



HAL
open science

Etude et Imagerie de la polymerisation de l'actine

Jean-Alexis Spitz

► **To cite this version:**

Jean-Alexis Spitz. Etude et Imagerie de la polymerisation de l'actine. Autre. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2006. Français. NNT: . tel-00176019

HAL Id: tel-00176019

<https://theses.hal.science/tel-00176019>

Submitted on 2 Oct 2007

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

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

THESE DE DOCTORAT
DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Présentée par

Jean-Alexis SPITZ

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Domaines :
CHIMIE & SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Sujet de la thèse :
ETUDE ET IMAGERIE DE LA POLYMERISATION DE L'ACTINE

Thèse présentée et soutenue à Cachan le Mercredi 8 Novembre 2006 devant un jury composé de

M. Christian AUCLAIR
Mme Maïté COPPEY-MOISAN
Mme Marie-Pierre FONTAINE-AUPART
M. Marc Le MAIRE
M. Hiroshi MASUHARA
Mme Rachel MEALLET-RENAULT

Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Président
Invité
Co-directrice de thèse

*Pour ma première lectrice de toujours
qui n'aura jamais lu une seule de ces lignes*

Ce travail de thèse a été réalisé en cotutelle entre deux laboratoires de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan, le Laboratoire de Biotechnologies et Pharmacologie génétique Appliquées (LBPA – UMR 8113) et le laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (PPSM – UMR 8531). Je tiens donc tout d'abord à remercier leurs deux directeurs, les Professeurs Christian AUCLAIR et Jacques DELAIRE, pour m'avoir donné les moyens de tenter ainsi l'aventure de la pluridisciplinarité.

Je remercie aussi le Professeur Joseph ZYSS, directeur de l'Institut D'Alembert (IdA – IFR 121), pour m'avoir alloué les moyens de conduire ma recherche dans le cadre d'un projet collaboratif soutenu et encouragé par l'Institut.

Christian AUCLAIR, mon directeur de thèse, m'a également permis de travailler dans son équipe et sur sa thématique propre et je tiens à le remercier pour sa confiance, son soutien et son temps précieux qu'il a su m'accorder. Rachel MEALLET-RENAULT, ma co-directrice de thèse, aura été un élément déterminant à différents stades de ce travail. C'est pour travailler avec toi que je suis venu faire ma thèse à Cachan et c'est en partie grâce à toi que je suis parvenu à mener ce projet à bien. Merci pour tout et pour plus encore, en te souhaitant que cette co-direction guide tes pas vers l'Habilitation ...

J'exprime toute ma gratitude à Mesdames Maïté COPPEY-MOISAN et Marie-Pierre FONTAINE-AUPART pour avoir, en qualité de rapporteurs de ce mémoire, examiné mon travail.

Mes remerciements vont ensuite au Professeur Marc LE MAIRE pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie vivement le Professeur Hiroshi MASUHARA qui, après m'avoir accueilli dans son laboratoire de l'Université d'Osaka, me fait l'honneur de venir de si loin pour faire partie de ce jury. J'espère que nous aurons l'occasion de faire fructifier notre collaboration dans le cadre d'un stage postdoctoral.

Je voudrais également remercier Robert PANSU pour sa gentillesse, son enthousiasme et son optimisme à toute épreuve. J'ai tout particulièrement apprécié travailler à tes côtés et dans ton équipe. Je salue également chaleureusement Catherine BARATTI-ELBAZ qui a guidé mes premiers pas dans le monde merveilleux de la « biologie cellulaire du cytosquelette » et dans un laboratoire de culture cellulaire.

Que seraient les sous sols du bâtiment d'Alembert sans le précieux Jean-Jacques VACHON que je remercie pour les heures passées dans le noir à manipuler plus ou moins délicatement laser et Q_A parfois si capricieux. Mes remerciements vont également à Virginie MOLLE, responsable du laboratoire de culture cellulaire ainsi qu'à Valérie POLARD de la société BioAlliance Pharma.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai été amené à travailler avec plusieurs étudiants que je voudrais saluer ici. Tout d'abord Emilie BRUN qui a essuyé avec moi les plâtres de ce projet à son commencement. Je suis heureux que Ryohei YASUKUNI de l'Université d'Osaka soit de retour pour un nouveau séjour d'un an dans nos laboratoires après sa première expérience comme stagiaire de Master à mes côtés. Je remercie également deux étudiants de l'Université TUAT de Tokyo qui ont chacun passé une année dans notre équipe, Minako TAKANO, la deuxième plus grande spécialiste d'Igor que je connaisse (après Robert) et Zenji YATABE. Je salue également ici Ronan LEMOIGNE, docteur depuis quelques mois, avec qui j'ai partagé de nombreuses présentations lors des réunions de l'Institut.

