidine de la surface et empêchant donc sa fixation. La seconde serait que le ribosome ne soit pas stable sur la séquence poly-adénines et se dissocie de l'ARNm. Dans les deux cas, cela signifie que les ribosomes sont actifs dans ce mélange des facteurs de la traduction contenant comme seuls acides aminés les lysines marquées.

Les expériences de traduction en cellule microfluidique pour colocaliser le signal des QDs avec celui des Lysines marquées, n'ont quant à elles pas donné de résultats concluants. Lors de l'injection des facteurs de la traduction, contenant les lysines-Bodipy-F1 à 20 nM, les QDs restent fixés à la surface et aucun signal de Bodipy-F1 colocalisé n'est visible après rinçage, ce qui laisse suggérer que la traduction n'a pas lieu. Une possibilité serait que la longueur de l'ARNm soit trop courte et par conséquent le ribosome trop proche de la surface pour pouvoir avancer sans être gêné. On soulignera ici la difficulté de ces expériences, notamment pour visualiser la protéine traduite. Deux facteurs rendent en effet l'identification des Lysines-Bodipy-F1 incorporées délicate, d'une part à cause des propriétés photophysiques modestes du Bodipy-F1 qui compliquent son identification parmi le bruit d'autofluorescence de l'aminosilane aux mêmes longueurs d'onde, et d'autre part à cause des accroches non spécifiques rencontrées avec l'utilisation des ARNt-Lysine-Bodipy-F1, malgré l'utilisation de surfaces PEG. Les résultats récents obtenus avec l'utilisation du système ROXS pour augmenter la durée de vie et le nombre de photons émis par le Bodipy-F1 (voir chapitre 4), ainsi que les améliorations du protocole de chimie de surface (voir chapitre 3) réduisant l'autofluorescence de l'aminosilane, devraient améliorer la détectivité pour les prochaines expériences.

Protéines fluorescentes Une deuxième stratégie a été utilisée pour visualiser la fluorescence d'une protéine synthétisée par le ribosome, nous nous sommes pour cela inspirés des travaux de Katranidis et al. [42] ainsi que de Uemura et al. [41]. Nous nous inspirons des premiers auteurs pour la séquence de l'ARNm traduite par le ribosome qui code pour une emGFP, une protéine fluorescente à maturation rapide (<5 minutes), ainsi que pour une courte chaîne peptidique permettant de relier, via le tunnel de sortie, le site peptidyl transférase du ribosome à la séquence peptidique de la protéine fluorescente (sortie du ribosome), tandis que nous nous inspirons des seconds auteurs pour la séquence d'arrêt permettant de stabiliser le ribosome sur l'ARNm, une fois la protéine traduite, et ainsi de laisser le temps à la protéine de maturer (et ainsi devenir fluorescente) tout en restant colocalisée au QD du ribosome fixé à la surface. A ce stade de ma thèse nous avons toutefois commencé à manquer de ribosomes mutés et ces expériences ont alors été réalisées sur deux types de ribosomes : soit mutés et dans ce cas la protéine est, comme nous venons de le dire, colocalisée avec le QD, ou soit sauvages et dans ce cas la protéine est colocalisée avec le signal d'un oligonucléotide ADN marqué d'un fluorophore, l'ATTO647N, hybridé sur une séquence non traduite de l'ARNm.

Ces expériences n'ont toutefois pas encore été concluantes. Elles sont en effet plus délicates à réaliser du fait que l'efficacité de la séquence d'arrêt n'est pas de 100% et dépend de la température et des concentrations des extraits cellulaires. Une dilution d'un facteur 2 du RTS par rapport au protocole conseillé par le fournisseur, ainsi qu'une température de 22°C donnent, en mesure d'ensemble, une efficacité de la séquence d'arrêt optimale. Nous avons également

5.3 Etude de la cinétique de traduction du ribosome procaryote

tenté de faire la traduction dans un microtubule puis d'injecter le résultat sur nos lamelles, mais là encore les résultats ne sont pas concluants, ce qui laisse penser que soit la traduction n'a pas eu lieu, soit les ribosomes ne sont pas suffisamment stables sur la séquence d'arrêt. Une difficulté supplémentaire vient, de la même façon qu'avec les expériences impliquant l'utilisation des Lysines-Bodipy-Fl, du fond d'autofluorescence de l'aminosilane utilisé pour fonctionnaliser les surfaces et y fixer le PEG. Ce fond émet aux mêmes longueurs d'onde que la fluorescence de l'emGFP et rend donc l'identification d'une protéine unique difficile. Ici aussi les optimisations récentes des protocoles de silanisation devrait améliorer la détectivité de la protéine fluorescence pour les prochaines expériences.

5.3.3 Conclusions et perspectives

Au travers de cette section sur l'étude du ribosome procaryote, nous avons exploré plusieurs stratégies pour observer la traduction de ribosomes mutés en molécule unique. La mutation de la protéine L22 ou L4 sur la grande sous-unité nous permet de fixer un nanocristal semiconducteur (QD) et ainsi d'observer la présence des ribosomes sur des surfaces pegylées sur de longues durées. Ces ribosomes marqués sont complexés sur un ARNm attaché à la surface, puis les extraits cellulaires sont injectés dans la cellule microfluidique pour observer la traduction. La fin de cette traduction, qui correspond au décrochage du ribosome de l'ARNm lorsque le ribosome atteint le codon stop, étant mise en évidence par la disparition du QD de la surface de l'échantillon, nous avons pu mesurer une vitesse de traduction de 6 acides aminés par seconde pour de tels ribosomes. Cette activité traductionnelle du ribosome est soutenue par un contrôle dans lequel un antibiotique, l'érythromycine, est ajouté aux extraits cellulaires inhibant la traduction.

Afin de prouver sans ambiguïtés l'activité de ces ribosomes mutés, nous avons cherché à colocaliser la protéine traduite avec la fluorescence du QD. Pour ce faire nous avons testé deux stratégies. La première consiste à incorporer des acides aminés marqués dans la protéine en croissance. Ces acides aminés sont commercialisés sous la forme d'ARN de transfert portant une lysine marquée du Bodipy-Fl. Les premières expériences de traduction en microtubule ont montré que les ribosomes étaient actifs dans un mélange reconstituant les facteurs de la traduction et uniquement les acides aminés marqués. Les tests de traduction effectués en cellule microfluidique n'ont par contre pas été concluants. Une cause possible serait la taille trop courte de la séquence du poly-adénines à traduire, qui ramènerait le ribosome trop près de la surface pour qu'il soit actif. Malgré ce test négatif, l'utilisation d'acides aminés marqués reste une approche avec un grand potentiel pour étudier la traduction. En combinant le système ROXS décrit dans le chapitre 4 à nos expériences de traduction, nous pourrions observer l'incorporation des Bodipy-Fl en temps réel tout en prouvant l'activité du ribosome. Un premier test a toutefois montré un problème de compatibilité entre le PCD et la traduction (la traduction dans le RTS étant inhibée en présence du PCD), mais une purification de cette enzyme, voire un remplacement du système enzymatique PCA/PCD (consommant l'oxygène) par une solution à base de galactose oxydase [124], pourront être envisagés pour solutionner ce problème.

La deuxième configuration testée pour prouver formellement l'activité de nos ribosomes consiste à traduire une protéine fluorescente à maturation rapide, l'emGFP, stabilisée avec le ribosome sur l'ARNm par une séquence d'arrêt sur ce dernier. Du fait de la faible efficacité de cette séquence d'arrêt ainsi que du fond de fluorescence de la lamelle, nous n'avons pas été en mesure de colocaliser les signaux désirés. Les optimisations récentes des protocoles de fonctionnalisation de la lamelle pour accrocher notre système biologique ont permis de

diminuer ce fond de fluorescence, ce qui facilitera les futures expériences pour l'identification de la protéine fluorescente en molécule unique. Les expériences à venir consisteront à visualiser la fluorescence d'une autre protéine à maturation rapide, la YFP (Venus), dont la séquence d'arrêt a montré en mesure d'ensemble une meilleure efficacité, et dont le spectre d'émission, décalé vers le jaune par rapport à celui de l'emGFP, facilitera son observation.

Ces ribosomes mutés présenteront également un grand intérêt pour l'étude de la traduction par pince optique. Le marquage par GST sur la grande sous-unité pourrait être utilisée (ou remplacée par un autre type de marquage ayant une meilleure affinité avec son anticorps) pour accrocher le ribosome sur une bille ou une surface et de suivre la traduction en mesurant les déviations d'une autre bille piégée et fixée à l'extrémité 3' de l'ARNm.

5.4 Etude de la cinétique de traduction du ribosome eucaryote

Les expériences suivantes concernant l'étude du ribosome eucaryote en molécule unique ont été réalisées en collaboration avec l'équipe d'Olivier Namy de l'Institut de Génétique et Microbiologie d'Orsay. Ces ribosomes sont purifiés à partir de réticulocytes de lapins (globules rouges) tandis que les extraits cellulaires utilisés pour la traduction sont des lysats de ces réticulocytes (RRL, Rabbit Reticulocytes Lysat). Les expériences réalisées sont similaires à celles sur le ribosome procaryote, à la différence que le marquage du système biologique consiste à hybrider sur l'ARNm traduit un oligonucléotide marqué d'un fluorophore, l'ATTO 647N. L'activité hélicase⁴ du ribosome [53, 149] permet de déshybrider cet oligonucléotide qui, de la même façon que les QDs utilisés sur les ribosomes procaryotes, sort par diffusion du champ d'excitation du laser. On ne sonde donc pas ici la fin de la traduction mais le passage du ribosome à un endroit donné de l'ARNm.

On remarquera qu'aucune étude en molécule unique sur le ribosome eucaryote n'a encore été réalisée à ce jour. Les raisons étant que la reproduction des étapes de l'initiation *in vitro* pour des études en molécule unique est particulièrement complexe et que la structure atomique complète du ribosome eucaryote n'a été révélée que récemment, rendant peu accessible un marquage spécifique du ribosome. Observer la traduction de ribosomes eucaryotes en molécule unique représente donc un enjeu de taille et permettrait de clarifier de nombreux mécanismes, dont notamment les étapes de la terminaison.

5.4.1 Stratégie de l'étude

5.4.1.1 Complexation du ribosome sur l'ARNm : IRES

L'initiation de la traduction chez les eucaryotes nécessite l'intervention d'une dizaine de facteurs d'initiation, ce qui impliquerait la purification de chacun de ces éléments pour complexer les ribosomes sur l'ARNm dans nos expériences en molécule unique. Nous utilisons comme alternative une structure particulière de l'ARNm permettant de complexer les ribosomes sans l'intervention de facteurs d'initiation : l'IRES CrPV (Cricket Paralysis Virus Internal Ribosome Entry Sites). Alors que l'initiation "classique" pour le ribosome eucaryote fait intervenir un balayage de l'ARNm depuis son extrémité 5' jusqu'au codon START, l'IRES permet au ribosome de se positionner sur l'ARNm sur une position interne de celui-ci, sans reconnaissance de la coiffe en 5' de l'ARNm ni celle d'un codon START. La structure secondaire de l'ARNm que nous utilisons, d'une longueur d'environ 200 nucléotides, possède trois pseudo-nœuds dont un

4. activité permettant la dissociation d'oligonucléotides appariés.

5.4 Etude de la cinétique de traduction du ribosome eucaryote

mime la présence d'un ARN de transfert dans le site P. Par conséquent, l'initiation sur l'IRES ne requiert ni l'intervention de la méthionine et de son ARN de transfert comme c'est le cas chez le procaryote, ni la présence d'un quelconque ARN de transfert dans le site P du ribosome.

Une description de l'initiation du ribosome sur l'IRES est donnée sur la figure 5.15. La sous-unité 40S vient reconnaître l'IRES et positionne dans son site P la réplique d'un ARN de transfert, puis une grande sous-unité est réquisitionnée pour former le complexe 80S sur l'ARNm. Une fois dans le milieu contenant les facteurs de la traduction, le ribosome peut entamer une pseudotranslocation pour amener l'ARN de transfert apparié dans son site A vers le site P, puis continuer "normalement" la traduction.

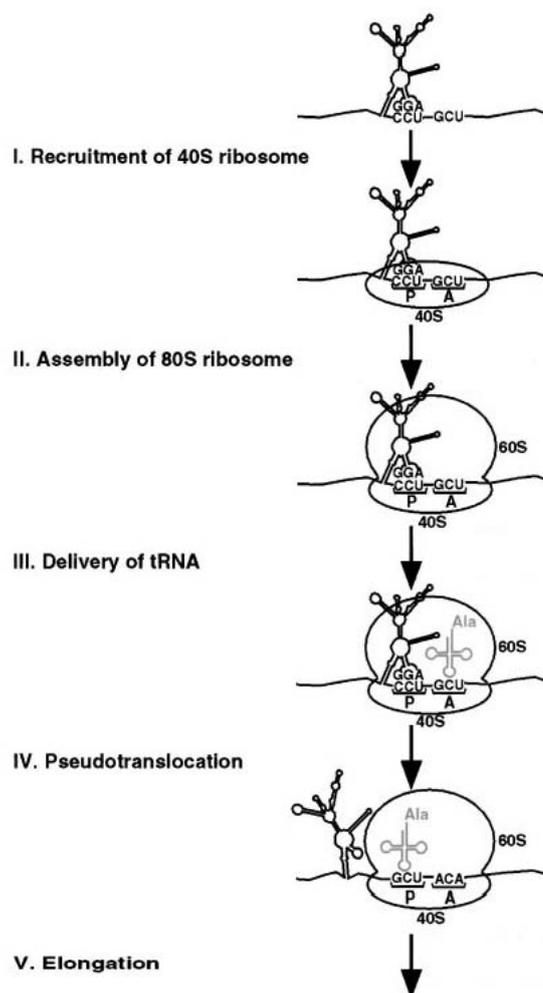


FIGURE 5.15 – Initiation du ribosome eucaryote sur la structure IRES CrPV de l'ARNm, extrait de [150]. I : la sous-unité 40S vient reconnaître l'IRES et positionne dans son site P la réplique d'un ARN de transfert. II : une grande sous-unité est réquisitionnée pour former le complexe 80S sur l'ARNm. III et IV : une fois dans le milieu contenant les facteurs de la traduction, le ribosome peut entamer une pseudotranslocation pour amener l'ARN de transfert apparié dans son site A vers le site P, puis continuer "normalement" la traduction (V).

5.4.1.2 Accroche du complexe à la surface et marquage de l'ARNm

Accroche du complexe à la surface A la différence des expériences avec le ribosome procaryote, les ribosomes sont ici fixés à la surface par l'intermédiaire d'un oligonucléotide ARN biotinylé⁵, hybridé sur l'extrémité 5' de l'ARNm. Le ribosome est complexé sur l'IRES situé 21 nucléotides en aval de l'attache biotinylée, positionnant dans son site A le codon pour l'Alanine. Pour localiser notre système biologique à la surface et sonder son activité, un second oligonucléotide ARN⁶, marqué d'un ATTO 647N, est hybridé sur l'ARNm. Celui-ci est localisé 3 codons en aval du site A du ribosome. L'étude de Pestova et al. [151] sur la structure de l'IRES mentionne le fait que la petite sous-unité du ribosome s'étend jusqu'à 15 à 16 nucléotides depuis le premier nucléotide du site P, soit juste devant notre oligonucléotide hybridé sur l'ARNm. Pour vérifier que celui-ci ne gêne pas la complexation du ribosome sur l'IRES, nous avons effectué des tests en solution. Pour cela, différentes concentrations de ribosomes ont été mélangées avec les ARNm hybridés chacun à un oligonucléotide. On a ensuite fait migrer par électrophorèse ces complexes sur gel d'agarose. La migration de l'ARNm complexé avec le ribosome étant plus lente, on voit alors apparaître une seconde bande sur le gel (voir figure 5.16) ce qui confirme le fait que le ribosome se complexe bien sur l'IRES en présence de l'oligonucléotide hybridé sur l'ARNm.

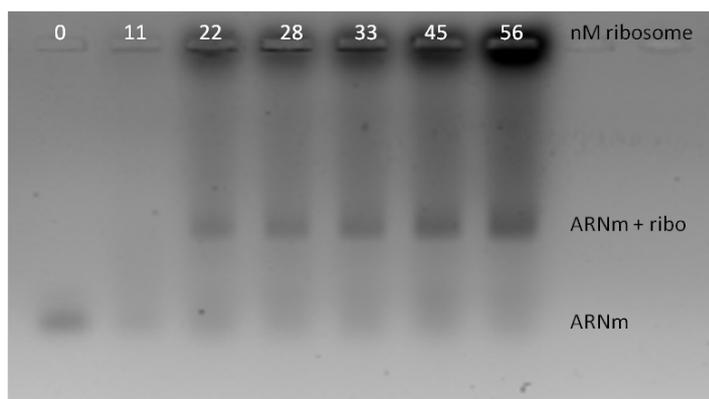


FIGURE 5.16 – Retard sur gel de ribosomes eucaryotes complexés sur la structure IRES CrPV de l'ARNm hybridé à un oligonucléotide 3 codons en aval du site A. La fluorescence de l'ATTO 647N fixé à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide permet de révéler la présence de l'ARNm sur le gel. On voit apparaître en bas une bande correspondant à l'ARNm hybridé à l'oligonucléotide seul et au-dessus une seconde bande correspondant aux complexes formés entre les ribosomes et l'ARNm. Chaque puits correspond à une concentration différente de ribosomes en présence de l'ARNm (de 0 à 56 nM en ribosomes pour 1 nM en ARNm).

D'après l'étude dans [149] sur l'activité hélicase du ribosome procaryote, on peut estimer le nombre de translocations que le ribosome effectuera avant de voir le signal du fluorophore disparaître suite à la dissociation de l'oligonucléotide de l'ARNm. Ces auteurs estiment la distance entre le premier nucléotide de l'ARNm dans le site P et le centre hélicase du ribosome, à 11 nucléotides. En supposant une distance équivalente pour le ribosome eucaryote, celui-ci effectuera une seule translocation avant de rencontrer la première base de l'oligonucléotide

5. Biotines- 3'-GGC UGG CGA GAA UUA UCU AGA C-5'-biotines dont chaque base possède un groupe méthyle en position 2'

6. 3'-AGA UGA CGA CUU GAG CGA-5'-ATTO 647N

5.4 Etude de la cinétique de traduction du ribosome eucaryote

hybridé sur l'ARNm. Les translocations suivantes déstabiliseront alors celui-ci jusqu'à ce qu'il se dissocie complètement. Pour évaluer la stabilité du duplex formé en fonction du nombre de paires de bases appariées restantes, on utilise la formule suivante [149, 152] :

$$e^{-\Delta G/RT} = \frac{\alpha}{([ARNm] - \alpha [Oligo]) (1 - \alpha)} \quad (5.2)$$

où ΔG est l'énergie libre du nombre de paires de bases appariées entre l'oligonucléotide et l'ARNm, R la constante universelle des gaz parfaits, T la température, $[ARNm]$ et $[Oligo]$ les concentrations en ARNm et en oligonucléotides et enfin α le rapport de duplex sur ARNm présents à l'équilibre. On calcule ainsi que 90% des duplex appariés sur 13 bases seront stables, tandis que seulement 5% le seront sur 10 bases. Comme décrit sur la figure 5.17, nous devrions voir une grande partie des fluorophores disparaître de l'onde évanescente entre la quatrième et cinquième translocation du ribosome.

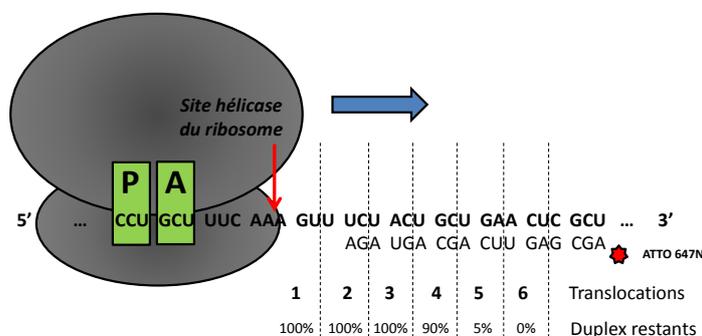


FIGURE 5.17 – *Activité hélicase du ribosome.* Le ribosome est représenté avec le codon correspondant à l'Alanine dans son site A. A partir de la première translocation du ribosome, chaque nouvelle translocation est accompagnée de la déshybridation d'une courte séquence de l'oligonucléotide marqué d'un ATTO 647N de l'ARNm. Le pourcentage de duplex restants est indiqué pour chaque translocation. Entre la quatrième et la cinquième translocation du ribosome, la majeure partie des oligonucléotides marqués se sera dissociée de l'ARNm.