J'ai également eu la chance et la possibilité d'utiliser notre nouveau microscope dans le cadre d'autres projets et d'autres collaborations que je n'ai pas présentés dans ce manuscrit. Je remercie cependant Nelly HENRY et Benoît CARPENTIER de l'Institut Curie d'une part et Edouard OBERT pour ces bons moments passés et ces résultats à venir.

J'ai toujours beaucoup apprécié l'ambiance sympathique de Cachan. Je voudrais revenir ici sur les personnes qui m'ont été les plus proches mais je n'en n'oublie pas pour autant tous les autres. J'ai été ravi d'être, au long de ces années, le voisin de bureau ou de paillasse et de partager de bons moments avec Laurent GALMICHE, Olivier DAVID et Elena ISHOW. J'ai une pensée particulière aussi pour Michel SLIWA qui m'a précédé et conseillé à la fois à Cachan et à Osaka.

Mon séjour au Japon m'a donné la possibilité de faire des rencontres fortes tant sur le plan personnel que sur le plan professionnel. Je tiens à mentionner ici outre YASUKUNI que j'ai retrouvé là bas, Yoichirou HOSOKAWA, Kazuhiko NAKAMURA, Hiroshi YOSHIKAWA, Yu NABETANI et Guillaume LOUIT. Je ne peux pas oublier mon « petit frère » d'adoption, Takuji ADACHI qui est également ma meilleure ressource bibliographique.

Que Mesdames Andrée HUSSON, Suzanne BARREY et Mami KURISU soient remerciées pour leur gentillesse et leur efficacité lorsqu'il s'agit de s'attaquer à tel bon de commande ou tel autre ordre de mission.

Je voudrais maintenant remercier mes amis qui m'ont aidé, au cours de ces dernières années, à conserver ou à retrouver un certain équilibre. Parmi eux, je voudrais citer Caro, Yasmine, Zabou, Armelle, Marianne, Emilie, Julie, Périne, Mickaël, Céline, Clara, Pauline, Agathe, Fabien, Guillaume, Aurélie, Ouardane, Gaëlle, Arielle, Magda, Jessica et tous ceux que je risque d'avoir oubliés (qu'ils m'en excusent par avance).

Je voudrais enfin renouveler mon affection à ma famille. Papa, Tatan Béa, Tali, Benjamin, Ilse et Richard, c'est aussi pour vous et grâce à vous ...

Sommaire général

Introduction	- 1 -
---------------------------	-------

Chapitre 1 : Etude de la polymérisation de l'actine par anisotropie de fluorescence

I- L'ACTINE	- 4 -
1- Généralités	- 5 -
a- Structure et isoformes	- 5 -
b- L'actine G	- 6 -
c- L'actine F	- 7 -
2- La polymérisation de l'actine.....	- 8 -
a- <i>In vitro</i>	- 8 -
b- <i>In vivo</i>	- 11 -
3- Le cytosquelette d'actine	- 12 -
4- Actine et oncogenèse	- 14 -
5- Les techniques de mesure de la polymérisation de l'actine	- 15 -
II- L'ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE	- 17 -
1- Définition	- 17 -
2- Théorie	- 18 -
a- Cas d'une molécule unique.....	- 18 -
b- Effet de la photosélection.....	- 19 -
c- Effet de la non-colinéarité des moments de transition.....	- 21 -
d- Effet de la diffusion rotationnelle	- 21 -
e- Effet du transfert d'énergie	- 22 -
3- Mesure expérimentale.....	- 24 -
a- Dispositif expérimental.....	- 24 -
b- Mise en évidence de l'anisotropie sur les déclin.....	- 25 -
4- Actine et anisotropie	- 27 -
a- Fluorescence intrinsèque de l'actine	- 27 -
b- Les marqueurs fluorescents.....	- 27 -
c- L'Alexa488	- 29 -
d- L'actine-Alexa488	- 31 -
III – LE TEST	- 35 -
1- Description.....	- 35 -
a- « Cahier des charges »	- 35 -
b- Mise en œuvre.....	- 35 -
c- Exploitation.....	- 37 -
2- Validations du test.....	- 37 -
a- Imagerie des filaments formés.....	- 37 -
b- Pas de séquestration du chromophore.....	- 39 -
c- Validation expérimentale : influence de la présence de cations.....	- 40 -
d- Autres validations	- 41 -
Références	- 45 -