Choix du marqueur fluorescent Le choix du marqueur fluorescent, l'ATTO 647N, s'est fait pour ses excellentes propriétés photophysiques par rapport à des fluorophores plus "classiques" tels que les Cyanines. Celui-ci possède un pic d'absorption à 638 nm et un pic d'émission à 669 nm. Pour optimiser les conditions d'observation et ainsi éviter que le fluorophore ne photoblanchisse avant que la traduction n'ait lieu, nous avons cherché à caractériser sa durée de vie avant photoblanchiment. Les mesures de la figure 5.18 représentent les histogrammes cumulatifs du photoblanchiment des ATTO647N en fonction du temps, prises dans les mêmes conditions que les expériences, à savoir dans un milieu contenant les extraits cellulaires et avec une puissance de la diode laser d'excitation de 15 mW. Dans un cas, la cellule est à température ambiante (24°C) tandis que dans l'autre elle est chauffée à 34°C. Nous avons également représenté la cinétique de photoblanchiment de ce fluorophore dans une solution saline de TRIS. On voit que la présence des extraits cellulaires ainsi que la température plus élevée accélèrent la vitesse de photoblanchiment des ATTO647N. D'une durée caractéristique de 117 secondes dans le TRIS, le photoblanchiment passe à 31 secondes dans le RRL à 24°C et

19 secondes dans le RRL à 34°C (valeurs obtenues par un ajustement exponentiel des données expérimentales).

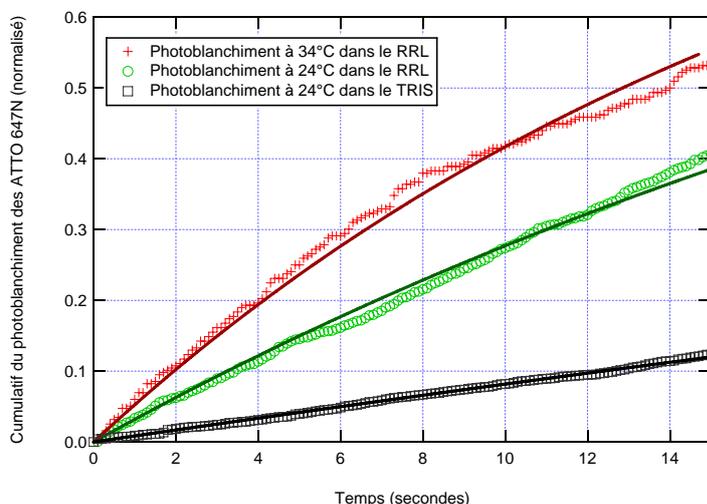


FIGURE 5.18 – Courbes de photoblanchiment de l'ATTO 647N. Les courbes avec des marqueurs ronds, en croix et en carrés ont été réalisées respectivement dans du RRL à 24°C et 34°C et dans du TRIS à 24°C. Les courbes en trait plein représentent l'ajustement monoexponentiel des données expérimentales. On obtient une durée de vie caractéristique avant photoblanchiment de 19 secondes à 34°C, 31 secondes à 24°C dans le RRL et 117 secondes dans le TRIS. La puissance du laser d'excitation est de 15 mW.

Il est assez difficile d'identifier les causes du photoblanchiment prématuré de l'ATTO dans le RRL, qui peuvent être multiples. On peut toutefois remarquer que les extraits cellulaires étant issus de réticulocytes, cellules synthétisant activement l'hémoglobine elle-même responsable du transport de l'oxygène, ils contiennent naturellement des concentrations élevées en oxygène. Or ce dernier est connu pour être un facteur majeur dans le photoblanchiment de nombreux fluorophores.

Pour savoir si ces durées de vie avant photoblanchiment sont compatibles avec nos expériences de traduction, nous pouvons estimer l'intervalle de temps entre le moment où les extraits cellulaires sont injectés et le moment où nous verrons le marqueur fluorescent sortir du champ d'excitation. En supposant une vitesse de traduction de 0.1 à 1 acide aminé par seconde *in vitro* [86] et que cinq translocations du ribosome seront nécessaires pour dissocier l'oligonucléotide marqué de l'ARNm, on obtient un intervalle de temps de 5 à 50 secondes. En prenant des images de durées 100 ms toutes les secondes, on obtiendra une durée totale d'excitation de 5 secondes pour une observation de 50 secondes ce qui reste bien inférieur à la durée d'excitation caractéristique pour le photoblanchiment de 19 secondes.

5.4.2 Expériences de traduction

Cinétiques de disparition des ATTO 647N A la différence des expériences sur le ribosome procaryote, nous déclenchons l'acquisition des images avec un délai par rapport au moment où nous injectons les extraits cellulaires avec le pousse-seringue (vitesse d'injection de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$), ceci afin de limiter le photoblanchiment des fluorophores. Des séries de 200 images sont acquises, chacune d'une durée de 100 ms suivie de 900 ms de temps de pause, puis sont analysées sous

5.4 Etude de la cinétique de traduction du ribosome eucaryote

Igor Pro pour en extraire les cinétiques de disparition des fluorophores. Les courbes de la figure 5.19 représentent trois cinétiques de disparitions des ATTO 647N lors de l'injection du RRL pour une même expérience. Celles-ci ont été acquises dans des conditions différentes : à 24°C, 34°C ou bien à 24°C sans ribosomes initialement complexés à l'IRES (respectivement les courbes verte, rouge et bleue). Pour chacune d'entre elles, une seconde cinétique est représentée sur le même graphique, décrivant le photoblanchiment des fluorophores. Cette dernière est acquise, toujours dans le RRL, mais une dizaine de minutes après l'injection afin de comparer le photoblanchiment seul du photoblanchiment plus la traduction.

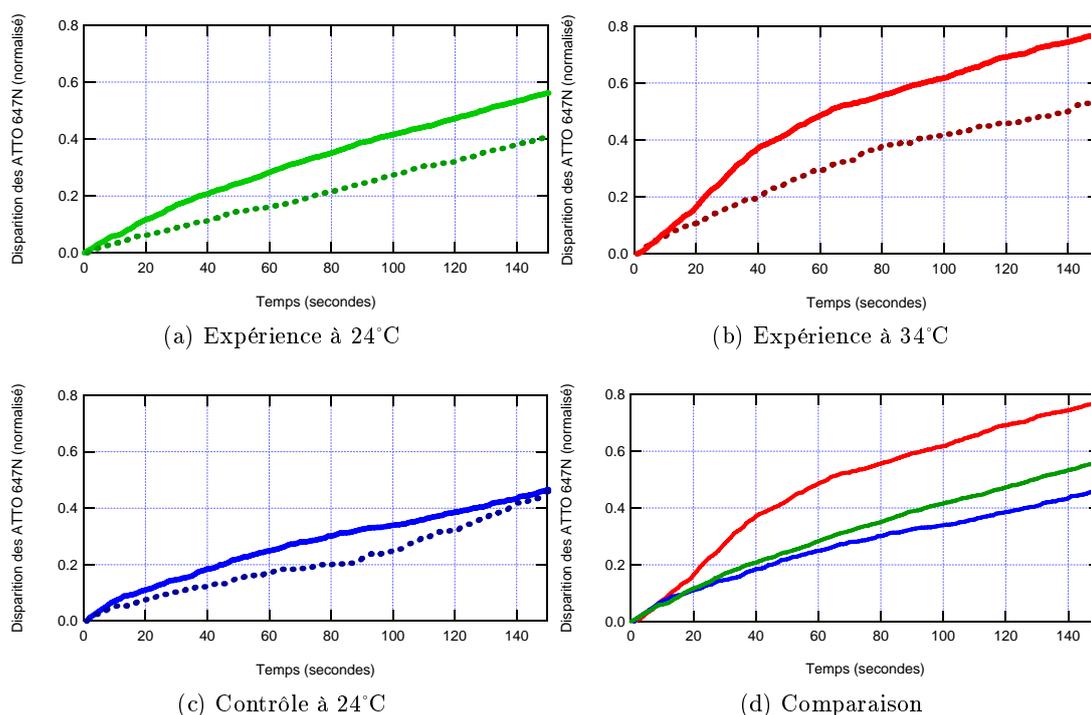


FIGURE 5.19 – Graphique a : cinétique de disparition des ATTO 647N lors de l'injection des extraits cellulaires (RRL) à température ambiante (24°C) et celle de photoblanchiment prise sur la même cellule (trait pointillé), une dizaine de minutes après l'injection. Graphique b : mêmes mesures à 34°C. Graphique c : mêmes mesures à température ambiante sans ribosomes initialement complexés sur l'IRES. Graphique d : superposition des différentes cinétiques durant l'injection du RRL (avec les mêmes codes de couleur). Chaque cinétique représente entre 400 et 2600 fluorophores.

On remarque que pour les deux courbes avec les ribosomes pré-initiés sur l'IRES, il y a un décalage entre la cinétique de disparition des ATTO durant l'injection du RRL par rapport au photoblanchiment seul. Ces résultats laissent donc penser qu'il y a bien une activité biologique durant l'injection du RRL. Dans le troisième cas où les ribosomes n'ont pas été complexés sur l'IRES, on observe toutefois une légère différence de cinétique avec le photoblanchiment. Bien qu'en présence des facteurs eIF1, eIF1A et eIF4 (présents dans le RRL) l'initiation sur l'IRES des sous-unités de ribosomes libres dans le RRL soit inhibée [151], il se peut qu'une certaine fraction parvienne malgré tout à s'initier et donc traduire l'ARNm. Une seconde explication pourrait être que des facteurs présents dans le RRL présentent une activité hélicase permettant

de dégrader l'oligonucléotide de l'ARNm depuis l'extrémité 3' de celui-ci. C'est le cas notamment des facteurs d'initiation 4A et 4F, dont l'activité est bidirectionnelle sur l'ARNm [153].

Un test complémentaire à l'antibiotique a également été réalisé lors d'une autre expérience pour prouver que l'activité biologique en question est bien la traduction. Pour ce faire, un antibiotique, la cycloheximide, est mélangé au RRL à 100 $\mu\text{g/ml}$ avant l'injection dans la cellule. Les résultats sont présentés sur la figure 5.20 pour une puissance d'excitation du laser de 30 mW et à température ambiante (24°C). On y voit que la cinétique de disparition des ATTO est similaire en présence de l'antibiotique ou sans ribosomes, et que dans les deux cas elle est inférieure à celle en présence de ribosomes sur l'IRES. Ce résultat tend donc à prouver que l'on observe bien une traduction. On remarque toutefois que dans les deux contrôles la cinétique est supérieure au photoblanchiment des ATTO seuls, ce qui privilégie une activité hélicase plutôt que l'initiation sur l'IRES de ribosomes libres dans le RRL.

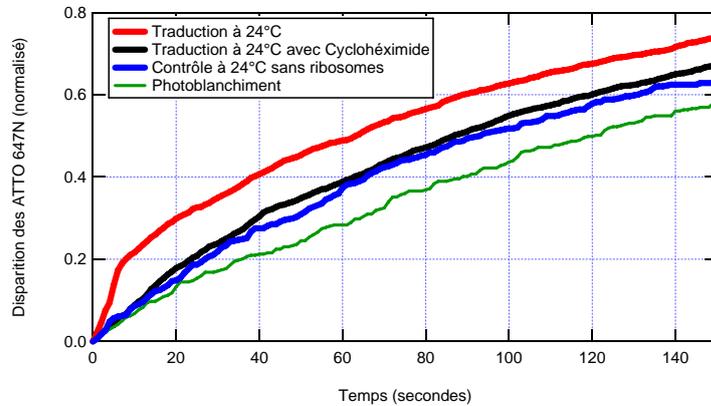


FIGURE 5.20 – Cinétique de disparition des ATTO 647N à 24°C. Les courbes rouge, noire et bleue représentent respectivement les cinétiques en présence de ribosomes, en présence de cycloheximide dans le RRL et sans ribosomes. La courbe verte représente quant à elle la cinétique de photoblanchiment des ATTO dans le RRL. La puissance d'excitation de la diode laser est de 30 mW.

Analyse des données Afin d'extraire des temps caractéristiques des cinétiques mesurées, nous avons cherché une expression mathématique permettant de modéliser à la fois la cinétique de photoblanchiment et celle de l'activité biologique observée. Pour cela on considère que sur le nombre total d'ARNm marqués, N_{tot} , présents initialement dans le champ d'observation de la caméra, un nombre N_a est complexé avec un ribosome actif, tandis qu'un nombre N_i est complexé avec un ribosome inactif (ou bien n'a pas de ribosome). La cinétique de disparition de cette seconde population est identique à celle du photoblanchiment des ATTO (si on néglige une activité hélicase dans le RRL) et peut donc être décrite par une simple exponentielle :

$$N_i(t) = N_{i,0}e^{-k_b t} \quad (5.3)$$

avec $N_i(t)$ le nombre d'ATTO encore présents à l'instant t , $N_{i,0}$ le nombre d'ATTO initialement présents (associés à un ribosome inactif) et k_b le taux de photoblanchiment des ATTO dans le RRL en s^{-1} .

La première population est quant à elle représentée par deux temps caractéristiques. L'un correspond au photoblanchiment des fluorophores et commence au moment où on éclaire

5.4 Etude de la cinétique de traduction du ribosome eucaryote

l'échantillon, tandis que l'autre correspond à l'activité biologique et commence au moment où les extraits cellulaires arrivent au niveau de la zone d'observation (plus un délai pour que le premier ribosome dissocie l'oligonucléotide marqué). L'expression décrivant cette population est alors la suivante :

$$N_a(t) = N_{a,0}e^{-k_b t - k_t(t-t_0)H(t-t_0)} \quad (5.4)$$

avec $N_a(t)$ le nombre d'ATTO encore présents à l'instant t , $N_{a,0}$ le nombre d'ATTO initialement présents (associés à un ribosome actif), k_t le taux de traduction en s^{-1} , t_0 le délai entre la première image du film et le moment où le premier oligonucléotide marqué est dissocié de l'ARNm, et enfin $H(t)$ la fonction de Heaviside.

L'expression finale du nombre de fluorophores disparaissant au cours du temps, normalisé par le nombre de fluorophores initialement présents, est alors donnée par :

$$n_d(t) = 1 - n_{a,p}e^{-k_b t - k_t(t-t_0)H(t-t_0)} - (1 - n_{a,p})e^{-k_b t} \quad (5.5)$$

avec $n_{a,p}$ le pourcentage d'ARNm marqués associés à un ribosome actif.

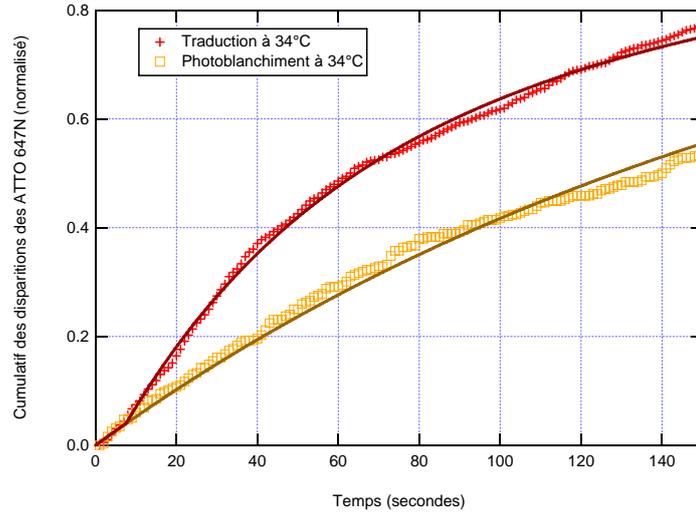


FIGURE 5.21 – Ajustements des cinétiques de la traduction à 34°C de la figure 5.19 et de son photoblanchiment par les équations 5.5 et 5.3, respectivement. En fixant un taux de photoblanchiment de $5.4 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ (obtenu par le second ajustement) dans l'équation 5.5, on obtient une vitesse de traduction de 0.08 acide aminé par seconde ainsi qu'un pourcentage d'ARNm marqués associés à un ribosome actif de 49%.

En utilisant cette expression, nous pouvons ajuster la cinétique mesurée à 34°C de la figure 5.19. Dans cet ajustement, le taux de photoblanchiment k_b est fixé (en utilisant la valeur obtenue à partir de l'ajustement par l'équation 5.3 de la seconde cinétique acquise dans la même cellule, prise quelques minutes après). Avec l'ajustement présenté sur la figure 5.21, on obtient les paramètres suivants :

- $k_b = 5.4 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ (fixé à partir du second ajustement sur la courbe de photoblanchiment seul)
- $n_{a,p} = 0.49 \pm 0.01$
- $k_t = 1.57 \pm 0.07 \cdot 10^{-2} s^{-1}$

$$- t_0 = 7.5 \pm 0.5 \text{ s}$$

soit 49% ($\pm 1\%$) d'oligonucléotides qui sont dissociés par un ribosome, avec une durée de traduction de 63 secondes (± 3). Cette durée doit cependant prendre en compte le délai entre le moment où le RRL arrive au niveau de la zone d'observation et le moment où le premier oligonucléotide est dissocié par un ribosome, soit ici 3 secondes. Cette dernière valeur est donnée par la différence entre t_0 , obtenu par l'ajustement, et le moment où le RRL arrive au niveau de la zone d'observation (apparition du fond de fluorescence du RRL sur la série d'images). On obtient finalement un temps caractéristique de 66 secondes pour les cinq translocations du ribosome, soit une vitesse de 0.08 acide aminé par seconde. Cette vitesse est cohérente avec celle citée dans [86] (0.1 à 1 acide aminé par seconde) compte tenu du fait que le ribosome doit ici dissocier l'oligonucléotide pour avancer sur l'ARNm.

5.4.3 Amélioration des propriétés photophysiques des ATTO647N dans le RRL

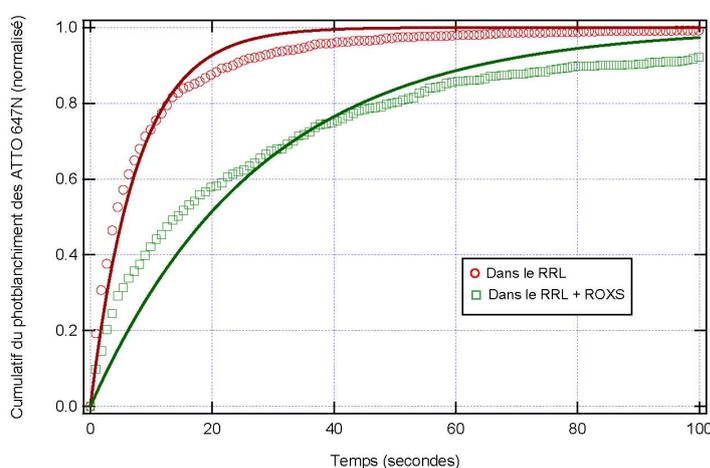


FIGURE 5.22 – Ajustements des cinétiques de photoblanchiment des ATTO 647N dans le RRL et dans le RRL en présence du ROXS (marqueurs ronds et carrés respectivement). Les ajustements exponentiels (représentés en traits pleins) donnent un temps caractéristique de 7.6 secondes dans le RRL et 27.6 secondes dans le RRL plus le ROXS.

Le photoblanchiment des ATTO 647N reste cependant problématique pour l'analyse des données sur ces expériences, du fait que sa cinétique est non négligeable comparée à celle de la traduction. Une étude en cours consiste à utiliser le système ROXS, décrit dans le chapitre précédent, sur l'ATTO 647N et ainsi rallonger sa durée de vie avant photoblanchiment. Les calculs du chapitre précédent permettent de prédire l'efficacité du ROXS (constitué de l'acide protocatéchuïque, du protocatechuate dioxygénase et du méthylviologène) pour inhiber l'état triplet de l'ATTO 647N tout en déplaçant l'oxygène du milieu. Les mesures de la figure 5.22 représentent les cinétiques de photoblanchiment de l'ATTO 647N dans du RRL et dans du RRL avec ajout du ROXS (pour une puissance laser de 50 mW). Un ajustement par une exponentielle donne une durée de vie caractéristique de 7.6 secondes dans le RRL et 27.6 secondes dans le RRL plus le ROXS, soit un gain de 3.6 seulement (contre un facteur 20 dans le cas du Bodipy-F1). On remarquera que la qualité de l'ajustement peut être grandement améliorée en utilisant une biexponentielle, toutefois, n'ayant pas d'explication justifiant un comportement biexponentiel de la cinétique de photoblanchiment nous avons ici gardé les temps caractéristiques donnés par

5.4 Etude de la cinétique de traduction du ribosome eucaryote

le premier ajustement.

Des études complémentaires permettront d'optimiser le gain sur le temps de photoblanchiment des ATTO en utilisant le ROXS. Nous avons déjà pu observer que dans du tampon TRIS celui-ci est très efficace mais que son rendement chute dans du tampon HEPES (utilisé pour la préparation des extraits cellulaires).

5.4.4 Conclusions et perspectives

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons exposé nos premiers résultats sur l'étude de la cinétique de traduction du ribosome eucaryote en molécule unique. La présence de la structure IRES CrPV de l'ARNm utilisé permet la complexation du ribosome sans l'intervention des différents facteurs d'initiation, ni la présence d'un ARN de transfert dans son site P pour rentrer dans la phase d'élongation. Ces complexes fixés à la surface de lamelles de microscope sont identifiés par la fluorescence de l'ATTO 647N fixé à un court oligonucléotide hybridé en aval de l'IRES de l'ARNm. En injectant les extraits cellulaires, issus de lysats de réticulocytes de lapin, nous pouvons suivre la cinétique de disparition des fluorophores provoquée par l'activité hélicase du ribosome lors de la traduction et la comparer à celle du photoblanchiment des ATTO 647N.