Matériel et méthodes – Chapitre 1

Matériel	- 52 -
Spectroscopie stationnaire	- 52 -
Spectroscopie résolue en temps en cuve.....	- 53 -
Tampons.....	- 55 -
Méthodes	- 57 -
Détermination du rendement quantique de fluorescence.....	- 57 -
Culture cellulaire.....	- 57 -
Préparation des extraits cellulaires.....	- 58 -
Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	- 58 -
Mise en œuvre du test de polymérisation	- 59 -
Imagerie de filaments d’actine polymérisés <i>in vitro</i>	- 60 -
Marquage des filaments d’actine de cellules fixées.....	- 61 -
Références	- 63 -
Article	- 64 -
Annexe I : Séquence peptidique de l’actine.....	- 65 -

Chapitre 2 : Imagerie de polymères d’actine par anisotropie de fluorescence

PARTIE I – LE FLIM	- 70 -
I - Les différentes techniques de FLIM.....	- 70 -
1 - Les sources.	- 70 -
a- Les lasers titane-saphir.....	- 70 -
b- Autres sources pulsées	- 71 -
c- Sources modulables	- 71 -
2 – L’éclairage	- 71 -
a- Imagerie confocale.....	- 71 -
b- Imagerie plein-champ	- 72 -
3 – La détection.....	- 73 -
a- Le FLIM impulsionnel.....	- 73 -
b- Le FLIM de phase.....	- 75 -
II – Nos choix techniques	- 77 -
1- Présentation et justification du système.....	- 77 -
2- Le Q_A	- 78 -
III - Caractérisation du système	- 80 -
1- La mesure de la durée de vie.....	- 80 -
a- Correction de la mesure de durée de vie.....	- 80 -
b- Dispersion de la durée de vie.....	- 81 -
c- Résolution temporelle.....	- 83 -
d- Utilisation des différents objectifs	- 84 -
2- La mesure de l’intensité.....	- 85 -
a- Correction du gain.....	- 85 -
b- Saturation du détecteur	- 86 -

c- Temps mort.....	- 87 -
3- La résolution spatiale.....	- 88 -
a- Détermination de la résolution.....	- 88 -
b- Echelle.....	- 90 -
PARTIE II – Le trFAIM.....	- 92 -
I – Les différentes techniques.....	- 92 -
II – Nos choix techniques.....	- 93 -
1- Le système.....	- 93 -
2- Caractérisation.....	- 96 -
3- Imagerie de l’anisotropie stationnaire.....	- 99 -
III – Résultats.....	- 100 -
1- Images et calculs de la relaxation de l’anisotropie de fluorescence de polymères d’actine <i>in vitro</i>	- 100 -
2- Imagerie de l’anisotropie stationnaire pixel par pixel.....	- 104 -
IV – Perspectives.....	- 106 -
Références.....	- 108 -

Matériel et méthodes – Chapitre 2

Echantillons références.....	- 111 -
Immobilisation de nano billes fluorescentes dans des films de PVA.....	- 111 -
Polymères d’actine purifiée.....	- 112 -
Montage d’imagerie de l’anisotropie sous microscope au Q _A	- 113 -
Traitement des données.....	- 115 -
Superposition des images.....	- 115 -
Détermination de la fonction d’appareil.....	- 115 -

Références.....	- 117 -
------------------------	----------------

Article.....	- 118 -
---------------------	----------------

Annexe II : Principe de fonctionnement des détecteurs à galettes de microcanaux.....	- 119 -
---	----------------

Annexe III : Principe de fonctionnement d’une caméra CCD.....	- 121 -
--	----------------

Chapitre 3 : Imagerie de la polymérisation de l’actine *in vivo* après coupure par laser femtoseconde.

I – Application des lasers aux cellules.....	- 124 -
1- Historique.....	- 124 -
2- Applications actuelles des lasers femtosecondes.....	- 125 -
3- Effet des ondes de choc sur des cellules.....	- 126 -
II – Utilisation de protéines fluorescentes.....	- 128 -
1- La GFP, origine, structure, variantes.....	- 128 -
2- Utilisation.....	- 130 -

III – Résultats.....	- 132 -
1- Reformation d'une fibre de stress.....	- 132 -
2- Reformation d'un réseau à deux dimensions.....	- 134 -
3- Restructuration du cytosquelette après une onde de choc.....	- 135 -

Références.....	- 138 -
------------------------	----------------

Matériel et méthodes – Chapitre 3

Culture cellulaire.....	- 142 -
Transfection du plasmide pEGFP-actine.....	- 142 -
Présentation du système.....	- 142 -
Coupure par ablation directe.....	- 144 -
Génération d'une onde de choc.....	- 145 -