Nous avons ainsi montré que cette cinétique est accentuée en présence de ribosomes préalablement complexés à l'IRES par rapport au photoblanchiment seul, et peut être accélérée en élevant la température de la cellule microfluidique. Un contrôle à l'antibiotique, la cycloheximide, bloquant la traduction, montre également que cette cinétique est freinée et est alors comparable à celle obtenue en l'absence de ribosomes sur l'IRES. Ces résultats portent à croire que nous observons bien la traduction de ribosomes individuels (la moitié des fluorophores disparaissant étant due au photoblanchiment). Une analyse de ces données expérimentales permet de donner une vitesse de 0.08 acide aminé par seconde en chauffant la cellule à 34°C. Cette valeur est cohérente avec celle citée dans [86] (0.1 à 1 acide aminé par seconde) compte tenu du fait que le ribosome est probablement ralenti par l'ouverture de l'oligonucléotide hybridé à l'ARNm ainsi que par la présence de la surface.

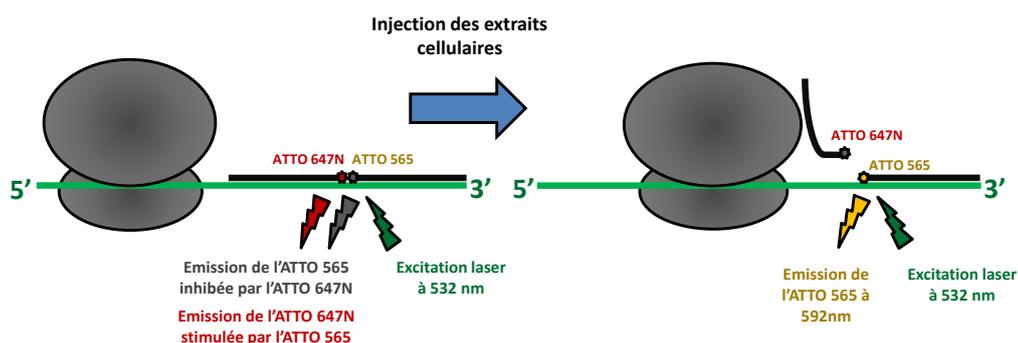


FIGURE 5.23 – Principe des expériences de FRET. Deux oligonucléotides, chacun étant marqué d'un fluorophore ATTO 647N ou 565, sont hybridés à l'ARNm. La proximité des fluorophores permet le transfert d'énergie de l'ATTO 565 vers l'ATTO 647N sous excitation laser à 532 nm. La fluorescence de l'ATTO 565 est alors inhibée par la présence de l'ATTO 647N. En injectant les extraits cellulaires, le ribosome commence la traduction de l'ARNm et dissocie le premier oligonucléotide portant l'ATTO 647N. La fluorescence de l'ATTO 565 n'est alors plus inhibée et peut être observée.

Les études en cours permettront très prochainement de combiner le système ROXS, décrit dans le chapitre précédent, à ces expériences, afin de réduire la vitesse de photoblanchiment des ATTO 647N dans le RRL. Les premiers résultats montrent qu'il est possible de diminuer cette vitesse d'un facteur 3.6. Une nouvelle stratégie est également prévue pour étudier l'activité des ribosomes en molécule unique. En hybridant à l'ARNm deux oligonucléotides marqués respectivement d'un ATTO 647N et d'un ATTO 565, suffisamment proches pour induire du FRET, nous pourrions sonder l'activité des ribosomes en observant des signaux apparaître plutôt que de disparaître. En effet, la présence de l'ATTO 647N inhibant la fluorescence de l'ATTO 565, nous verrons le signal de fluorescence de ce second fluorophore apparaître lorsque le ribosome dissociera le premier oligonucléotide portant l'ATTO 647N (voir figure 5.23).

Conclusion générale et perspectives

Ce manuscrit retrace les résultats obtenus durant mes trois années de thèse sur l'étude de la synthèse des protéines à l'échelle de la molécule unique. Deux approches ont été abordées : l'une par pince optique pour étudier les structures de l'ARNm impliquées dans des cas de lectures alternatives du code génétique, l'autre par microscopie de fluorescence pour étudier la dynamique du ribosome.

L'objectif de la pince optique est de caractériser les propriétés de structures de l'ARNm impliquées dans la traduction, à savoir les forces nécessaires pour leur ouverture mais aussi leur cinétique de repliement ainsi que les interactions avec d'éventuels partenaires protéiques. Nous nous intéressons en particulier aux structures de type pseudo-nœuds ou tige-boucle impliquées dans le décalage de la phase de lecture du ribosome, ainsi que de type tige-boucle telles que SECIS impliquée dans l'incorporation de l'acide aminé rare sélénocystéine dans certaines protéines. L'ouverture de telles structures impliquant une résolution de l'ordre du nanomètre, un dispositif de manipulation et de caractérisation des oligonucléotides d'une grande sensibilité est nécessaire. Nous avons pour cela développé un piège optique installé sur une table sur coussin d'air et protégée des perturbations extérieures par une enceinte réalisée en contreplaqué du côté extérieur et en isolant phonique côté intérieur. Afin de mesurer les déplacements ainsi que les forces exercées par le système biologique sur la bille piégée, une calibration de la pince optique doit être effectuée. Celle-ci consiste généralement à analyser le mouvement brownien de la bille piégée pour connaître la raideur du piège, puis à coller cette même bille sur la surface de l'échantillon pour mesurer les déviations du faisceau de pince pour un déplacement connu de la bille. L'utilisation de deux billes différentes pour la calibration et pour l'étude du système biologique est alors inévitable, introduisant des erreurs potentielles. En collaboration avec Koen Visscher, professeur à l'Université d'Arizona, durant son séjour de 5 mois dans notre laboratoire, nous avons développé une méthode de calibration originale de la pince optique qui a été publiée dans *Optics Express* [1]. En utilisant un déflecteur acousto-optique pour déplacer le piège optique ainsi qu'une photodiode à quatre quadrants pour analyser l'influence du déplacement du piège sur la bille, nous mesurons simultanément les deux paramètres de calibration, tout en permettant de réutiliser cette même bille pour l'étude de l'échantillon biologique.

Cette méthode de calibration est actuellement utilisée pour mesurer les propriétés mécaniques d'un brin d'ADN attaché entre la bille piégée et la surface. La cohérence de nos mesures avec la littérature nous permettra de poursuivre notre étude sur la mesure des forces nécessaires pour ouvrir des structures de l'ARNm. La longueur des ARN étudiés étant plus courte que l'ADN utilisé, on ne pourra plus négliger la composante longitudinale de la force appliquée lorsque l'on tire l'oligonucléotide entre la bille et la surface, et il conviendra d'adopter une configuration où l'on tire uniquement dans un plan horizontal (où la raideur du piège est connue). Pour cela nous avons commencé à fonctionnaliser un deuxième type de bille pour maintenir l'ARN entre deux points fixes contenus dans un plan parallèle à la surface. Cette seconde bille pourra être soit fixée à la surface, soit maintenue dans un deuxième piège plus raide.

La deuxième approche de la synthèse des protéines abordée pendant ma thèse utilise la microscopie de fluorescence en onde évanescente (TIRF) pour suivre individuellement la synthèse des protéines par les ribosomes. Durant ma première année commune avec la dernière année de thèse de David Dulin, nous avons observé la cinétique de traduction de ribosomes procaryotes. Pour cette étude en collaboration avec l'équipe de Dominique Fourmy et Satoko Yoshizawa, nous avons utilisé des ribosomes mutés sur la grande sous-unité afin de les marquer spécifiquement avec un nanocrystal semi-conducteur (QD) unique. A la différence de nombreuses études sur le ribosome procaryote effectuées dans des conditions où les facteurs de la traduction sont en quantité limitée, nous utilisons des extraits cellulaires pour étudier la cinétique de la traduction dans des conditions physiologiques. Le marquage nous permettant de connaître la présence du ribosome sur l'ARNm sans être gêné par le photoblanchiment du marqueur, nous détectons la fin de la traduction lorsque le ribosome atteint le codon stop et quitte le champ d'excitation du laser. Nous avons ainsi mesuré une vitesse de traduction de 5 à 6 acides aminés par seconde tandis que l'ajout d'un antibiotique dans les extraits cellulaires ralentit la cinétique de la traduction et diminue le nombre de ribosomes atteignant le codon stop.

Pour donner une preuve formelle de l'activité de ces ribosomes, nous avons cherché à visualiser la protéine de deux manières différentes. Une première méthode consiste à utiliser des acides aminés, incorporés dans la protéine traduite, marqués du fluorophore Bodipy-F1, ceci afin de co-localiser leur signal avec celui du QD fixé au ribosome. Prouver l'activité de nos ribosomes avec un tel marqueur n'est cependant pas évident dû aux propriétés photophysiques modestes du Bodipy-F1 émettant dans les mêmes longueurs d'onde que l'autofluorescence de l'aminosilane, mais aussi au fait que les ARNt portant l'acide aminé marqué se collent non spécifiquement à la surface. Nous avons opté pour une alternative où la protéine traduite est naturellement fluorescente. Pour ce faire, l'ARNm utilisé code pour une protéine GFP à maturation rapide, l'emGFP, tandis qu'une séquence de l'ARNm permet de stabiliser le ribosome sur l'ARNm, l'empêchant de se dissocier une fois la traduction terminée. Ces expériences n'ont toutefois pas encore été concluantes. Elles sont en effet plus délicates à réaliser du fait que l'efficacité de la séquence d'arrêt n'est pas de 100% et dépend de la température et des concentrations des extraits cellulaires. Une difficulté supplémentaire vient, de la même façon qu'avec les expériences impliquant l'utilisation des acides aminés marqués du Bodipy-F1, du fond d'autofluorescence de l'aminosilane utilisé pour fonctionnaliser les surfaces avec du PEG. Ce fond émet aux mêmes longueurs d'onde que la fluorescence de l'emGFP et rend donc l'identification d'une protéine unique difficile. Ces difficultés nous ont amenés à optimiser les protocoles de silanisation qui devraient améliorer la détectivité de la protéine fluorescente pour les prochaines expériences. Nous avons également prévu de remplacer l'ARNm par un autre, codant pour une protéine fluorescente YFP (Vénus), dont la séquence d'arrêt est plus efficace et le spectre d'émission est décalé dans le jaune, ce qui devrait faciliter son observation.

Ces ribosomes mutés auront un grand intérêt pour l'étude de la traduction à l'échelle de la molécule unique. En effet, grâce au marquage du ribosome avec un QD, on peut observer le système biologique sur de longues échelles de temps et ainsi étudier la traduction complète d'un ARNm. On pourra ainsi s'intéresser à l'étape de la terminaison de la traduction ou bien aux mécanismes faisant intervenir les protéines chaperonnes assistant la maturation de la protéine synthétisée par le ribosome. En étudiant la cinétique de traduction de tels ribosomes il sera possible également d'entamer des études sur des ARN comprenant une structure secondaire. On pourra par exemple observer différentes populations, selon que le ribosome ouvre la structure ou décale sa phase de lecture (la position du codon STOP n'étant alors plus la même). L'approche

Conclusion générale et perspectives

à l'échelle de la molécule unique nous donnant accès aux distributions de ces populations, on pourra voir comment celles-ci évoluent avec la stabilité de la structure de l'ARNm ou de la séquence de glissement (durée des pauses, déséquilibre des populations, efficacité de décalage de la phase de lecture etc...). Les améliorations en cours de notre montage de fluorescence nous permettant d'observer jusqu'à trois fluorophores émettant dans des gammes spectrales distinctes, on pourrait par exemple observer la traduction en parallèle de deux ARNm différents, sur lesquels seront hybridés des oligonucléotides marqués d'un fluorophore distinct pour les différencier (voir figure 6.1). Cette configuration permettrait d'étudier l'influence de la séquence de glissement sur la cinétique, donnée par le temps de disparition du QD, mais aussi sur l'efficacité du décalage de la phase de lecture, donnée par la présence ou non du signal de l'ATTO à l'issue de la traduction (le ribosome ayant changé de cadre de lecture ne voit donc plus le codon stop et continue la traduction jusqu'à dissocier l'oligonucléotide portant le fluorophore).

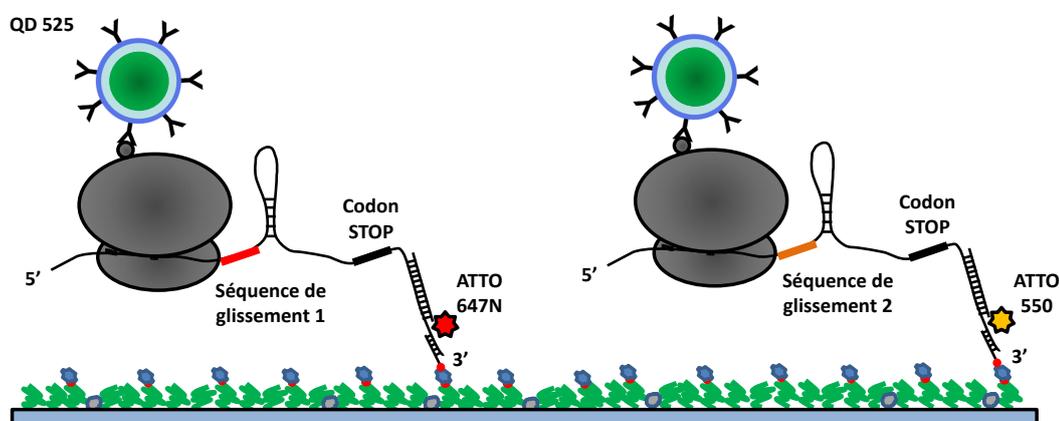


FIGURE 6.1 – Traduction de deux ARNm en parallèle comprenant une structure secondaire et une séquence de glissement différente. Les ARNm comprenant l'une ou l'autre des séquences de glissement sont différenciés par la fluorescence de l'ATTO550 ou de l'ATTO647N. La disparition du signal du QD à 525 nm renseigne sur la cinétique de la traduction de chacun de ces ARNm tandis que la présence du signal de l'ATTO à l'issue de la traduction renseigne sur le fait que le ribosome a décalé sa phase de lecture ou non lors de l'ouverture de la structure secondaire.

En collaboration avec l'équipe d'Olivier Namy de l'Institut de Génétique et Microbiologie, nous avons également initié des expériences sur la synthèse des protéines par des ribosomes eucaryotes. Aucune expérience d'étude en molécule unique de ces ribosomes n'a été publiée à ce jour. Ces expériences sont d'autant plus compliquées que la structure complète du ribosome eucaryote n'a été révélée que récemment, d'où la difficulté d'effectuer un marquage spécifique sur ce type de ribosome. L'étape de l'initiation de ce ribosome sur l'ARNm faisant intervenir un grand nombre de facteurs dont les rôles, à ce jour, ne sont pas encore totalement caractérisés, nous utilisons ici une alternative en complexant le ribosome sur une structure particulière de l'ARNm, l'IRES CrPV. Celle-ci permet le recrutement du ribosome sans reconnaissance de la coiffe de l'ARNm ni l'intervention des différents facteurs d'initiation. Pour localiser le système biologique sur la surface, on hybride un oligonucléotide marqué d'un ATTO 647N sur l'ARNm. Lors de la traduction, l'activité hélicase du ribosome dissocie cet oligonucléotide nous permettant de sonder son activité. En prenant en compte le photoblanchiment du fluorophore

dans nos analyses, nous avons mesuré une vitesse de traduction de 0.08 acide aminé par seconde. L'ajout d'un antibiotique dans les extraits cellulaires pour bloquer la traduction ralentit cette cinétique, qui devient comparable à celle mesurée en l'absence de ribosomes sur l'ARNm, ce qui tend à prouver que nous observons bien la traduction. Si tel est bien le cas, alors ces résultats seraient les premiers sur l'observation de la traduction par des ribosomes eucaryotes à l'échelle de la molécule unique.

Les prochaines expériences sur ce système se concentreront sur l'obtention d'une preuve formelle de l'activité de ces ribosomes. Pour cela, nous hybriderons deux oligonucléotides marqués sur l'ARNm. Le choix des deux marqueurs et leur position sur ces deux oligonucléotides nous permettra d'observer un signal de FRET, de sorte que lorsque le ribosome avancera sur l'ARNm et dissociera le premier oligonucléotide, nous verrons le signal de fluorescence du second fluorophore augmenter. Une seconde stratégie pour prouver l'activité de ces ribosomes repose sur l'incorporation d'acides aminés marqués dans la chaîne polypeptidique en croissance. Cette configuration est similaire à celle déjà testée sur le ribosome procaryote et permet d'utiliser les mêmes ARN de transfert portant la lysine marquée du Bodipy-Fl.

Enfin, nous avons présenté dans ce manuscrit une étude d'un tampon optimisé pour améliorer les propriétés photophysiques de fluorophores organiques. Pour cela, nous nous sommes inspirés des travaux de Tinnefeld et al [121] où les auteurs ajoutent un oxydant et un réducteur à une solution déplétée en oxygène afin d'inhiber l'état triplet des fluorophores, responsable de leur clignotement. Toutefois ces auteurs ne montrent pas l'applicabilité de leur système sur des fluorophores émettant dans le vert du fait de l'énergie plus élevée des photons d'excitation mis en jeu. De plus, la solution enzymatique qu'ils utilisent pour extraire l'oxygène du milieu n'est pas compatible avec les extraits cellulaires et rajoute du fond de fluorescence dans les basses longueurs d'ondes (inférieures à 600 nm). Nous avons donc adapté leurs travaux en remplaçant leur système enzymatique, le "GODCAT" basé sur la glucose oxydase et la catalase, par un autre à base d'acide protocatéchuique (PCA) et de protocatéchuate 3,4 - dioxygénase (PCD). Celui-ci permet non seulement de dépletter plus efficacement l'oxygène du milieu mais ne présente pas de fluorescence parasite dans le vert, ni d'incompatibilité avec l'utilisation d'extraits cellulaires. Nous avons également montré que dans ce système le PCA jouait déjà le rôle du réducteur pour certains fluorophores et que seul l'ajout d'un oxydant tel que le méthylviologène était nécessaire. Cette solution a été testée sur le Bodipy-Fl pour confirmer nos prédictions théoriques, et nous avons montré que l'on peut gagner un facteur 20 sur la durée de vie ainsi que le nombre de photons émis par ce fluorophore. Ces résultats, publiés dans ChemPhysChem [2], seront d'une grande utilité pour les études du ribosome par microscopie de fluorescence.

Cellules microfluidiques et chimie de surface

Cette annexe décrit la conception des cellules microfluidiques que nous utilisons pour les expériences sur la traduction en molécule unique, ainsi que le protocole utilisé pour fonctionnaliser les surfaces des lamelles de microscope avec du polyéthylène glycol (PEG).

A.1 Conceptions des cellules microfluidiques.

Travailler avec des cellules microfluidiques permet de faire des économies considérables en produits à injecter. Ce protocole décrit la conception des cellules dont le principe est d'injecter les produits dans un réservoir et de les aspirer (en appliquant une pression négative dans la cellule) par la sortie. Les cellules sont constituées d'une lame en verre d'épaisseur 3 mm, percée de deux trous de diamètre \varnothing 0.8 mm espacés de 33 mm. Le trou d'entrée de la cellule est connecté à un réservoir en PDMS (PolyDiMéthylSiloxane) tandis que la sortie est connectée à un plot, également en PDMS, dans lequel un tuyau permet d'évacuer les produits (voir figure A.1).

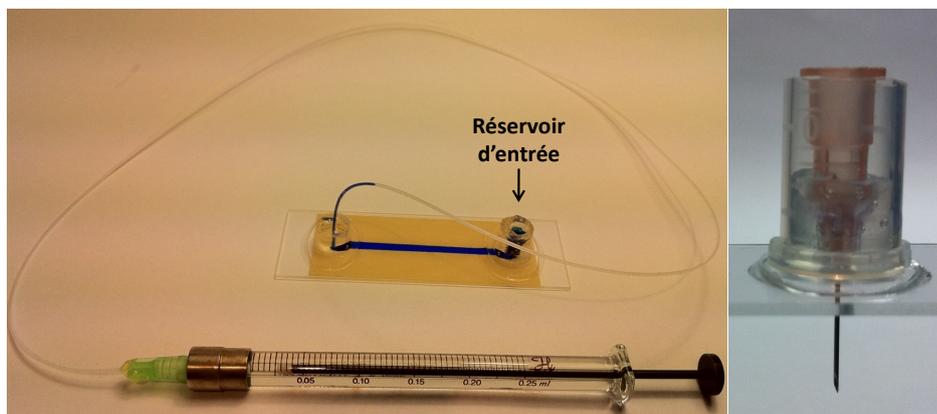


FIGURE A.1 – A gauche : photo d'une cellule microfluidique. A droite : photo de la conception du réservoir d'entrée de la cellule.