Article.....	- 146 -
---------------------	----------------

Conclusion.....	- 147 -
------------------------	----------------

A l'heure où l'éventail des connaissances n'a jamais été aussi large, celles-ci n'ont également jamais été aussi spécialisées. Cependant, il est souvent utile de mettre en relation différents secteurs disciplinaires afin de permettre de développer, en synergie, l'objet d'étude et de nouvelles techniques d'investigation. La principale ambition de ce travail est d'être essentiellement pluridisciplinaire. De fait, il s'agit d'un travail en cotutelle entre deux laboratoires de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan et se situe à l'interface entre la biologie et la photochimie.

L'objet de l'étude est le cytosquelette d'actine. Cet arrangement polymère dynamique est très impliqué à la fois dans la morphologie cellulaire mais aussi dans les phénomènes d'adhérence et de motilité cellulaires. La perturbation de cette dynamique et des fonctions qui lui sont associées est caractéristique de la transformation tumorale, ce qui fait de l'actine une cible pharmacologique anti-cancéreuse.

L'approche de cette problématique nécessite l'élaboration de techniques et d'instruments pour permettre son étude, puis son imagerie. Ces techniques s'appuient sur les savoir-faire de photochimie et d'imagerie présents au laboratoire et s'inscrivent dans un cadre plus large de développement instrumental.

La thématique générale de ce manuscrit est donc l'étude et l'imagerie de la polymérisation de l'actine. Nous avons choisi de le structurer en trois chapitres assez indépendants les uns des autres. Dans un souci de clarté et de pédagogie, chacun des chapitres est organisé avec sa propre introduction, afin d'amener directement les concepts et les connaissances théoriques lorsqu'elles sont nécessaires. Puis nous présentons l'avancement des travaux réalisés ainsi qu'une partie expérimentale. Enfin, nous avons joint, à chacun des chapitres, un article soumis pour publication dans une revue internationale.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré au développement et à la validation théorique et expérimentale d'un test de mesure de la polymérisation *in vitro* de l'actine à partir d'extraits cellulaires. La polymérisation de l'actine est suivie grâce à l'augmentation de

l'anisotropie de fluorescence d'un marqueur fluorescent, l'Alexa488, utilisé comme traceur dans les échantillons.

Le deuxième chapitre présente le montage et la caractérisation d'un nouveau système d'imagerie de la durée de vie de fluorescence (FLIM¹) sous microscope par comptage monophotonique ainsi qu'un développement de cet instrument pour faire l'imagerie de l'anisotropie de fluorescence résolu dans le temps (trFAIM²). Cet instrument, qui nous a déjà permis de faire l'imagerie de polymères d'actine, ouvre également des perspectives pour de nombreuses autres applications à la fois dans l'imagerie cellulaire (polymérisation de l'actine *in vivo*, calcium intracellulaire³, ...) mais également dans d'autres thématiques développées au PPSM (cristaux organiques fluorescents, nanolatex, ...).

Enfin, le troisième chapitre propose une technologie originale pour faire l'étude *in vivo* de la polymérisation de l'actine mettant en œuvre une instrumentation de pointe issue de la physique appliquée des lasers. L'emploi d'un laser femtoseconde permet la nano-dissection, dans une cellule vivante, d'une fibre de stress d'actine dont on peut ensuite étudier le rétablissement.

Dans la mesure où ce travail est extrêmement pluridisciplinaire, il a bien évidemment bénéficié des compétences, du soutien et de l'aide de mes encadrants et collègues. Cependant, je crois qu'il est nécessaire de préciser que ce mémoire ne contient que des travaux⁴ dans lesquels j'ai été personnellement et directement impliqué, aussi bien pour les aspects de développement méthodologique que pour les applications.

¹ Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

² Time resolved Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy

³ Mise en place d'une collaboration au cours de ce travail de thèse avec Nelly Henry de l'Institut Curie

⁴ A l'exception des figures 7, 27 et 29

Chapitre 1 : Etude de la polymérisation de l'actine par anisotropie de fluorescence