Le réservoir et le plot de sortie sont réalisés de la façon suivante :
On utilise deux microtubes coupés en deux que l'on fixe (en utilisant des pinces) sur la lame percée. On obtient ainsi deux puits dans lesquels on coulera le PDMS. Pour donner la forme interne du réservoir, on place une aiguille à travers le trou, la partie plastifiée de l'aiguille restant dans le puits, tandis que dans le second puits qui formera la sortie, on insère un tuyau

traversant le trou qui sera solidarisé à la cellule par le PDMS.

Le PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) est préparé en mélangeant le polymère et le durcisseur dans un rapport 5 :1, que l'on centrifuge pendant 2 minutes pour retirer les bulles formées pendant le mélange. Une fois le PDMS coulé dans les puits, on chauffe l'ensemble dans une étuve à 120°C pendant 1 heure. Une fois cuit, il ne reste qu'à retirer les moitiés de tubes ainsi que l'aiguille. Si le PDMS n'adhère pas à la lame de verre, on pourra recommencer en nettoyant celle-ci à l'acétone puis au plasma cleaner. Pour faire la connexion entre le tuyau de sortie et la seringue servant à faire circuler les produits dans la cellule, on utilise la partie plastifiée de l'aiguille (mais sans l'aiguille) que l'on colle sur le tuyau.

Pour chaque expérience, on fixe la cellule à une lamelle de microscope (préalablement nettoyée ou silanisée) avec du scotch double-face d'épaisseur 200 μm . Celui-ci est d'abord déposé sur la lame et un canal de largeur 3 mm et de longueur 35 mm est découpé avec une lame de rasoir (et en utilisant un patron pour reproduire les canaux à l'identique). La lamelle est ensuite déposée sur le scotch et est ainsi solidement attachée à la lame.

A.2 Protocole de fonctionnalisation de la surface.

Nettoyage des lamelles : Avant de fonctionnaliser la surface des lamelles de microscope, il convient de nettoyer celles-ci afin de retirer toutes les impuretés causant potentiellement du fond de fluorescence gênant pour les expériences. On dispose pour cela une trentaine de lamelles de format 24 \times 65 mm (Deckgläser, Menzel-Gläser) dans un rack en verre. Ce rack est ensuite immergé dans de l'acétone puis l'ensemble est placé dans un bain à ultrason pendant 30 minutes. Cette étape est répétée deux fois en remplaçant l'acétone par de l'eau ultra-pure. Pour sécher les traces d'eau, les lamelles sont ensuite stockées sous une hotte à flux laminaire durant une nuit. Une fois sèches, elles sont placées dans la chambre d'un nettoyeur plasma (Femto, cuve en borosilicate, Dieter) où elles subissent un plasma d'oxygène ($P_{O_2} = 0,4$ millibar) pendant cinq minutes.

Silanisation : Lorsque la charge électrique du système biologique n'est pas connue ou n'est pas homogène, le meilleur moyen d'éviter les interactions avec la surface est de fonctionnaliser celle-ci avec une molécule neutre électrostatiquement. C'est le cas du polyéthylène glycol (PEG).

Ce polymère ne se fixant pas naturellement à la surface, il est nécessaire de lui créer un site d'accroche. Le PEG utilisé ici comporte une terminaison NHS réagissant avec une fonction amine. Une étape intermédiaire consistera donc à fixer une amine à la surface. Le protocole utilisé consiste à activer la surface des lamelles lavées pour y fixer un amino-silane (silanisation), le 3-(aminopropyl) triéthoxysilane (APTES, Sigma), puis le PEG. Le protocole de silanisation est le suivant :

- 8 lamelles disposées dans un rack en teflon subissent à nouveau un plasma d'oxygène ($P_{O_2} = 0,4$ millibar) pendant cinq minutes afin d'activer leurs surfaces (cette étape doit être effectuée immédiatement avant le mélange avec l'APTES). L'activation peut également être effectuée par un bain d'acide chlorhydrique à 6M pendant une heure. Dans ce cas les lamelles doivent ensuite être rincées abondamment à l'eau ultra-pure puis à l'acétone.
- Le rack contenant les lamelles est ensuite immergé dans une solution contenant 4 ml d'APTES diluée dans 196 ml d'acétone (2% en rapport des volumes) pendant 15 minutes. Elles sont ensuite rincées abondamment à l'eau ultra-pure puis séchées sous la hotte à

flux laminaire pendant une nuit.

Une fois silanisées, les lamelles peuvent être conservées plusieurs jours. On évitera toutefois d'utiliser des lamelles conservées depuis plus d'une semaine en raison d'une augmentation de l'auto fluorescence de l'aminosilane avec le temps.

Fixation du PEG : On utilise deux types de PEG mélangés (aliquotés sous azote et conservés à -80°C) : du PEG "simple" (methyl-PEG-succinimidyl Glutarate, MW 5000 Daltons, Laysan Bio) et du PEG-biotine (Biotin-PEG-succinimidyl Carbonate, MW 5000 Daltons, Laysan Bio), ces deux types ayant une fonction N-hydroxysuccinimide (NHS) à une extrémité pour les fixer à la surface terminée amine. Ces deux PEG sont dissouts dans un rapport 1.25%/12.5% (masse/volume¹) dans du tampon borate de pH 8.8. La fonction NHS du PEG étant extrêmement instable en solution aqueuse (temps de demi-vie de 17 minutes à pH 8), les solutions de PEG doivent être immédiatement déposées sur les lamelles et incubées pendant 1 heure avant d'être rincées.

La fonction du PEG s'hydrolysant rapidement, on accordera une attention particulière lors de l'aliquotage du PEG (sous gaz neutre et pour une utilisation unique des aliquots) ainsi qu'au pH du tampon borate servant pour sa dissolution. En effet, un pH acide implique une durée de vie du PEG plus courte tandis qu'un pH plus basique diminue la qualité de la passivation.

1. La concentration en pourcentage massique est le rapport de la masse du soluté (en grammes) sur le volume de la solution (en millilitres) multiplié par 100.

Tampons ROXS

Nous donnons dans cette annexe la composition des tampons optimisés pour améliorer les propriétés photophysiques de nombreux fluorophores. L'oxygène jouant un rôle important dans le photoblanchiment des fluorophores, une solution naturelle revient donc à retirer l'oxygène du milieu. Nous proposons deux systèmes enzymatiques pour dépler le milieu en oxygène. A ces deux systèmes on rajoute un oxydant et un réducteur afin d'inhiber l'état triplet des fluorophores, responsable de leur clignotement.

GODCAT Le premier système est à base de glucose, d'une catalase et d'une glucose oxydase. Pour un volume final de 100 μl on utilise les volumes suivants :

- 10 μl de Glucose à 20 % (m/V, 3 %);
- 10 μl de Catalase à 1 g/L (0.1 g/L);
- 2 μl de Glucose oxydase à 5 g/L (0.1 g/L);
- 1 μl de Méthylviologène¹ à 50 mM (0.5 mM);
- 1 μl de Acide Ascorbique² à 50 mM (0.5 mM);
- 76 μl de tampon TRIS.

Chaque solution est préparée dans du tampon TRIS à pH 8. L'oxydant et le réducteur peuvent être remplacés par une solution de TROLOX³ à 2 mM. Ce dernier produit, en vieillissant ou sous illumination aux UV, une TROLOX quinone jouant le rôle d'oxydant en complément du rôle de réducteur du TROLOX.

- On prêtera attention au fait que cette solution enzymatique présente des effets indésirables :
- Apparition progressive d'un fond de fluorescence pour des longueurs d'onde inférieures à 600 nm;
 - Formation temporaire de peroxyde d'hydrogène (très réactif);
 - Non compatible avec certains extraits cellulaires utilisés pour des expériences nécessitant de l'ATP. En effet les extraits cellulaires peuvent contenir des glucose kinases réagissant avec le glucose et dépletant l'ATP du milieu.

Ces effets peuvent toutefois être évités en substituant le glucose et le glucose oxydase par du galactose et du galactose oxydase [124].

PCA/PCD Le second système est à base d'acide protocatéchuique (PCA, Sigma) et de protocatéchuate-3,4,dioxygénase (PCD, Sigma). Pour un volume de 100 μl on utilise les volumes suivants :

-
1. 1,1-diméthyl-4,4-bipyridinium dichloride hydrate (Sigma)
 2. Acide ascorbique (Sigma)
 3. Acide 6-Hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique (Sigma)

- 10 μl de PCA à 100 mM (10 mM) ;
- 88 μl de PCD à 0.73 g/L (0.64 g/L) ;
- 1 μl de Méthylviologène⁴ à 50 mM (0.5 mM) ;
- 1 μl de Acide Ascorbique⁵ à 50 mM (0.5 mM) ;

Ici aussi les solutions sont préparées dans du tampon TRIS à pH 8, tandis que le système Méthylviologène/Acide Ascorbique peut être remplacé par du TROLOX. On notera également que pour un grand nombre de fluorophores, le PCA joue également le rôle de réducteur et donc la présence de l'acide ascorbique n'est pas requise. On pourra se référer au chapitre 4 pour une liste non exhaustive de ces fluorophores.

4. 1,1-diméthyl-4,4-bipyridinium dichloride hydrate (MV, Sigma)

5. Acide ascorbique (AA, Sigma)

Optique

C.1 Mesure du waist d'un faisceau laser

Nous donnons ici deux méthodes pour mesurer le diamètre du waist (à $1/e^2$ en intensité) d'un faisceau laser (illustrées sur la figure C.1) avec du matériel que l'on peut trouver dans n'importe quel laboratoire. Pour illustrer ces méthodes nous mesurerons le diamètre de notre faisceau laser de pince optique en sortie du collimateur (le diamètre donné par le constructeur est de 3 mm).

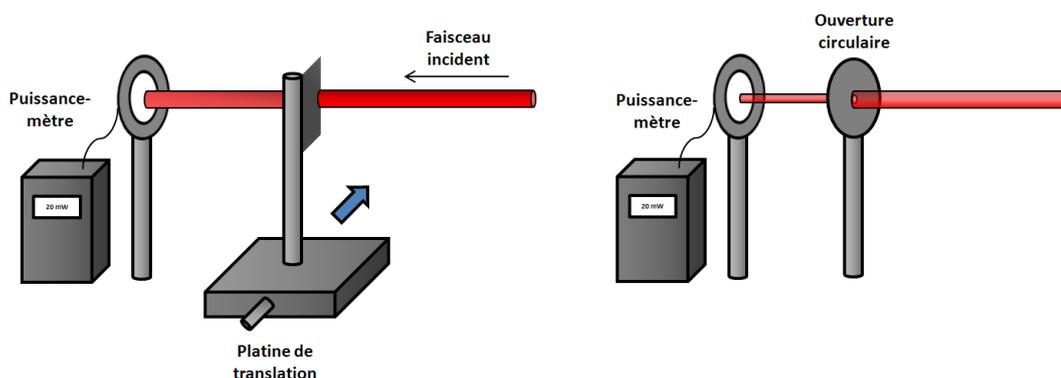


FIGURE C.1 – A gauche : On balaie la largeur du faisceau avec un cache pour mesurer la puissance transmise. A droite : on utilise une ouverture circulaire de dimension connue et on mesure sa transmission.

Platine de translation :

La première façon de faire nécessite un puissance mètre, une platine de translation et un cache (par exemple une lame de rasoir) monté sur une tige. La méthode consiste à balayer la largeur du faisceau laser avec le cache en utilisant la platine, tout en mesurant la puissance transmise pour ces différentes positions du cache (voir figure C.1). Cette mesure revient alors à intégrer la puissance du faisceau sur sa largeur. La dérivée de cette mesure donne donc une gaussienne que l'on peut ajuster pour en extraire la taille du waist (voir figure C.2).

L'équation de l'ajustement sous IGOR Pro de la figure C.2 est la suivante :

$$f(x) = y_0 + Ae^{-\left(\frac{x-x_0}{width}\right)^2} \quad (C.1)$$

avec y_0 l'offset en amplitude, A l'amplitude de la gaussienne, x_0 son centre et $width$ sa largeur. Le diamètre du waist à $1/e^2$ du faisceau est alors donné par $d=2\sqrt{2}width$.

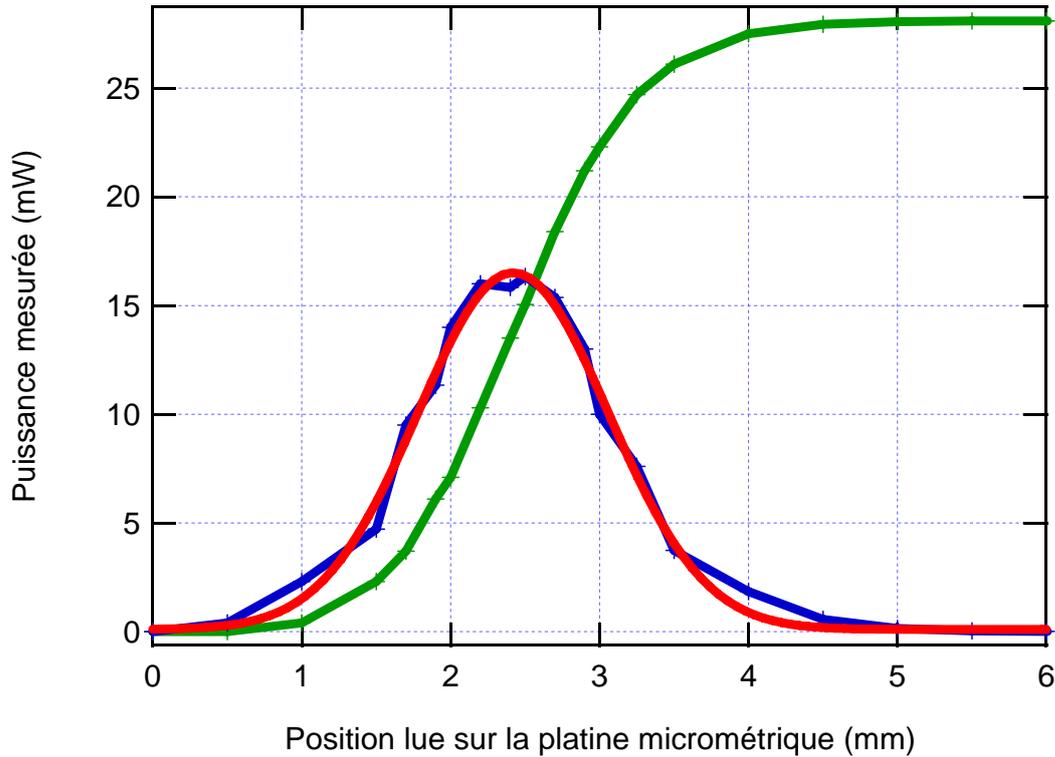


FIGURE C.2 – Mesures expérimentales du diamètre du faisceau de pince optique en sortie du collimateur (en vert). La dérivée (en bleu) de ces mesures est ensuite ajustée par une fonction gaussienne (en rouge). Le diamètre du waist obtenu est de 2.56 mm.

Ouverture circulaire :

La puissance P' d'un faisceau gaussien transmise à travers une ouverture de diamètre D est donnée par :

$$P(D) = P_0 \left(1 - e^{-\frac{2D^2}{d^2}} \right) \quad (\text{C.2})$$

avec P_0 la puissance du faisceau devant l'ouverture et d le diamètre du waist du faisceau à $1/e^2$. On peut donc calculer ce diamètre en plaçant une ouverture de dimension connue sur le trajet d'un faisceau et en mesurant sa transmission (voir figure C.1). Ce diamètre est donné par :

$$d = \frac{D}{\sqrt{-\frac{1}{2} \ln \left(1 - \frac{P(D)}{P_0} \right)}} \quad (\text{C.3})$$

Pour une ouverture de diamètre $D=1.5$ mm placée sur le trajet du faisceau laser de pince optique en sortie du collimateur ($P_0=28$ mW), on mesure $P(D)=12.5$ mW d'où un diamètre du waist du faisceau de 2.76 mm.

On notera que cette méthode est plus délicate à mettre en place que la première du fait que l'ouverture doit être parfaitement centrée sur l'axe du faisceau.

C.2 Mesure de la distance focale d'un objectif de microscope

Bien que les constructeurs ne donnent pas la focale de leurs objectifs, il est toutefois possible de l'estimer à partir de leur grandissement et de la focale de la lentille de tube. Pour les Olympus celle-ci est généralement de 180 mm (200 mm pour Leica et Nikon, 165 mm pour Zeiss), d'où pour notre objectif (Apoplan, ON=1.45, Olympus) de grandissement $g_y = 60$ une focale de $f = 180/g_y = 3\text{mm}$.

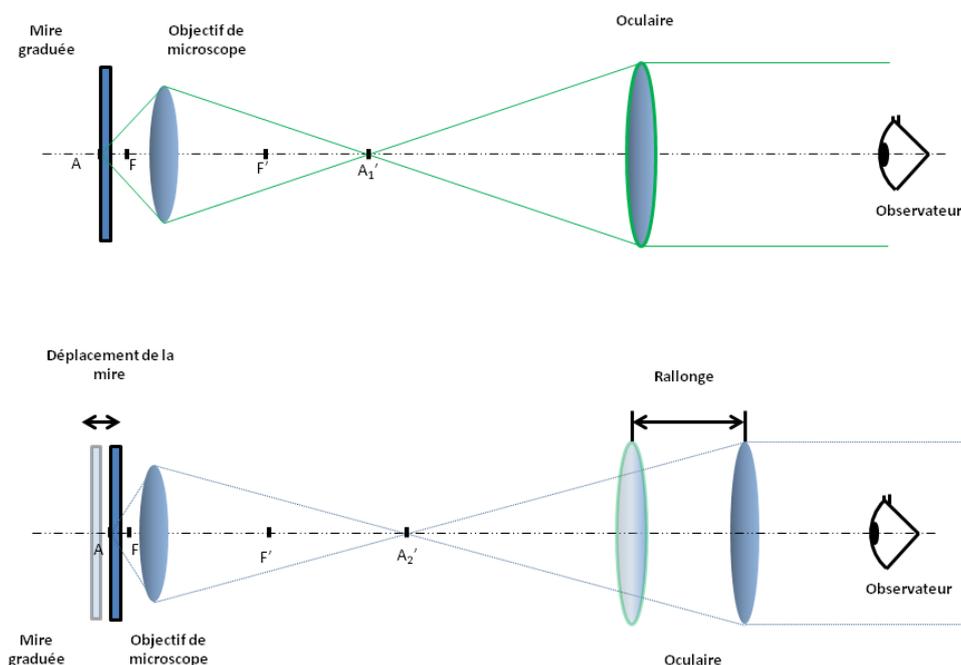


FIGURE C.3 – Mesure de la focale d'un objectif de microscope. En haut : l'image de la mire en A'_1 est renvoyée à l'infini par l'oculaire. L'observateur peut mesurer un grandissement gy_1 en utilisant les graduations de la mire et celles de l'oculaire. En bas : en plaçant une rallonge entre l'objectif et l'oculaire, il faut déplacer l'échantillon pour que son image soit à l'infini pour l'observateur. La nouvelle position, A'_2 , de l'image de la mire par l'objectif donne un nouveau grandissement gy_1 .

Nous donnons également ici une méthode pour mesurer cette focale. Celle-ci nécessite une mire graduée, un oculaire et une rallonge (dans notre cas un tube en laiton de dimension connue). Notre objectif est prévu pour faire l'image de l'objet à l'infini, toutefois il est possible de faire l'image de l'objet, ici la mire, à une distance réelle finie sans que l'image ne soit trop détériorée (en éloignant légèrement la mire de l'objectif). La formule de Newton nous donne la relation du grandissement de l'objectif gy_1 avec la focale de l'objectif et la position de l'image de la mire, A'_1 par rapport au plan focal image de l'objectif, F' (voir figure C.3) :

$$gy_1 = \frac{F'A'_1}{f'} \quad (\text{C.4})$$

En plaçant une rallonge de longueur d entre l'objectif et l'oculaire et en déplaçant la mire pour que son image soit nette pour l'observateur, on a son image par l'objectif, A'_2 , telle que $d = A'_1 A'_2$. Le nouveau grandissement vaut alors :

$$gy_2 = \frac{F' A'_2}{f'} \quad (\text{C.5})$$

On démontre la relation suivante reliant la focale de l'objectif aux deux grandissements correspondant aux deux positions de l'image de la mire ainsi que la distance d :

$$f = \frac{d}{|gy_2 - gy_1|} \quad (\text{C.6})$$

A l'aide de la mire graduée nous avons mesuré sans rallonge $gy = 57,6 \pm 0.3$ et avec une rallonge (tube de $30.0 \text{ mm} \pm 0.3$ placé entre l'objectif et l'oculaire) $gy' = 67,5 \pm 0.4$ soit donc une focale $f = 3.0 \text{ mm} \pm 0.1$.

Préparation des billes pour la pince optique

Cette annexe décrit le protocole utilisé pour la préparation des billes et de la surface des chambres microfluidiques pour les expériences en pince optique sur les oligonucléotides.

D.1 Fonctionnalisation des billes

Des billes carboxyles (COOH) en polystyrène de diamètre $0.974\mu\text{m}$ (Bangs Laboratories, Inc) sont fonctionnalisées avec l'anticorps anti-digoxigénine. Les tampons utilisés sont disponibles chez le même fournisseur que les billes (PolyLink Protein Coupling Kit) et la fonctionnalisation est inspirée du protocole fourni avec le kit. La réaction consiste à faire réagir un carbodiimide (EDAC, Sigma) avec la fonction COOH de la bille pour créer un ester actif réagissant avec une fonction amine de l'anti-digoxigénine comme schématisé sur la figure D.1.

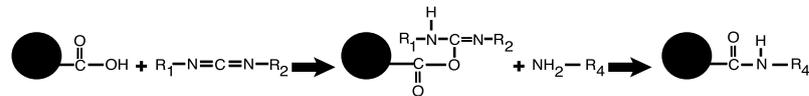


FIGURE D.1 – La fonctionnalisation des billes carboxyles (COOH) avec l'anti-digoxigénine se fait en deux étapes. La première réaction consiste à créer une fonction ester sur les billes en faisant réagir l'EDAC avec la fonction COOH des billes. La seconde réaction se fait ensuite entre la fonction amine de la protéine d'intérêt avec la fonction ester de la bille.

Matériel :

- Environ $235\ \mu\text{l}$ de billes carboxyles (COOH) en polystyrène de diamètre $0.974\mu\text{m}$ (Bangs Laboratories, Inc)
- Tampon "PolyLink Coupling buffer" (PLC), réchauffé à température ambiante
- Tampon "Storage" auquel on rajoute de la BSA fraîche à $1\ \text{g/L}$, réchauffé à température ambiante
- Tampon d'activation, réchauffé à température ambiante
- Centrifugeuse
- Bain à ultrasons

Rinçage des billes :

- Prélever $6.25\ \text{mg}$ de billes (Soit environ $235\ \mu\text{l}$).

Annexe D - Préparation des billes pour la pince optique

- Centrifuger 6 minutes à 1000G
- Retirer le surnageant et rajouter 200 μl avec du PolyLink Coupling buffer (PLC).

Répéter l'opération deux fois (en soniquant après chaque étape pendant 5 minutes) puis une dernière fois mais en rajoutant cette fois-ci 85 μl du PLC buffer et ne pas retirer le surnageant. Bien vortexer avant de passer à l'étape suivante.

Remarque : la vitesse de centrifugation dépend du diamètre et de la densité des billes utilisées.

Activation de la surface des billes :

On fait ici réagir l'EDAC avec la fonction -COOH des billes pour ajouter une fonction ester qui nous permettra ensuite de fixer la protéine d'intérêt.

- Diluer 10 mg d'EDAC (aliquot) dans 50 μl d'activation buffer (pour une solution finale à 200 mg/ml)
- Mettre 20 μl de cette solution dans celle de billes
- Vortexer puis soniquer 5 minutes
- Laisser incuber 30 minutes.

Fixation de la protéine (ici l'anti-digoxigénine) :

On ajoute ensuite la protéine dont la fonction amine réagit avec la fonction ester de la bille.

- Ajouter 100 à 250 μg de protéine à la solution de billes
- Laisser incuber une nuit sous agitation à 4°C.

Rinçage :

On rince à présent les protéines en excès n'ayant pas réagi avec une fonction ester des billes.

- Centrifuger 10 minutes les billes à 1000G
- Resuspendre le culot dans 100 μl de tampon PLC.

Répéter l'opération deux fois puis resuspendre le dernier rinçage dans 235 μl de tampon "Storage" auquel on a ajouté de la BSA fraîche à 1 g/L. Soniquer 15 secondes puis conserver la solution sous agitation permanente à 4°C.

Cette solution finale contient 26.8 mg/ml (soit 2.68 %) ou $5.54 \cdot 10^{10}$ billes/ml.

D.2 Mélange avec l'oligonucléotide

La configuration adoptée pour exercer des forces sur l'ADN double brin consiste à accrocher une extrémité d'un brin à la surface et l'extrémité de l'autre brin sur la bille piégée. L'ADN possède donc deux fonctionnalisations différentes pour assurer une accroche spécifique à la bille

Annexe D - Préparation des billes pour la pince optique

et à la surface. L'accroche sur la bille se fait entre une digoxigénine attachée chimiquement à une extrémité 5' d'un brin et l'anti-digoxigénine fixée sur la bille. L'extrémité 5' du brin complémentaire est fonctionnalisée avec une biotine pour s'attacher spécifiquement à une neutravidine sur la surface. La figure D.2 schématise les différentes attaches depuis la bille jusqu'à la surface.

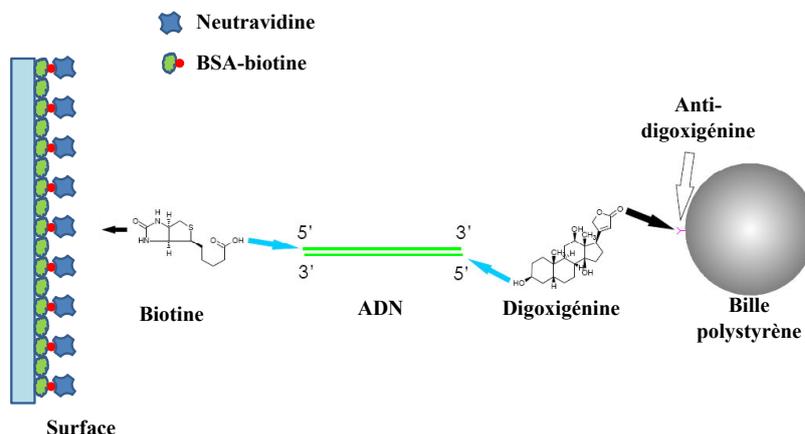


FIGURE D.2 – Fonctionnalisation d'un double brin d'ADN. Chaque extrémité 5' des deux brins possède soit une biotine soit une digoxigénine pour se lier respectivement à l'avidine attachée à la surface ou l'anti-digoxigénine fixée sur la bille.

L'ADN double brin utilisé pour nos expériences comprend 7500 paires de bases. Différents rapports ADN/billes ont été testés durant cette thèse pour assurer une attache finale unique d'ADN entre la bille et la surface.

- Pour un rapport de 500 ADN par bille, mélanger $0,5 \mu\text{l}$ de billes avec $2.3 \mu\text{l}$ d'ADN à 10 nM
- Pour un rapport de 100 ADN par bille, mélanger $1 \mu\text{l}$ de billes avec $1 \mu\text{l}$ d'ADN à 1 nM
- Pour un rapport de 10 ADN par bille, mélanger $0.85 \mu\text{l}$ de billes avec $2 \mu\text{l}$ d'ADN à 4 nM

Le mélange est ensuite incubé une nuit sous agitation à 4°C . Il est ensuite dilué X fois puis centrifugé X minutes à 1000G. Le surnageant comprenant les ADN n'ayant pas réagi est remplacé par du tampon TRIS contenant la BSA à 1 g/L puis la solution est injectée dans la cellule microfluidique.

D.3 Préparation de la surface et fixation des billes par l'ADN

Les cellules microfluidiques utilisées sont constituées d'une lamelle d'épaisseur $170 \mu\text{m}$ (préalablement nettoyée à l'acétone et au plasma cleaner) fixée à une lame de microscope par deux bandes de scotch double face espacées l'une de l'autre par environ 5mm. On suit ensuite les étapes suivantes pour fonctionnaliser la surface :

- Injecter de la BSA Biotinylée 0.1 g/L et laisser incubé pendant au moins 2 heures à 4°C
- Rincer avec du tampon TRIS
- Injecter de la neutravidine à 0.1 g/L et incubé 15 minutes à 4°C
- Rincer avec du tampon TRIS contenant de la BSA fraîche à 1 g/L

Annexe D - Préparation des billes pour la pince optique

- Injecter le mélange de billes/ADN et incuber plusieurs heures à 4°C
- Rincer lentement avec du tampon TRIS contenant la BSA à 1 g/L puis sceller la cellule microfluidique avec du vernis.

Articles scientifiques

Simultaneous calibration of optical tweezers spring constant and position detector response

Référence [1]

Improved Photon Yield from a Green Dye with a Reducing and Oxidizing System

Référence [2]

Simultaneous calibration of optical tweezers spring constant and position detector response

Antoine Le Gall,¹ Karen Perronet,¹ David Dulin,¹ André Villing,¹
Philippe Bouyer,¹ Koen Visscher,^{1,2} and Nathalie Westbrook^{1,*}

¹Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, CNRS et Université Paris Sud 11,
Campus Polytechnique, 2 avenue Fresnel, 91127 Palaiseau cedex, France

²Departments of Physics, Molecular and Cellular Biology, and College of Optical Sciences,
University of Arizona, Tucson, Arizona 85721, USA

*nathalie.westbrook@institutoptique.fr

Abstract: We demonstrate a fast and direct calibration method for systems using a single laser for optical tweezers and particle position detection. The method takes direct advantage of back-focal-plane interferometry measuring not an absolute but a differential position, i.e. the position of the trapped particle relative to the center of the optical tweezers. Therefore, a fast step-wise motion of the optical tweezers yields the impulse response of the trapped particle. Calibration parameters such as the detector's spatial and temporal response and the spring constant of the optical tweezers then follow readily from fitting the measured impulse response.

© 2010 Optical Society of America

OCIS codes: (350.4855) Optical tweezers; (170.4520) Optical confinement and manipulation; (120.4640) Optical instruments; (120.1880) Detection; (180.0180) Microscopy.

References and links

1. K. Visscher, S. P. Gross and S. M. Block, "Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing," *IEEE J. Quantum Electron.* **2**, 1066–1076 (1996).
2. F. Gittes and C. Schmidt "Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers," *Opt. Lett.* **23**, 7–9 (1998).
3. K. C. Neuman, and A. Nagy, "Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy," *Nat. Methods* **5**, 491–505 (2008).
4. K. Visscher, M. J. Schnitzer, and S. M. Block, "Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp," *Nature* **400**, 184–189 (1999).
5. Y. R. Chemla, "Revealing the base pair stepping dynamics of nucleic acid motor proteins with optical traps," *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 3080–3095 (2010).
6. S. F. Tolić-Nørrelykke, E. Schäffer, J. Howard, F. S. Pavone, F. Jülicher, and H. Flyvbjerg, "Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane" *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 103101–11 (2006).
7. M. W. Allersma, F. Gittes, M. J. deCastro, R. J. Stewart, and C. F. Schmidt, "Two-Dimensional Tracking of ncd Motility by Back Focal Plane Interferometry," *Biophys. J.* **74**, 1074–1085 (1998).
8. K. Vermeulen, J. van Mameren, G. Stienen, E. Peterman, G. Wuite, and C. Schmidt, "Calibrating bead displacements in optical tweezers using acousto-optic deflectors," *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 013704 (2006).
9. K. Berg-Sørensen, L. B. Oddershede, E. L. Florin, and H. Flyvbjerg, "Unintended filtering in a typical photodiode detection system for optical tweezers," *J. Appl. Phys.* **93**, 3167–3176 (2003).
10. K. Berg-Sørensen, and H. Flyvbjerg, "Power spectrum analysis for optical tweezers," *Rev. Sci. Instrum.* **75**, 594–612 (2004).
11. P. M. Hansen, I. Tolic-Nørrelykke, H. Flyvbjerg, and K. Berg-Sørensen, "tweezercalib 2.1: Faster version of MATLAB package for precise calibration of optical tweezers," *Comput. Phys. Commun.* **175**, 572–573 (2006).

1. Introduction

Optical tweezers are ideally suited for manipulation of micron and submicron-sized particles. The subsequent application of high-resolution position detection methods, e.g. back focal plane detection [1, 2], and accurate calibration of the tweezers' spring constant then readily enabled the measurement of displacements and forces by individual biomolecular motors [3–5].

When the same laser beam is used for optical trapping and position detection, the exclusive experimental set-up discussed here, back-focal plane (BFP) detection reports on the displacement of the trapped particle with respect to the center of the optical tweezers. Forces are readily computed by multiplication of displacement and the calibrated spring constant of the tweezers. Over the years a variety of calibration methods have been proposed, although only a few simultaneously yield the calibration parameters for the position sensor and the spring constant [6,7]. Position detector calibration used to be laborious when surface mounted beads were used and scanned through the laser beam to determine the average detector response. For example, there may be considerable variability in the axial position of the particle with respect to the tweezers center which affects the lateral calibration coefficients and which can only be minimized by sufficient averaging. This situation was remedied by Vermeulen et al. [8] who acquired the detector response by very rapidly scanning the trapping laser beam over the particle (so fast as not to allow any appreciable particle motion). This method enables online calibration of each trapped particle used in an experiment, but does not simultaneously yield the tweezers spring constant. Furthermore, it requires rapid scanning of the optical tweezers, something not always possible with all set-ups, even when utilizing acousto-optical deflectors (AOD) for positioning of the optical tweezers. A power spectrum density (PSD) analysis of the particle position in the optical tweezers circumvents such practical limitations and is capable of providing the optical tweezers spring constant as well as the linear detector response [7].

Here we present an alternative method which measures the impulse response of the BFP detector yielding both the detector response as well as the optical tweezers spring constant, and which may lend itself better for quick online use during day-to-day experiments. Our impulse response method can also account for the temporal response of the specific quadrant photodiode (QPD) [9] used as part of the BFP set-up and for the limited response time of the device (piezo mirror, AOD) moving the optical tweezers laser beam. Using an AOD positioned in the optically conjugated plane of the back focal plane of the microscope objective, the trap is moved in a step-wise fashion from one position to another. The displacement of the optical tweezers is then only limited by the temporal response of the AOD given by $T_r = 0.64D/V$, where T_r is the time interval for the light intensity to go from 10% to 90% of maximum value in response to an acoustic step, D is the laser $1/e^2$ waist and V the acoustic velocity. In our conditions this response time is $1.6 \mu\text{s}$, much shorter than any of the other typical temporal responses in the system (QPD, particle in the trap). As the trap is rapidly moved, the bead cannot follow the trap motion instantaneously, but rather relaxes towards the new trap position with a relaxation time given by the ratio of the viscous drag coefficient and the tweezers spring constant. Since the BFP position detector as implemented here reports on the position of the particle with respect to the center of the optical tweezers, a sudden trap displacement yields the impulse response rather than the step response of the particle, visible as a spike in the QPD signal. If the QPD were of infinite temporal bandwidth the height of the peak would equal the trap displacement, while the relaxation curve yields the tweezers spring constant. However, since we used a QPD with limited temporal response at a wavelength of 1064 nm [9], the measured response proved a convolution of the impulse response of the particle in the optical trap and that of the photodiode. Upon fitting the measured response we found excellent agreement with power spectral analysis as well as with the equi-partition methods.

2. Materials and methods

Experiments were done using an Olympus IX70 inverted microscope and an oil immersion objective (Olympus PlanApo 60X, NA=1.45). A Nd:YAG laser (Quantum Laser, model Forte 1064, TEM₀₀) delivering up to 1W of power was used for trapping. The laser beam is diffracted by an AOD (Intra Action Corp. DTD-274HA6 with one AOD removed) allowing the steering of the trap along one axis. To steer the trap horizontally in the sample the AOD needs to be conjugated with the back focal plane of the objective. To do so the AOD is located at the focal plane of the first lens, L1, of the beam expander used to fill the pupil of the objective. The first-order diffracted beam by the AOD was sent into two additional 1:1 telescopes used for axial steering of the trap and for combining the optical tweezers with the excitation optical path used for Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy (Fig. 1).

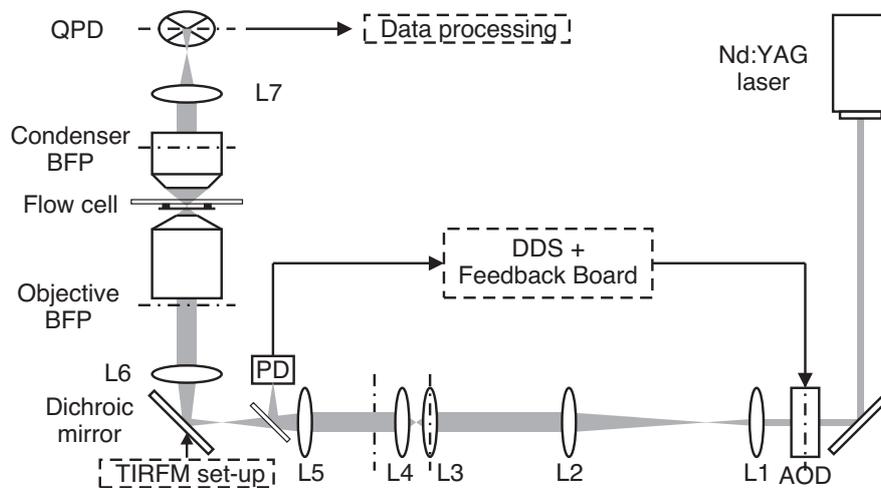


Fig. 1. Experimental set-up. Dashed lines represent the conjugated planes at the center of the AOD and on the QPD. A cover glass and a photodiode (PD) were used to probe the laser power before the objective in order to keep it constant via the feedback board. Focal lengths are (in mm) 175, 500, 50, 50, 300, 300 and 40 for L1 to 7.

The first-order diffracted beam was coupled into the oil immersion objective via a dichroic mirror (Chroma, z488/1064rpc), and transmitted light was collected with a high numerical aperture condenser (Olympus Aplanat Achromat, NA=1.4) and directed to the QPD (SPOT-9DMI, OSI Optoelectronics). An additional lens, L7, was positioned between the condenser and the QPD to make the appropriate conjugation of the QPD with the BFP of the microscope objective and the AOD. All 4 signals from the QPD quadrants were digitized simultaneously at a rate of 65536 Hz using a Delta Sigma DAC (National Instrument, PCI 4474) and further processed using LabView 8.2. We note that, before calibration, displacement signals as computed from the sampled quadrant values are dimensionless since these are normalized by the sum of all quadrants values. A home-built Direct Digital Synthesizer (DDS) was used to generate the radio frequency signal driving the AOD and controlling the trap displacement in the sample. The DDS was addressed via computer using a dedicated processor generating highly reproducible command sequences. A fraction of the laser beam power was picked off using a microscope cover glass and directed towards a photodiode to complete a feedback loop controlling the AOD driving signal amplitude as to maintain constant laser power at the entrance of the objective. For the baseline position detector signal to be constant for different AOD frequencies we

found it crucial that the AOD was accurately located at the proper conjugate plane - a requirement that is more easily satisfied when L1 has a not too short focal length - and that constant power is maintained even though the position signals were normalized by the QPD sum signal. The AOD was calibrated by sending a 10 kHz step-ramp to the AOD over a range of 400 kHz around a center frequency of 26.2 MHz. For every step, 25 images of a trapped bead were acquired with a CCD camera (uEye, UI-2250-M), averaged, and processed with ImageJ using the "particle tracker and detector" plug-in to localize the position of the bead in pixels in the sample. Pixels dimensions corresponded to 22.27 nm by 22.27 nm in the sample plane as calibrated using a 10 μm -division stage micrometer. The AOD response was found to be linear within the frequency range used, yielding an effective trap displacement of 1.54 nm/kHz. Silica beads were purchased from Bangs Laboratories (SS03N, 1 μm diameter) and diluted to 1:10⁵ (v/v) in de-ionized water from an initial concentration of 10% wt stock beads. The solution was injected into a 5 mm wide chamber made of two narrow pieces of double sticky tape sandwiched between a cover glass and the microscope slide. All measurements were done $\sim 5 \mu\text{m}$ from the surface where the influence of the surface on the viscous drag coefficient was smaller than 6%.

3. Experimental results

The data shown in Fig. 2 was obtained by a back-and-forth displacement of the trap of 77 nm. This pattern was repeated 100 times, and the averaged data fitted with Eq. (3) using Labview 8.2 or IGOR Pro 5.0 (for off-line analysis). Upon a rapid stepwise displacement of the trap the bead is expected to relax back to the center of the trap according to:

$$X(t) = X_0 e^{-t/t_b} \quad (1)$$

where $X(t)$ is the time-dependent bead displacement from the center of the trap, X_0 the initial displacement of the trap, and $t_b = \beta/k$ the typical relaxation time of the bead in the trap with β the viscous drag coefficient for the bead and k the trap's spring constant. However, the data recorded and shown in Fig. 2 do not fit this simple equation due to limited time response of the QPD when used at a wavelength of 1064 nm. Berg-Sørensen et al. [9] analyzed the temporal response of the silicon QPD detectors as a function of wavelength. The transparency of silicon at 1064 nm was found to cause a time response delay of the detector due to charge carriers created in the n-layer, where they are transported by thermal diffusion, instead of being created in the depletion area where they are detected at the nanosecond timescale. The QPD temporal response was found to obey:

$$g(t) = \alpha \delta(t) + (1 - \alpha) \frac{1}{t_d} e^{-t/t_d} \quad (2)$$

with α the fraction of charge carriers created in the depletion area, $\delta(t)$ the Dirac function describing the instantaneous response and t_d the time response of the QPD for charge carriers created in the n-layer. The measured bead response upon a stepwise trap displacement is then given by the convolution of $X(t)$ and $g(t)$:

$$S(t) = \int_0^t X(t)g(t-t')dt = X_0 \alpha e^{-t/t_b} + X_0 (1 - \alpha) \frac{t_b}{t_b - t_d} \left(e^{-t/t_b} - e^{-t/t_d} \right) \quad (3)$$

This equation fits the dimensionless data in Fig. 2. α , t_b and t_d are free parameters. With $X_0 = 77$ nm the initial and known displacement of the trap, we then obtain the calibration of the position sensor in unit of 1/nm. At the same time the trap spring constant k is derived from t_b with knowledge of the viscous drag coefficient of the bead ($\beta = 6\pi\eta r$, with η the viscosity and r the radius of the bead).

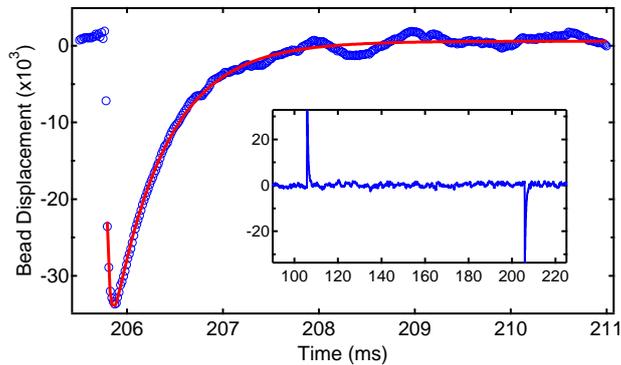


Fig. 2. Computed displacement in dimensionless units of a trapped silica bead of diameter $1 \mu\text{m}$. Displacement of 77 nm of the trap was repeated 100 times and QPD signal (blue circles) was averaged before being fitted by Eq. (3) (red line). The inset shows the whole acquired signal and the main graph shows a zoom of the second peak fitted with Eq. (3). The averages of the fitting parameters for the two peaks give a detector calibration of 0.515 pm^{-1} , a cutoff frequency of the trap of 302 Hz , a fraction of instantaneous response of the QPD of $\alpha = 0.36$, and a cutoff frequency for the QPD of 6341 Hz (indeed 100 times lower than the AOD bandwidth and 10 times lower than the sampling rate).

Figure 3 shows the dimensionless values X_0 , as found from the fits, as a function of trap displacement in units of nanometers, yielding a linear detector response for displacements of up to 150 nm from the trap center. Since the position calibration depends upon a fit of the dynamics response of the bead in a harmonic trap potential, the divergence from linear behavior is likely due to non-linearities in the BFP detection method and any non-harmonicity of the trap potential this far out from the trap center.

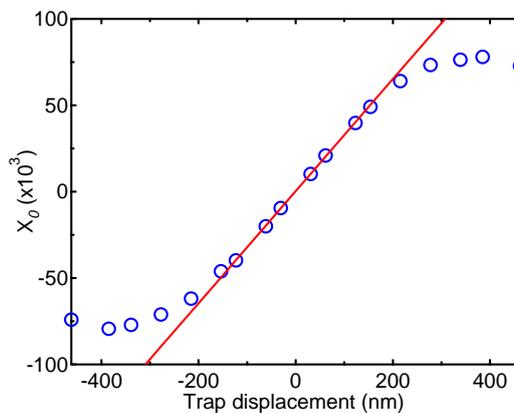


Fig. 3. Linearity of detector response. Blue circles represent the experimental data and the red line the fit of the linear region of the trap. Experimental data show a linear range of the detector response of $\pm 150 \text{ nm}$ with a slope of $0.324 \pm 2.10^{-3} \text{ nm}^{-1}$ and an intersection with the vertical axis at 0.3 ± 0.2 (dimensionless).

Typical errors in position detector calibration and trap spring constant were estimated

by repeating the method 10 times with a single bead. We found a detector response of $0.512 \pm 0.013 \mu\text{m}^{-1}$ (mean \pm s.d.) so with comparable precision as scanning the bead with the laser as reported in [8] and a time response of the bead of 0.532 ± 0.027 ms (i.e. a spring constant of 0.0188 ± 0.0010 pN.nm $^{-1}$) which proves the method to be highly reproducible. In addition we recorded the Brownian motion of the same bead at 65536 Hz for 8 seconds. We then compared our method to the power spectral method by Berg-Sørensen et al. [10] which also takes into account the limited temporal response of the QPD using their Matlab utility [11]. The time response of the bead thus found was $t_b = 1/2\pi f_c = 0.555 \pm 0.013$ ms with f_c the cutoff frequency of the PSD and a spring constant computed as 0.0183 ± 0.0004 pN.nm $^{-1}$. Multiplying the PSD with the frequency squared as described by Allersma et al. in [7] also allows one to get the detector response, calculated here as $0.479 \pm 0.007 \mu\text{m}^{-1}$. Both values of the spring constant and the detector response are in good agreement with our method. It should also be mentioned that when using a stiff trap the latter method shows some limitations due to the limited time response of silicon detectors while our method remains valid if the sampling rate is high enough.

To test our position detection calibration value of $0.512 \mu\text{m}^{-1}$, we used it to convert the particle's displacement, x , measured as a dimensionless quantity on our QPD, in units of length. We could then compute the spring constant from the equipartition theorem method $k = k_B T / \langle x^2 \rangle$ with k_B the Boltzmann constant and T the absolute temperature. We found a spring constant of 0.0175 pN.nm $^{-1}$, consistent with the spring constant derived from t_b using our method and with the cutoff frequency found using Berg-Sørensen et al. power spectral method [10] as reported above. The somewhat lower value obtained using the equipartition method is consistent with the notion that the slow drift may accumulate, increasing the variance and thus underestimating k , whereas our jump method and power spectral method, in practice, prove much less sensitive to such drift.

4. Conclusion

We have demonstrated a new calibration method that has the advantage of inferring both trap and detector calibrations using a single laser and standard acousto-optic deflector. The limited time response of the QPD detector is properly taken into account. As with most other methods, the bead diameter, as well as the temperature and the medium viscosity, have to be known. This calibration can be performed rapidly on the same bead as will then be used for the experiment, and in the same trapping conditions. Through comparison with other existing methods, we have shown that the calibration parameters from this simple method are both precise and accurate.

Acknowledgments

We thank Frédéric Moron for technical support on the detection electronics. This work has been supported by the Region Ile-de-France in the framework of C'Nano IdF. C'Nano IdF is the nanoscience competence center of Paris Region, supported by CNRS, CEA, MESR and Region Ile-de-France. KV's stay in Institut d'Optique was financed by grants from Université Paris Sud XI and CNRS.

Improved Photon Yield from a Green Dye with a Reducing and Oxidizing System

Antoine Le Gall,^[a] David Dulin,^[a] Gilles Clavier,^[b] Rachel Méallet-Renault,^[b] Philippe Bouyer,^[a] Karen Perronet,^[a] and Nathalie Westbrook^{*[a]}

Among the labels available for single-molecule fluorescence microscopy, organic dyes are still very much used thanks to their small size, well-known photophysical properties and easiness to conjugate with biomolecules.^[1,2] Either for controlling their bleaching process for super-resolution experiments^[3]—or just to be able to monitor them for a longer time—increasing the lifetime of organic dyes has raised interest among the community.^[2,4,5,6] As oxygen is known to be one of the major factors leading to photobleaching, different strategies have been proposed to eliminate it from the studied samples. However, as oxygen is also a triplet state quencher, the result is usually an increased blinking of the fluorophore, that may be annoying for several applications such as tracking or FRET (Förster resonance energy transfer). In this context, Tinnefeld and co-workers^[2] have developed a rational technique to minimize both photobleaching and blinking by removing oxygen and adding a reducing and oxidizing system (ROXS) to quench the triplet state by electron-transfer reactions. They demonstrated its high efficiency on several dye families in the yellow-to-red range. Extending this strategy to green dyes could be problematic since these authors also showed^[7] that an excitation at 488 nm, more energetic than a red one, could bring a dye from the first excited singlet or triplet state to higher excited states, susceptible to lead to increased photobleaching.

Herein, we adapt this ROXS strategy to BODIPY-FI (BFI), a green dye (excitation@488 nm, emission@510 nm). Its very small size makes it the label of choice for biomolecular labeling when steric hindrance is concerned,^[8] but its short lifetime and small emission rate have been a strong limitation so far. We show that we can increase by a factor of 20 the total number of emitted photons, as well as the lifetime of this fluorophore. Our method, compatible with biological experiments, increases the interest of using BFI for single molecule experiments.

The ROXS described in ref. [2] can be efficient on BFI, as proved by the calculations exposed in the Experimental Section. Its mechanism, based on an electron-transfer reaction be-

tween the triplet state and the redox species, is briefly depicted in Figure 1, where ascorbic acid (AA) is the reducing agent and methylviologen (MV) the oxidizing one. The main difference with ref. [2] is that we used another oxygen scavenging

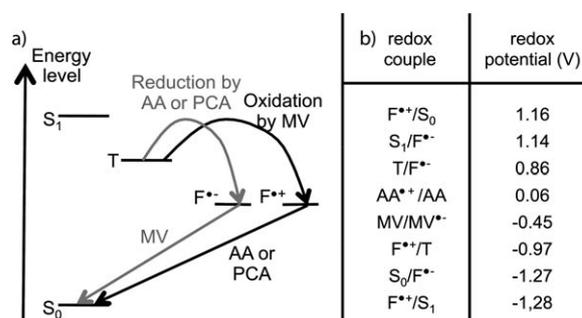


Figure 1. a) Action of ROXS to quench the triplet state through electron-transfer reactions. S₀, S₁ and T denote the respective ground, first excited and triplet states. F^{•-} and F^{•+} are the radical anion and cation. b) Values of the redox potentials involved in the process (given vs. SCE). The potentials for AA and MV come from refs. [11] and [12], respectively. The Bodipy-FI redox potentials are taken from ref. [13].

system based on protocatechuic acid (PCA) combined with protocatechuate-3,4-dioxygenase (PCD).^[6] This system is compatible with the use of cell extracts, as needed in some biological experiments, and presents no fluorescence in the green range unlike the glucose oxidase/catalase one, used in ref. [2]. In preliminary work,^[9] we had observed that BFI could emit more photons using AA + MV in combination with PCA/PCD. Herein, we made a much more detailed analysis of the gain both in total lifetime and in number of photons, and also studied blinking events. Our analysis is supported by an interpretation based on the redox potentials of the Bodipy FL. The other important novelty is that we prove that the use of PCA leaves the addition of AA unnecessary. Indeed, since $E_{\text{ox}}(\text{PCA vs. saturated calomel electrode, SCE}) = 0.79 \text{ V}$,^[10] PCA can also play the role of the reducing agent in ROXS. We checked experimentally that the addition of AA had no visible effect on the fluorescence properties of Bodipy FI, and we did not use it in our study.

To compare the photophysical properties of Bodipy FI with and without the ROXS system, we performed measurements in two different environments: in a TRIS buffer (denoted hereafter buffer T) containing oxygen, and in a buffer T depleted in oxygen with PCA/PCD and where an oxidizing agent MV was added (called buffer R).

[a] A. Le Gall,⁺ Dr. D. Dulin,⁺ Dr. P. Bouyer, Dr. K. Perronet, Prof. Dr. N. Westbrook
Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique
CNRS et Université Paris Sud 11
2 avenue Fresnel, 91127 Palaiseau cedex (France)
Fax: (+33) 1-64-53-31-01
E-mail: nathalie.westbrook@institutoptique.fr

[b] Dr. G. Clavier, Dr. R. Méallet-Renault
PPSM, ENS Cachan, CNRS, UniverSud
61 av President Wilson, 94230 Cachan (France)

[*] These two authors contributed equally to this work

In buffer T, BFI fluorescence exhibits a poor signal-to-noise ratio (SNR) compared to cyanine dyes such as Cy3 or Cy5. At moderate excitation intensities ($\sim 700 \text{ W cm}^{-2}$), it is however possible to observe single BFI with $\text{SNR} \sim 5$. When we deplete buffer T of its oxygen, it has a dramatic effect on BFI fluorescence, making it almost undetectable. Flushing the sample with buffer T restores the fluorescence signal. On the other hand, using buffer R increases BFI fluorescence lifetime up to second timescales, leading to a larger number of photons emitted by a single BFI before it bleaches. This confirms that merely eliminating oxygen reduces photobleaching but brings BFI into a metastable dark state. With the addition of the oxidizing agent MV which, combined to the reducing agent PCA, replaces oxygen as a triplet state quencher, we get both a longer lifetime and more photons out of our green fluorophore.

To quantify the improvement in the fluorescence properties of BFI using buffer R, we recorded the time evolution of many single BFI fluorescence intensities using our objective-based total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) setup. Each wide-field image contained 200 to 400 molecules exhibiting an SNR higher than four, which we observed over a duration long enough so that they would all be photobleached by the end of the film. Using two or three image series, we analyzed 590 molecules in buffer T and 800 in buffer R. In Table 1,

	Buffer T	Buffer R
Total number of emitted photons	$5\,000 \pm 500$	$100\,000 \pm 7\,000$
Total lifetime (s)	0.20 ± 0.02	3.7 ± 0.3
Emitted photons during first ON time		$47\,000 \pm 3\,000$
First ON time (s)		1.8 ± 0.1

we report their fluorescence properties for a power of 20 mW at the entrance of the microscope, that is, an excitation intensity at the center of the Gaussian beam of 450 W cm^{-2} . Note that because of the Gaussian-shaped excitation beam, molecules are excited at different intensities, depending on their location in the excitation area. In the following, we will discuss the different characteristics presented in Table 1.

Figure 2 shows the probability for BFI to emit N photons before photobleaching in buffers T and R. From an exponential fit of each plot, we can deduce the mean total number of emitted photons: 5000 in buffer T and 10^5 in buffer R. This represents a gain of 20.

We analyzed in the same way the lifetime of the fluorophores before photobleaching. In buffer T, bleaching occurs typically during the first or second recorded image (one image = 100 ms) and almost no blinking can be observed with our temporal resolution. The longer lifetime in buffer R is sometimes accompanied by the appearance of blinking events, such as the one shown in Figure 3. The total lifetime reported in Table 1 takes into account the sum of the ON times. The mean lifetime is 0.20 s in buffer T and increases to 3.7 s in buffer R, almost a factor of 20 larger. Among the 800

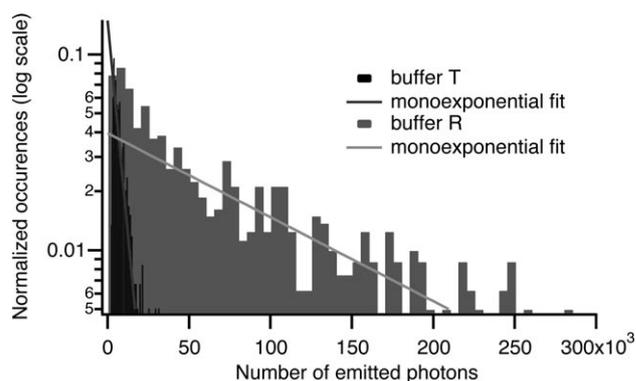


Figure 2. Histograms showing the probability for a BFI to emit N photons in buffer T (black bins) and R (grey bins).

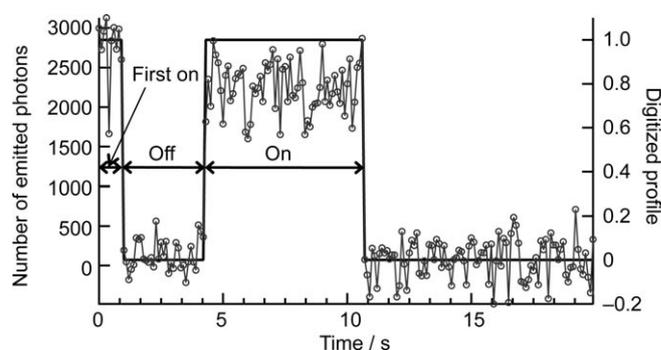


Figure 3. Example of an intensity-versus-time trace of BFI in buffer R (\circ) and its digitalized trace (solid), defining ON and OFF times. This fluorophore blinked once, that is, there was one OFF and one ON times after the first ON.

molecules studied in buffer R, 57% blinked. However, even if we compare the emission during the first ON time in buffer R to the total emission in buffer T, there is already a gain by a factor of nine in the total number of photons (47000 vs. 5000) and in duration (1.8 s vs. 0.2 s). We calculated the arithmetic mean over all the molecules that blinked at least once, and found a mean number of blinking events of five and a mean duration for ON and OFF times (apart from the first ON) of 0.6 s.

Taking advantage of our TIRFM method, we compared the saturation in the emission of single BFI in buffers T and R. Figure 4 shows the fluorescence rate R_{fluo} during the first ON time versus the excitation intensity I_{exc} . The fluorescence rate is calculated from the number of photons emitted in a 100 ms image divided by the duration of that image. The local excitation intensity for each molecule is deduced from a Gaussian fit of the coverslip fluorescence, which is proportional to the excitation intensity (see details in the Experimental Section). In the displayed data we observe a high dispersion that can be ascribed partly to blinking events shorter than the duration of one image but mainly to non-uniformities of the evanescent wave that are not taken into account in the Gaussian fit of the coverslip fluorescence. Those non uniformities are due to scattering and diffraction of the coherent laser light at every opti-

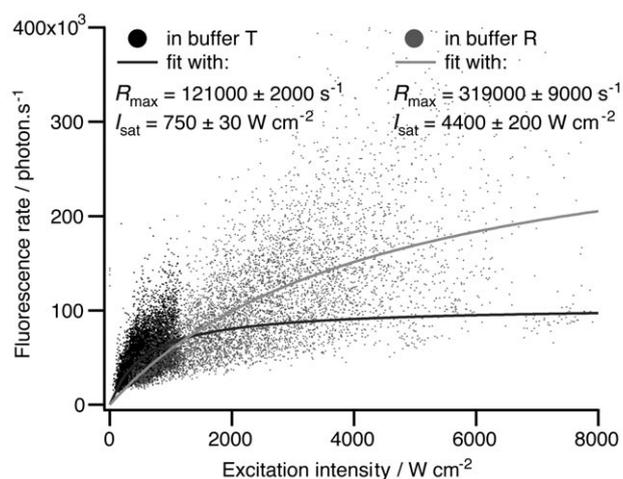


Figure 4. Fluorescence rate versus excitation intensity in buffer T (black) and R (grey). The dots show experimental values and the plain curves the fitting functions.

cal component on the optical path leading to interference fringes.^[14]

Experimental data are well fitted by a saturation curve of the form: $R_{\text{fluor}} = R_{\text{max}} / (1 + I_{\text{sat}} / I_{\text{exc}})$, R_{max} and I_{sat} being two adjustable parameters.^[15] The initial slope of the saturation curve in buffer T is steeper, meaning that for low excitation intensities the fluorescence rate is higher in buffer T than in buffer R during the first 100 ms of excitation. However, saturation occurs quickly in buffer T, probably due to photobleaching, so that above 1.35 kW cm^{-2} , the fluorescence rate becomes higher in buffer R. Of course, this higher fluorescence rate will correspond to a shorter lifetime before photobleaching than reported in Table 1. Thus, whether we want a long lifetime to observe our fluorophores over a long period or a high fluorescence rate for precise localization, the use of buffer R clearly improves the conditions of observation of single Bodipy FI molecules.

To conclude, herein we have shown that ROXS, proposed and tested by Tinnefeld on yellow-to-red emitting dyes, applies also to a green label, BODIPY-FI. Furthermore, in this case, the addition of the reducing agent is unnecessary thanks to the use of PCA/PCD as an oxygen scavenger. In such an environment, BFI acquires a photostability and a brightness fulfilling the criteria for single molecule observation on the time scales of many biological processes.

Our strategy could be extended to other dyes having a similar photobleaching path. The knowledge of the redox potentials and the $E_{0,0}$ energy of the dye allows us to predict if our buffer R is sufficient to reduce photobleaching or if AA has to be added. For the Bodipy family dyes studied in ref. [13], our calculations predict the efficiency of buffer R for all, including BFI and two other dyes emitting in the green. However, for five of them, the anion radical has too high a reducing power, leading to $E(T/F^-) < E_{\text{ox}}(\text{PCA})$. In that case, only the triplet quenching path through F^+ is available.

Experimental Section

Specific binding of BODIPY-FL to a microscope coverslip is done through labelled oligonucleotides attached via a biotin-streptavidin linkage. Sample preparation has been described elsewhere^[9].

The two buffers used to study BODIPY-FL are buffer T alone and buffer T depleted in oxygen plus an oxidizing agent (R). The oxygen scavenger used for oxygen depletion is protocatechuic acid (PCA, Sigma) combined with protocatechuate-3,4-dioxygenase (PCD, Sigma) (PCA 10 mM/PCD 200 nM), prepared as described in ref. [6]. We use 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride hydrate (MV, 0.5 mM, Sigma) as an oxidizing agent, as suggested in ref. [2]. By comparing the redox potentials of each species, we first checked if the ROXS described in ref. [2] is efficient on BFI, using the same notations (see Figure 1). The BFI zero-zero energy $E_{0,0}$ is 2.41 eV for $I_{\text{max}}(\text{abs}) \approx 506 \text{ nm}$. We assume that triplet state energy is 0.28 eV less (as for Cy5^[2]). In the presence of a reducing agent, AA and an oxidizing one, MV, two processes may quench T state and thus reduce its lifetime. AA can first reduce T state in F^- . This reaction is thermodynamically possible since the free energy is $\Delta G = e(E_{\text{ox}} - E_{\text{red}}) - E_{0,0} + C = -0.80 \text{ eV}$ (calculated with the Rehm-Weller equation^[16], assuming that C , which is the solvent-dependent Coulombic attraction energy, is here negligible because water is a solvent with a high polarity). Then, MV reacts with F^- ($\Delta G = -0.82 \text{ eV}$) to bring BFI back in its ground state. MV may also first oxidize the T state to F^+ ($\Delta G = -0.52 \text{ eV}$). Then, AA reacts with F^+ ($\Delta G = -1.10 \text{ eV}$) to bring BFI back to its ground state. In our case, AA is replaced by PCA itself.

Our TIRFM setup has been described in ref. [9]. Additional information for this experiment are that the 488 nm exciting beam is TE linearly polarized and that the evanescent wave generated from the total reflection of the laser beam covers an elliptical area of diameters 100 and 80 μm on the interface. Image series of 100 ms each, separated by 100 ms of non-illumination of the sample, were acquired.

Stacks of 200 images, giving the BODIPY-FI fluorescence signal with time, are analyzed by a home-made Igor Pro program. Single fluorophores are identified from their diffraction-limited image size and their photobleaching in one step. Their time traces are digitized into fluorescent and non-fluorescent states for blinking analysis. From these traces we distinguish the first ON state, and the subsequent OFF and ON states, as shown in Figure 3. Background, due to the glass coverslip fluorescence, is averaged over the last ten pictures of the stacks (after all BFI have been bleached) and then subtracted from the whole series of images before data analysis. This background is proportional to the incident laser beam intensity, so we can use it to determine the local excitation intensity of each dye. Since the laser beam is Gaussian, the sample area displays various excitation intensities and it is thus possible to plot the BODIPY-FI fluorescence rate versus its excitation intensity calculated from the local averaged fluorescence background. All excitation intensities given in this paper take into account the Fresnel transmission coefficient at the interface (1.8 for our incidence angle of 70° and our TE polarization).

Acknowledgements

This work was supported by the Region Ile-de-France in the framework of C'Nano IdF. C'Nano IdF is the nanoscience competence center of Paris Region, supported by CNRS, CEA, MESR and Region Ile-de-France.

Keywords: biophysics · electron transfer · fluorescence · photophysics · single-molecule studies

- [1] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763.
- [2] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, P. Tinnefeld, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5545; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5465.
- [3] J. Vogelsang, C. Steinhauer, C. Forthmann, I. H. Stein, B. Person-Skegro, T. Cordes, P. Tinnefeld, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2475.
- [4] I. Rasnik, S. A. McKinney, T. Ha, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 891.
- [5] C. E. Aitken, R. A. Marshall, J. D. Puglisi, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1826.
- [6] R. Dave, D. S. Terry, J. B. Munro, S. C. Blanchard, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2371.
- [7] R. Kasper, M. Heilemann, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Proc. SPIE* **2007**, *6633*, 66331Z.
- [8] K. Perronet, P. Bouyer, N. Westbrook, N. Soler, D. Fourmy, S. Yoshizawa, *J. Lumin.* **2007**, *127*, 264 and references therein.
- [9] D. Dulin, A. Le Gall, K. Perronet, N. Soler, D. Fourmy, S. Yoshizawa, P. Bouyer, N. Westbrook, *Physics Procedia* **2010**, *3*, 1563.
- [10] M. A. Miranda, F. Galindo, A. M. Amat, A. Arques, *Applied Catalysis B* **2001**, *30*, 437.
- [11] C. R. Lambert, I. E. Kochevar, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 15.
- [12] G. J. Kavarnos, *Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer*, Wiley, New York, **1993**.
- [13] A. B. Nepomnyashchii, S. Cho, P. J. Rossky, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17550.
- [14] R. Fiolka, Y. Belyaev, H. Ewers, A. Stemmer, *Microsc. Res. Tech.* **2008**, *71*, 45.
- [15] Note that R_{fluo} is underestimated when a fluorophore has bleached before the end of the first image, which will occur at high enough excitation intensities. R_{max} is thus most likely underestimated and I_{sat} , that is, the excitation intensity necessary to reach $R_{\text{max}}/2$, is also lower than the real saturation intensity.
- [16] D. Rehm, A. Weller, *Isr. J. Chem.* **1970**, *8*, 259.

Received: February 1, 2011

Revised: April 18, 2011

Published online on May 31, 2011

Bibliographie

- [1] A. Le Gall, K. Perronet, D. Dulin, A. Villing, P. Bouyer, K. Visscher, and N. Westbrook. Simultaneous calibration of optical tweezers spring constant and position detector response. Optics Express, 18(25) :26469–26474, 2010. (pages 2, 43, 50, 131 et 149)
- [2] A. Le Gall, D. Dulin, G. Clavier, R. Méallet-Renault, P. Bouyer, K. Perronet, N. Westbrook, G. Clavier, R. Méallet-Renault, P. Bouyer, K. Perronet, and N. Westbrook. Improved photon yield from a green dye with a reducing and oxidizing system. ChemPhysChem, 12(9) :1657–1660, June 2011. (pages 2, 79, 134 et 149)
- [3] K. C. Neuman and A. Nagy. Single-molecule force spectroscopy : optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. Nature Methods, 5(6) :491–505, 2008. (pages 6 et 7)
- [4] N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. Nature, 468 :72–76, 2003. (page 7)
- [5] A. Engel and H. E. Gaub. Structure and mechanics of membrane proteins. Annu. Rev. Biochem., 77 :127–148, 2008. (page 7)
- [6] A. Revyakin, C. Liu, R. H. Ebright, and T. R. Strick. Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. Science, 314 :1139–1143, 2006. (page 8)
- [7] G. Charvin, T. R. Strick, D. Bensimon, and V. Croquette. Tracking topoisomerase activity at the single-molecule level. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 34 :201–219, 2005. (page 8)
- [8] T. R. Strick, D. Bensimon, and V. Croquette. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. Nature, 404 :901–904, 2000. (page 8)
- [9] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. Science, 271 :1835–1837, 1996. (page 8)
- [10] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. Behavior of supercoiled DNA. Biophys. J., 74 :2016–2028, 1998. (page 8)
- [11] J. W. Shaevitz, E. A. Abbondanzieri, R. Landick, and S. M. Block. Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. Nature, 426 :684–687, 2003. (pages 8, 9 et 27)
- [12] U. Bockelmann. Single-molecule manipulation of nucleic acids. Current Opinion in Structural Biology, 14 :368–373, 2004. (page 9)
- [13] U. Bockelmann, P. Thomen, B. Essevaz-Roulet, V. Viasnoff, and F. Heslot. Unzipping DNA with Optical Tweezers : High Sequence Sensitivity and Force Flips. Biophys. J., 82 :1537–1553, 2002. (pages 9 et 27)
- [14] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. Stretching DNA with Optical Tweezers. Biophysical Journal, 72 :1335–1346, 1997. (pages 9, 54, 55, 56 et 60)

- [15] Y. Seol, G. M. Skinner, and K. Visscher. Stretching of Homopolymeric RNA Reveals Single-Stranded Helices and Base-Stracking. Phys. Rev. Lett., 98 :158103, 2007. (page 9)
- [16] Y. Seol, G. M. Skinner, and K. Visscher. Elastic Properties of a Single-Stranded Charged Homopolymeric Ribonucleotide. Phys. Rev. Lett., 93(11) :118102, 2004. (page 9)
- [17] B. Onoa and I. Tinoco. RNA folding and unfolding. Current opinion in structural biology, 14(3) :374–379, June 2004. (pages 9 et 27)
- [18] J. Liphardt, B. Onoa, S. B. Smith, I. T. Jr., C. Bustamante, I. Tinoco, and C. Bustamante. Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force. Science, 292(5517) :733–737, April 2001. (pages 9 et 27)
- [19] K. H. White, M. Orzechowski, D. Fourmy, and K. Visscher. Mechanical unfolding of the beet Western yellow virus -1 frameshift signal. Journal of the American Chemical Society, 133 :9775–9782, 2011. (pages 9 et 27)
- [20] L. Green, C. H. Kim, C. Bustamante, and I. Tinoco. Characterization of the Mechanical Unfolding of RNA Pseudoknots. Journal of Molecular Biology, 375(2) :511–528, January 2008. (pages 9, 20, 21 et 22)
- [21] K. Visscher, M. J. Schnitzer, and S. M. Block. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. Nature, 400(6740) :184–9, July 1999. (page 9)
- [22] M. D. Wang, M. K. Schnitzer, R. L. H. Yin, J. Gelles, and S. M. Block. Force and Velocity Measured for Single Molecules of RNA Polymerase. Science, 282(5390) :902–907, 1998. (pages 9 et 27)
- [23] Y. R. Chemla. Revealing the base pair stepping dynamics of nucleic acid motor proteins with optical traps. Physical chemistry chemical physics : PCCP, 12(13) :3080–95, April 2010. (page 9)
- [24] S. Uemura, M. Dorywalska, T.-H. Lee, H. D. Kim, J. D. Puglisi, and S. Chu. Peptide bond formation destabilizes Shine-Dalgarno interaction on the ribosome. Nature, 446 :454, 2007. (pages 9, 21 et 27)
- [25] J.-D. Wen, L. Lancaster, C. Hodges, A.-C. Zeri, S. H. Yoshimura, H. F. Noller, C. Bustamante, and I. T. Jr. Following translation by single ribosomes one codon at a time. Nature, 452 :598–603, 2008. (pages 9, 21, 25 et 27)
- [26] X. Qu, J.-D. J.-D. Wen, L. Lancaster, H. F. Noller, C. Bustamante, and I. Tinoco. The ribosome uses two active mechanisms to unwind messenger RNA during translation. Nature, 475(7354) :118–121, July 2011. (pages 9, 21, 25 et 27)
- [27] C. Y. Liu, M. T. Qureshi, and T. H. Lee. Interaction strengths between the ribosome and tRNA at various steps of translocation. Biophys. J., 100 :2201–2208, 2011. (pages 9, 21 et 27)
- [28] A. Katranadis, W. Grange, R. Schlesinger, T. Choli-Papadopoulou, D. Bruggemann, M. Hegner, and G. Buldt. Force measurements of the disruption of the nascent polypeptide chain from the ribosome by optical tweezers. Federation of European Biochemical Societies, 585 :1859–1863, 2011. (pages 9, 21 et 27)
- [29] E. J. G. Peterman, F. Gittes, and C. F. Schmidt. Laser-Induced Heating in Optical Traps. Biophys. J., 84 :1308–1316, 2003. (pages 10 et 33)

BIBLIOGRAPHIE

- [30] Y. Liu, D. K. Cheng, G. J. Sonek, M. W. Berns, C. F. Chapman, and B. J. Tromberg. Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers. *Biophys. J.*, 68 :2137–2144, 1995. (pages 10 et 33)
- [31] M. P. Landry, P. M. McCall, Z. Qi, and Y. R. Chemla. Characterization of Photoactivated Singlet Oxygen Damage in Single-Molecule Optical Trap Experiments. *Biophys J*, 97(8) :2128–2136, 2009. (pages 10 et 58)
- [32] K. C. Neuman, E. H. Chadd, G. F. Liou, K. Bergman, and S. M. Block. Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps. *Biophys J*, 77 :2856–2863, 1999. (page 10)
- [33] D. M. Warshaw, E. Hayes, D. Gaffney, A. M. Lauzon, J. Wu, G. Kennedy, K. Trybus, S. Lowey, and C. Berger. Myosin conformational states determined by single fluorophore polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(14) :8034–8039, July 1998. (page 10)
- [34] V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, and S. W. Hell. Video-Rate Far-Field Optical Nanoscopy Dissects Synaptic Vesicle Movement. *Science*, 320(5873) :246–249, April 2008. (page 11)
- [35] U. V. Nägerl, K. I. Willig, B. Hein, S. W. Hell, and T. Bonhoeffer. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48) :18982–7, December 2008. (page 11)
- [36] J. Hohlbein, K. Gryte, M. Heilemann, and A. N. Kapanidis. Surfing on a new wave of single-molecule fluorescence methods. *Physical biology*, 7(3) :031001, January 2010. (pages 11 et 12)
- [37] F. De Lange, A. Cambi, R. Huijbens, B. De Bakker, W. Rensen, M. Garcia-Parajo, N. Van Hulst, and C. G. Figdor. Cell biology beyond the diffraction limit : near-field scanning optical microscopy. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 23) :4153–4160, 2001. (page 11)
- [38] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, and P. R. Selvin. Myosin V Walks Hand-Over-Hand : Single Fluorophore Imaging with 1.5 nm Localization. *Science*, 300(5628) :2061–2065, 2003. (page 11)
- [39] A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale, and P. R. Selvin. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, 303(5658) :676–678, 2004. (page 11)
- [40] W. E. Moerner and D. P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 74(8) :3597–3619, 2003. (page 12)
- [41] S. Uemura, R. Iizuka, T. Ueno, Y. Shimizu, H. Taguchi, T. Ueda, J. D. Puglisi, and T. Funatsu. Single-molecule imaging of full protein synthesis by immobilized ribosomes. *Nucleic Acids Research*, 2008. (pages 12, 108 et 118)
- [42] A. Katranidis, D. Atta, R. Schlesinger, K. H. Nierhaus, T. Choli-Papadopoulou, I. Gregor, M. Gerrits, G. Büldt, and J. Fitter. Fast Biosynthesis of GFP Molecules : A Single-Molecule Fluorescence Study. *Angewandte Chemie*, 48 :1758–1762, 2009. (pages 12, 108, 109, 110, 114 et 118)
- [43] J. E. Shaw, J. Oreopoulos, D. Wong, J. C. Y. Hsu, and C. M. Yip. Coupling evanescent-wave fluorescence imaging and spectroscopy with scanning probe microscopy : challenges and insights from TIRF-AFM. *Surface and Interface Analysis*, 38(11) :1459–1471, November 2006. (page 12)

- [44] R. Liu, S. Garcia-Manyes, A. Sarkar, C. L. Badilla, and J. M. Fernández. Mechanical characterization of protein L in the low-force regime by electromagnetic tweezers/evanescent nanometry. Biophysical journal, 96(9) :3810–21, May 2009. (page 12)
- [45] A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka, and T. Yanagida. Simultaneous Observation of Individual ATPase and Mechanical Events by a Single Myosin Molecule during Interaction with Actin. Cell, 92(2) :161–171, January 1998. (page 12)
- [46] R. Roy, S. Hohng, and T. Ha. A practical guide to single-molecule FRET. Nature Methods, 5(6) :507–516, June 2008. (page 12)
- [47] T. Ha and P. R. Selvin. The New Era of Biology In Singulo. 2008. (page 12)
- [48] S. C. Blanchard. Single-molecule observations of ribosome function. Current Opinion in Structural Biology, 19 :103–109, 2009. (page 12)
- [49] Y. Wang, H. Qin, R. D. Kudaravalli, S. V. Kirillov, G. T. Dempsey, D. Pan, B. S. Cooperman, and Y. E. Goldman. Single-Molecule Structural Dynamics of EF-G-Ribosome Interaction during Translocation. Biochemistry, 46 :10767–10775, 2007. (page 12)
- [50] D. N. Ermolenko, Z. K. Majumdar, R. P. Hickerson, P. C. Spiegel, R. M. Clegg, and H. F. Noller. Observation of intersubunit movement of the ribosome in solution using FRET. Journal of Molecular Biology, 370 :530–540, 2007. (page 12)
- [51] M. Selmer, C. M. Dunham, F. V. Murphy, A. Weixlbaumer, S. Petry, A. C. Kelley, J. R. Weir, and V. Ramakrishnan. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. Science, 313 :1935–1942, 2006. (pages 15, 19 et 105)
- [52] A. Ben-Shem, L. Jenner, G. Yusupova, and M. Yusupov. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. Science, 330 :1203–1209, 2010. (page 15)
- [53] J. Rabl, M. Leibundgut, S. F. Ataide, A. Haag, and N. Ban. Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 1. Science, 331 :730–736, 2011. (pages 15 et 120)
- [54] V. Ramakrishnan. Ribosome structure and the Mechanism of Translation. Cell, 108 :557–572, 2002. (pages 17, 19 et 105)
- [55] J. Sperschneider and A. Datta. KnotSeeker : heuristic pseudoknot detection in long RNA sequences. RNA (New York, N.Y.), 14(4) :630–40, April 2008. (page 19)
- [56] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, and H. F. Noller. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. Science, 292(5518) :883–896, 2001. (pages 19 et 105)
- [57] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz. The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. Science, 289(5481) :905–920, August 2000. (pages 19 et 105)
- [58] J. Fu, J. B. Munro, S. C. Blanchard, and J. Frank. Cryoelectron microscopy structures of the ribosome complex in intermediate states during tRNA translocation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(12) :4817–21, March 2011. (page 19)
- [59] J. A. Dunkle, L. Wang, M. B. Feldman, A. Pulk, V. B. Chen, G. J. Kapral, J. Noeske, J. S. Richardson, S. C. Blanchard, and J. H. D. Cate. Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding. Science (New York, N.Y.), 332(6032) :981–4, May 2011. (page 19)

BIBLIOGRAPHIE

- [60] A. Weixlbaumer, S. Petry, C. M. Dunham, M. Selmer, A. C. Kelley, and V. Ramakrishnan. Crystal structure of the ribosome recycling factor bound to the ribosome. Nature Structural and Molecular Biology, 14(8) :727–732, 2007. (page 19)
- [61] S. C. Blanchard, H. D. Kim, R. L. G. Jr, J. D. Puglisi, and S. Chu. tRNA dynamics on the ribosome during translation. Proc. Natl. Acad. Sci., 101(35) :12893–12898, 2004. (pages 19 et 106)
- [62] S. C. Blanchard, R. L. G. Jr, H. D. Kim, S. Chu, and J. D. Puglisi. tRNA selection and kinetic proofreading in translation. Nature Structural and Molecular Biology, 11(10) :1008–1014, 2004. (pages 19 et 106)
- [63] R. A. Marshall, M. Dorywalska, and J. D. Puglisi. Irreversible chemical steps control intersubunit dynamics during translation. Proc. Natl. Acad. Sci., 105(40) :15364–15369, 2008. (pages 19 et 106)
- [64] T.-H. Lee, S. C. Blanchard, H. D. Kim, J. D. Puglisi, and S. Chu. The role of fluctuations in tRNA selection by the ribosome. Proc. Natl. Acad. Sci., 104(34) :13661–13665, 2007. (pages 19 et 106)
- [65] R. L. Gonzalez Jr, S. Chu, and J. D. Puglisi. Thiostrepton inhibition of tRNA delivery to the ribosome. RNA, 13 :1–7, 2007. (pages 19 et 106)
- [66] R. A. Marshall, C. E. Aitken, and J. D. Puglisi. GTP hydrolysis by IF2 Guides Progression of the Ribosome into Elongation. Molecular Cell, 35 :37–47, 2009. (pages 19 et 106)
- [67] P. V. Cornish, D. N. Ermolenko, D. W. Staple, L. Hoang, R. P. Hickerson, H. F. Noller, and T. Ha. Following movement of the L1 stalk between three functional states in single ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci., 2009. (pages 19 et 106)
- [68] F. Vanzi, Y. Takagi, H. Shuman, B. S. Cooperman, and Y. E. Goldman. Mechanical Studies of Single Ribosome/mRNA Complexes. Biophys. J., 89 :1909–1919, 2005. (pages 19 et 106)
- [69] P. V. Cornish, D. N. Ermolenko, H. F. Noller, and T. Ha. Spontaneous Intersubunit Rotation in Single Ribosomes. Molecular Cell, 30 :578–588, 2008. (pages 19 et 106)
- [70] C. E. Aitken and J. D. Puglisi. Following the intersubunit conformation of the ribosome during translation in real time. Nature structural and molecular biology, 17(7) :793–800, July 2010. (pages 19, 23 et 24)
- [71] P. C. Whitford, P. Geggier, R. B. Altman, S. C. Blanchard, J. N. Onuchic, and K. Y. Sanbonmatsu. Accommodation of aminoacyl-tRNA into the ribosome involves reversible excursions along multiple pathways. RNA (New York, N.Y.), 16(6) :1196–204, June 2010. (page 19)
- [72] J. B. Munro, M. R. Wasserman, R. B. Altman, L. Wang, and S. C. Blanchard. Correlated conformational events in EF-G and the ribosome regulate translocation. Nature structural and molecular biology, 17(12) :1470–7, December 2010. (page 19)
- [73] J. B. Munro, R. B. Altman, C.-S. Tung, J. H. D. Cate, K. Y. Sanbonmatsu, and S. C. Blanchard. Spontaneous formation of the unlocked state of the ribosome is a multistep process. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(2) :709–14, January 2010. (page 19)

- [74] S. Uemura, C. E. Aitken, J. Korlach, B. A. Flusberg, S. W. Turner, and J. D. Puglisi. Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature*, 464 :1012–1018, 2010. (pages 19, 106 et 108)
- [75] S. Uemura, C. E. Aitken, J. Korlach, B. A. Flusberg, S. W. Turner, and J. D. Puglisi. Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature*, 464(7291) :1012–7, April 2010. (page 19)
- [76] C. E. Aitken, A. Petrov, and J. D. Puglisi. Single ribosome dynamics and the mechanism of translation. *Annual review of biophysics*, 39(February) :491–513, June 2010. (page 19)
- [77] M. E. Altuntop, C. T. Ly, and Y. Wang. Single-molecule study of ribosome hierarchic dynamics at the peptidyl transferase center. *Biophysical journal*, 99(9) :3002–9, November 2010. (page 19)
- [78] D. N. Ermolenko and H. F. Noller. mRNA translocation occurs during the second step of ribosomal intersubunit rotation. *Nature structural and molecular biology*, 18(4) :457–62, April 2011. (page 19)
- [79] J. D. Lopinski, J. D. Dinman, and J. A. Bruenn. Kinetics of Ribosomal Pausing during Programmed -1 Translational Frameshifting. *Molecular and cellular biology*, 20(4) :1095–1103, 2000. (pages 20 et 105)
- [80] P. Somogyi, A. J. Jenner, I. Brierley, and S. C. Inglis. Ribosomal Pausing during Translation of an RNA Pseudoknot. *Molecular and cellular biology*, 13(11) :6931–6940, 1993. (pages 20 et 105)
- [81] H. Kontos, S. Naphthine, and I. A. N. Brierley. Ribosomal Pausing at a Frameshifter RNA Pseudoknot Is Sensitive to Reading Phase but Shows Little Correlation with Frameshift Efficiency. *Molecular and cellular biology*, 21(24) :8657–8670, 2001. (page 20)
- [82] T. M. Hansen, S. N. S. Reihani, L. Oddershede, and M. A. Sorensen. Correlation between mechanical strength of messenger RNA pseudoknots and ribosomal frameshifting. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(14) :5830–5835, 2007. (pages 20, 21, 22, 23, 27 et 104)
- [83] G. Chen, K.-Y. Chang, M.-Y. Chou, C. Bustamante, and I. Tinoco. Triplex structures in an RNA pseudoknot enhance mechanical stability and increase efficiency of -1 ribosomal frameshifting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31) :12706–12711, 2009. (pages 20, 21, 22 et 27)
- [84] M.-H. Mazauric, Y. Seol, S. Yoshizawa, K. Visscher, and D. Fourmy. Interaction of the HIV-1 frameshift signal with the ribosome. *Nucleic acids research*, 37(22) :7654–64, December 2009. (page 20)
- [85] R. A. Marshall, C. E. Aitken, M. Dorywalska, and J. D. Puglisi. Translation at the Single-Molecule Level. *Annual Review of Biochemistry*, 77 :177–203, 2008. (page 20)
- [86] A. Petrov and J. D. Puglisi. Site-specific labeling of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes for single-molecule manipulations. *Nucleic Acids Research*, 38(13). (pages 21, 124, 128 et 129)
- [87] P. Mangeol, D. Côte, T. Bizebard, O. Legrand, and U. Bockelmann. Probing DNA and RNA single molecules with a double optical tweezer. *Eur. Phys. J. E*, 19 :311–317, 2006. (pages 21, 27 et 54)
- [88] W. J. Greenleaf, K. L. Frieda, D. A. N. Foster, M. T. Woodside, and S. M. Block. Direct Observation of Hierarchical Folding in Single Riboswitch Aptamers. *Science*, 319 :630–633, 2008. (page 27)

BIBLIOGRAPHIE

- [89] S. Harlepp, T. Marchal, J. Robert, J.-F. Léger, A. Xayaphoummine, H. Isambert, and D. Chatenay. Probing complex RNA structures by mechanical force. Eur. Phys. J. E, 12 :605–615, 2003. (page 27)
- [90] K. Svoboda and S. M. Block. Biological applications of optical forces. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 23 :247, 1994. (pages 27, 31 et 33)
- [91] A. Ashkin. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. Phys. Rev. Lett., 24(4) :156–159, 1970. (page 27)
- [92] A. Ashkin. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. Biophys. J., 61 :569–582, 1992. (pages 28, 30 et 34)
- [93] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. Optics Letters, 11(5) :288–290, 1986. (page 28)
- [94] A. Rohrbach and E. H. K. Stelzer. Optical trapping of dielectric particles in arbitrary fields. J. Opt. Soc. Am. A, 18(4) :839–853, 2001. (page 28)
- [95] W. H. Wright and G. J. Sonek. Theoretical study of optically induced forces on spherical particles in a single beam trap II : Mie scatterers. Applied Physics Letter, 63(6) :715–717, 1993. (page 32)
- [96] E. Füllman and O. Axner. Influence of a glass-water interface on the on-axis trapping of micrometer-sized spherical objects by optical tweezers. Applied Optics, 42 :3915–3926, 2003. (page 34)
- [97] A. Samadi and N. Reihani. Optimal beam diameter for optical tweezers. Optics Letters, 35(10) :1494–1496, 2010. (page 34)
- [98] M. Mahamdeh, C. P. Campos, and E. Schäffer. Under-filling trapping objectives optimizes the use of the available laser power in optical tweezers. Optics Express, 19(12) :11759–11768, 2011. (page 34)
- [99] M. T. Valentine, N. R. Gydosh, B. Gutierrez-Medina, A. N. Fehr, J. O. Andreasson, and S. M. Block. Precision steering of an optical trap by electro-optic deflection. Optics Letters, 33(6) :599–601, 2008. (page 36)
- [100] K. C. Neuman and S. M. Block. Optical trapping. Review of Scientific Instruments, 75(9) :2787–2809, 2004. (pages 36 et 49)
- [101] S. F. Tolic-Norrelykke, E. Schaffer, J. Howard, F. S. Pavone, F. Julicher, and H. Flyvbjerg. Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane. Rev. Scient. Inst., 77 :103101, 2006. (pages 39 et 50)
- [102] F. Gittes and C. F. Schmidt. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. Opt. Lett., 23(1) :7–9, 1999. (pages 39 et 47)
- [103] M. W. Allersma, F. Gittes, M. J. DeCastro, R. J. Stewart, and C. F. Schmidt. Two-Dimensional Tracking of ncd Motility by Back Focal Plane Interferometry. Biophys. J., 74 :1074–1085, 1998. (pages 39, 41, 42, 48 et 51)
- [104] K. Berg-Sorensen, L. Oddershede, E.-L. Florin, and H. Flyvbjerg. Unintended filtering in a typical photodiode detection system for optical tweezers. Journal of Applied Physics, 93(6) :3167–3176, 2003. (pages 43 et 50)
- [105] K. Berg-Sorensen and H. Flyvbjerg. Power spectrum analysis for optical tweezers. Rev. Scient. Inst., 75(3) :594–612, 2004. (pages 46 et 51)

- [106] K. C. Neuman, E. A. Abbondanzieri, and S. M. Block. Measurement of the effective focal shift in an optical trap. *Opt. Lett.*, 30(11) :1318–1320, 2005. (page 49)
- [107] M. J. Lang, C. L. Asbury, J. W. Shaevitz, and S. M. Block. An Automated Two-Dimensional Optical Force Clamp for Single Molecule Studies. *Biophys. J.*, 83 :491–501, 2002. (page 49)
- [108] K. Visscher, S. P. Gross, and S. M. Block. Construction of Multiple-Beam Optical Traps with Nanometer-Resolution Position Sensing. *IEEE J.Select. Topics Quant. Electr.*, 2(4) :1066–1076, 1996. (page 50)
- [109] I. M. Tolic-Norrelykke, K. Berg-Sorensen, and H. Flyvbjerg. MatLab program for precision calibration of optical tweezers. *Computer Physics Communications*, 159 :225–240, 2004. (page 51)
- [110] C. Bouchiat, M.-D. D. Wang, J.-F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, and V. Croquette. Estimating the Persistence Length of a Worm-Like Chain Molecule from Force-Extension Measurements. *Biophys. J.*, 76(1 Pt 1) :409–413, January 1999. (page 54)
- [111] J. R. Wenner, M. C. Williams, I. Rouzina, and V. A. Bloomfield. Salt Dependence of the Elasticity and Overstretching Transition of Single DNA Molecules. *Biophysical Journal*, 82 :3160–3169, 2002. (page 54)
- [112] S. Geggier, A. Kotlyar, and A. Vologodskii. Temperature dependance of DNA persistence length. *Nucleic Acids Research*, 39(4) :1419–1426, 2011. (page 54)
- [113] T. T. Perkins, D. E. Smith, R. G. Larson, and S. Chu. Stretching of a Single Tethered Polymer in a Uniform Flow. *Science*, 268 :83–87, 1995. (page 55)
- [114] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258(5085) :1122–1126, 1992. (page 55)
- [115] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith. Entropic elasticity of A-phage DNA. *Science*, 265 :1599–1600, 1994. (page 55)
- [116] J. F. Marko and E. Siggia. Stretching DNA. *Macromolecules*, 28(26) :8759–8770, 1999. (page 56)
- [117] D. Axelrod. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology. *Traffic*, 2 :764–774, 2001. (page 64)
- [118] F. Enrichi, E. Trave, and M. Bersani. Acid Synthesis of Luminescent Amine-functionalized or Erbium-doped Silica Spheres for Biological Applications. *Journal of Fluorescence*, 18 :507–511, 2008. (page 72)
- [119] C. Hesch, J. Hesse, J. Jacak, and G. J. Schütz. Two-stage focus-hold system for rapid ultra-sensitive read-out of large-area biochips. *Journal of microscopy*, 234(3) :251–254, June 2009. (page 75)
- [120] J. Hesse, M. Sonnleitner, A. Sonnleitner, G. Freudenthaler, J. Jacak, O. Höglinger, H. Schindler, Schü, and G. J. Tz. Single-molecule reader for high-throughput bioanalysis. *Anal. Chem.*, 76(19) :5960–5964, 2004. (page 75)
- [121] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, and P. Tinnefeld. A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes. *Angewandte Chemie*, 47 :5465–5469, 2008. (pages 79, 81, 83, 85 et 134)

BIBLIOGRAPHIE

- [122] J. Vogelsang, T. Cordes, C. Forthmann, C. Steinhauer, and P. Tinnefeld. Controlling the fluorescence of ordinary oxazine dyes for single-molecule switching and superresolution microscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(20) :8107–8112, 2009. (pages 79 et 93)
- [123] J. Vogelsang, C. Steinhauer, C. Forthmann, I. H. Stein, B. Person-Skegro, T. Cordes, and P. Tinnefeld. Make them Blink : Probes for Super-Resolution Microscopy. ChemPhysChem, 11 :2475–2490, 2010. (pages 79 et 93)
- [124] D. J. Crawford, A. A. Hoskins, L. J. Friedman, J. Gelles, and M. J. Moore. Visualizing the splicing of single pre-mRNA molecules in whole cell extract. RNA (New York, N.Y.), 14(1) :170–9, January 2008. (pages 82, 119 et 139)
- [125] C. E. Aitken, R. A. Marshall, and J. D. Puglisi. An Oxygen Scavenging System for Improvement of Dye Stability in Single-Molecule Fluorescence Experiments. Biophys. J., 94 :1826–1835, 2008. (pages 82 et 83)
- [126] R. Dave, D. S. Terry, J. B. Munro, and S. C. Blanchard. Mitigating Unwanted Photophysical Processes for Improved Single-Molecule Fluorescence Imaging. Biophys. J., 96 :2371–2381, 2009. (page 83)
- [127] I. Rasnik, S. A. McKinney, and T. Ha. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. Nature Methods, 2006. (page 83)
- [128] D. Rehm and A. Weller. Kinetics of fluorescence quenching by electron and H-atom transfer. Isr. J. Chem., 8 :259, 1970. (page 84)
- [129] M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base. Analytical Sciences, The Japan Society for Analytical Chemistry, 17 :155–160, 2001. (pages 85 et 88)
- [130] R. Y. Lai and A. J. Bard. Electrogenerated Chemiluminescence 71. Photophysical, Electrochemical, and Electrogenerated Chemiluminescent Properties of Selected Dipyrromethene-BF₂ Dyes. Journal of Physical Chemistry B, 107 :5036–5042, 2003. (page 85)
- [131] M. A. Miranda, F. Galindo, A. M. Amat, and A. Arques. Pyrylium salt-photosensitised degradation of phenolic contaminants present in olive oil wastewaters with solar light Part II. Benzoic acid derivatives. Applied Catalysis B : Environmental, 30 :437–444, 2001. (page 87)
- [132] C. A. M. Seidel, A. Schultz, and M. H. M. Sauer. Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies. Journal of Physical Chemistry, 100 :5541–5553, 1996. (page 88)
- [133] A. L. Mattheyses, K. Shaw, and D. Axelrod. Effective elimination of laser interference fringing in fluorescence microscopy by spinning azimuthal incidence angle. Microscopy Research and Technique, 69 :642–647, 2006. (page 96)
- [134] R. Fiolka, Y. Belyaev, H. Ewers, and A. Stemmer. Even illumination in total internal reflection fluorescence microscopy using laser light. Microscopy Research and Technique, 71 :45–50, 2008. (page 96)
- [135] A. B. Nepomnyashchii, M. Boring, J. Ahrens, and A. J. Bard. Synthesis, Photophysical, Electrochemical, and Electrogenerated Chemiluminescence Studies. Multiple Sequential

- Electron Transfers in BODIPY Monomers, Dimers, Trimers, and Polymer. Journal of American Chemical Society, 133 :8633–8645, 2011. (pages 98 et 99)
- [136] S. Doose, H. Neuweiler, and M. Sauer. Fluorescence Quenching by Photoinduced Electron Transfer : A Reporter for Conformational Dynamics of Macromolecules. ChemPhysChem, 10 :1389–1398, 2009. (pages 98 et 99)
- [137] H. Chen, S. S. Ahsan, M. B. Santiago-Berrios, H. D. Abruna, and W. W. Webb. Mechanisms of Quenching of Alexa Fluorophores by Natural Amino Acids. Journal of American Chemical Society, 132 :7244–7245, 2010. (pages 98 et 99)
- [138] J. Suomi, T. Ylinen, M. Hakansson, M. Helin, Q. Jiang, T. Ala-Kleme, and S. Kulmala. Hot electron-induced electrochemiluminescence of fluorescein in aqueous solution. Journal of Electroanalytical Chemistry, 586 :49–55, 2006. (pages 98 et 99)
- [139] D. P. Giedroc, C. A. Theimer, and P. Nixon. Structure, Stability and Function of RNA Pseudoknots Involved in Stimulating Ribosomal Frameshifting. Journal of Molecular Biology, 298 :167–185, 2000. (page 104)
- [140] N. Soler, D. Fourmy, and S. Yoshizawa. Structural insight into a molecular switch in tandem winged-helix motifs from elongation factor SELB. Journal of Molecular Biology, 370 :728–741, 2007. (page 105)
- [141] D. P. Giedroc and P. V. Cornish. Frameshifting RNA Pseudoknots : Structure and Mechanism. Virus Res., 129(2) :193–208, 2009. (page 105)
- [142] Y. Shimizu, T. Kanamori, and T. Ueda. Protein synthesis by pure translation systems. Methods, 36 :299–304, 2005. (page 109)
- [143] S. Takahashi, R. Akita, H. Matsuno, H. Furusawa, Y. Shimizu, T. Ueda, and Y. Okahata. 70S ribosomes bind to Shine-Dalgarno sequences without required dissociations. ChemBioChem, 9 :870–873, 2008. (page 112)
- [144] I. Moll, G. Hirokawa, M. C. Kiel, A. Kaji, and U. Blasi. Translation initiation with 70S ribosomes : an alternative pathway for leaderless mRNAs. Nucleic Acid Research, 32(11) :3354–3363, 2004. (page 112)
- [145] J. Yu, J. Xiao, X. Ren, K. Lao, and X. S. Xie. Probing Gene Expression in Live Cells, One Protein Molecule at a Time. Science, 311 :1600–1603, 2006. (page 114)
- [146] V. Chan, D. J. Graves, and S. E. McKenzie. The biophysics of DNA hybridization with immobilized oligonucleotide probes. Biophysical Journal, 69(6) :2243–2255, 1995. (page 114)
- [147] S. Andersson and C. G. Kurland. Elongating ribosomes in vivo are refractory to erythromycin. Biochimie, 69(8) :901–904, 1987. (page 116)
- [148] P. C. Tai, J. Wallace, and B. D. Davis. Selective Action of Erythromycin on Initiating Ribosomes. Biochemistry, 13(22) :4653–4659, 1974. (page 116)
- [149] S. Takyar, R. P. Hickerson, and H. Noller. mRNA Helicase Activity of the Ribosome. Cell, 120 :49–58, 2005. (pages 120, 122 et 123)
- [150] J. E. Wilson, T. V. Pestova, C. U. T. Hellen, and P. Sarnow. Initiation of Protein Synthesis from the A Site of the Ribosome. Cell, 102 :511–520, 2000. (page 121)
- [151] T. V. Pestova, I. B. Lomakin, and C. U. T. Hellen. Position of the CRPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. EMBO reports, 5 :906–913, 2004. (pages 122 et 125)

BIBLIOGRAPHIE

- [152] T. Xia, J. SantaLucia, M. E. Burkard, R. Kierzek, S. J. Schroeder, X. Jiao, C. Cox, and D. H. Turner. Thermodynamic Parameters for an Expanded Nearest-Neighbor Model for Formation of RNA Duplexes with Watson-Crick Base Pairs. Biochemistry, 37 :14719–14735, 1998. (page 123)
- [153] F. Rozen, I. Edery, K. Meerovitch, T. E. Dever, W. C. Merrick, and N. Sonenberg. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. Molceular cell biology, 10 :1134–1144, 1990. (page 126)

Pince optique et microscopie de fluorescence pour l'étude de la synthèse des protéines en molécule unique.

Résumé : Ce mémoire rapporte deux approches de la synthèse des protéines à l'échelle de la molécule unique. Nous utilisons la microscopie de fluorescence en onde évanescente pour sonder l'activité traductionnelle de deux types de ribosomes. Les premiers, issus d'*E. Coli* (organisme procaryote), sont mutés afin de les marquer d'un nanocristal semi-conducteur (QD). La fin de la traduction, qui correspond au décrochage du ribosome de l'ARNm lorsque celui-ci atteint le codon stop, est alors mise en évidence par la disparition du QD de la surface de l'échantillon. Le deuxième type de ribosome étudié est quant à lui extrait de cellules de lapins (organisme eucaryote) et est dit "sauvage", c'est à dire qu'il n'a pas subi de modification, tandis qu'un oligonucléotide marqué d'un fluorophore est hybridé à l'ARNm. L'activité hélicase du ribosome lui permettant de séparer deux brins complémentaires, l'oligonucléotide et donc le fluorophore disparaissent en même temps que le ribosome parcourt l'ARNm, permettant ainsi de sonder l'activité du ribosome. Nous donnons pour ces deux types de ribosomes une vitesse moyenne de la traduction dans des milieux contenant les facteurs de la traduction issus d'extraits cellulaires. La deuxième approche de la synthèse des protéines porte sur les propriétés de l'ARNm, support de l'information génétique codant pour la séquence des protéines. Nous avons développé un montage de pince optique permettant de manipuler et caractériser les propriétés mécaniques d'oligonucléotides, ainsi qu'une méthode originale de calibration de ce piège optique. La cohérence de nos mesures sur l'étirement d'un double brin d'ADN avec la littérature nous permettra de poursuivre notre étude sur la mesure des forces nécessaires pour ouvrir une structure secondaire de l'ARNm.

MOTS CLÉS : Ribosome - Procaryote - Eucaryote - Molécule unique - Microscopie de fluorescence - Pince optique - Photoblanchiment

Abstract: We hereby report two approaches of the protein synthesis at the single molecule level. We use total internal reflection fluorescence microscopy to study the translation kinetic of two different types of ribosomes. The first ones, extracted from *E. Coli* (prokaryotic organism), are mutated in order to label them with a quantum dot (QD). The end of translation, which corresponds to the dissociation of the ribosome from the mRNA when the stop codon has been reached, is highlighted by the disappearance of the QD from the surface. The second type of ribosome is extracted from rabbit cells (eukaryotic organism) and has not been modified (wild type), while a labeled oligonucleotide is hybridized on the mRNA. The helicase activity of the ribosome allowing the dissociation of two complementary strands, the oligonucleotide and so the label disappear at the same time while the ribosome moves along the mRNA and thus inform us about its activity. For these two types of ribosomes we measure their average translation speed in cell extracts.

The second approach focuses on the properties of the mRNA, carrying the genetic code for the protein sequence. We developed an optical tweezer setup in order to manipulate and characterize the mechanical properties of nucleotides, as well as an original method to calibrate this optical trap. The consistency of our measurements with the literature on the properties of a double stranded DNA will allow us to study secondary structures of mRNA.

KEYWORDS: Ribosome - Prokaryotic - Eukaryotic - Single molecule - Fluorescence microscopy - Optical tweezers - Photobleaching