I- L'ACTINE	- 4 -
1- Généralités.....	- 5 -
a- Structure et isoformes.....	- 5 -
b- L'actine G.....	- 6 -
c- L'actine F	- 7 -
2- La polymérisation de l'actine.....	- 8 -
a- <i>In vitro</i>	- 8 -
b- <i>In vivo</i>	- 11 -
3- Le cytosquelette d'actine.....	- 12 -
4- Actine et oncogenèse.....	- 14 -
5- Les techniques de mesure de la polymérisation de l'actine	- 15 -
II- L'ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE	- 17 -
1- Définition	- 17 -
2- Théorie	- 18 -
a- Cas d'une molécule unique	- 18 -
b- Effet de la photosélection.....	- 19 -
c- Effet de la non-colinéarité des moments de transition	- 21 -
d- Effet de la diffusion rotationnelle.....	- 21 -
e- Effet du transfert d'énergie	- 22 -
3- Mesure expérimentale	- 24 -
a- Dispositif expérimental	- 24 -
b- Mise en évidence de l'anisotropie sur les déclinés	- 25 -
4- Actine et anisotropie.....	- 27 -
a- Fluorescence intrinsèque de l'actine	- 27 -
b- Les marqueurs fluorescents.....	- 27 -
c- L'Alexa488.....	- 29 -
d- L'actine-Alexa488.....	- 31 -
III – LE TEST	- 35 -
1- Description	- 35 -
a- « Cahier des charges ».....	- 35 -
b- Mise en œuvre	- 35 -
c- Exploitation	- 37 -
2- Validations du test.....	- 37 -
a- Imagerie des filaments formés	- 37 -
b- Pas de séquestration du chromophore.....	- 39 -
c- Validation expérimentale : influence de la présence de cations.....	- 40 -
d- Autres validations.....	- 41 -
Références	- 45 -

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique de la structure cristallographique d'un monomère d'actine.....	- 7 -
Figure 2 : a) Filaments d'actine observés par microscopie électronique en transmission. b) Représentation schématique de l'hélice polarisée d'actine.....	- 8 -
Figure 3 : Schéma théorique de la polymérisation de l'actine.....	- 9 -
Figure 4 : Schéma de polymérisation de l'actine <i>in vitro</i>	- 10 -
Figure 5 : Régulation de la polymérisation de l'actine par des protéines effectrices.....	- 12 -
Figure 6 : Le lamellipode et la migration cellulaire.....	- 13 -
Figure 7 : Images en épifluorescence de cellules fibroblastiques murines normales (NIH3T3) et exprimant un phénotype tumoral (NIH3T3-EF).	- 15 -
Figure 8 : Intensités de l'émission parallèle et perpendiculaire d'une molécule unique.	- 18 -
Figure 9 : Photosélection par une excitation verticale.	- 20 -
Figure 10 : Orientation relative des moments de transition du donneur et de l'accepteur..	- 23 -
Figure 11 : Schéma des différentes polarisations mesurées dans un système en L.....	- 24 -
Figure 12 : Déclins de fluorescence parallèle ($I_{//}$), perpendiculaire (I_{\perp}).....	- 26 -
Figure 13 : Structure de la fluorone ainsi que de deux rhodamines.....	- 28 -
Figure 14 : Spectres d'émission de fluorescence de la famille Alexa.....	- 28 -
Figure 15 : Alexa488.....	- 29 -
Figure 16 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence.....	- 30 -
Figure 17 : Déclin de la fluorescence de l'Alexa488.....	- 30 -
Figure 18 : Marquage de l'actine.....	- 32 -
Figure 19 : Déclin de la fluorescence de l'actine-Alexa488.....	- 32 -
Figure 20 : Relaxation de l'anisotropie de l'actine-Alexa488 en fonction de la viscosité..	- 34 -
Figure 21 : Représentation schématique de la polymérisation de l'actine.....	- 36 -
Figure 22 : Suivi de la polymérisation d'actine purifiée ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$).....	- 36 -
Figure 23 : Phalloïdine.....	- 38 -
Figure 24 : Images en microscopie confocale des échantillons avant et après polymérisation avec marquage à la phalloïdine-Alexa488.....	- 39 -
Figure 25: Relaxation de l'anisotropie de fluorescence defilaments d'actine (issus d'extraits cellulaires ou d'actine purifiée) polymérisés (POL) et dépolymérisés (NON POL).	- 40 -
Figure 26: Influence de la présence des cations divalents.....	- 41 -
Figure 27: Cinétiques de polymérisations d'extraits cellulaires 3T3 (normales).....	- 42 -
Figure 28 : Structure de la Jasplakinolide.....	- 43 -
Figure 29: Effet de la Jasplakinolide (Jaspla) sur la cinétique de polymérisation d'extraits tumoraux.....	- 43 -

I- L'ACTINE

1- Généralités

a- Structure et isoformes

L'actine est l'une des protéines intracellulaires les plus abondantes dans toutes les cellules eucaryotes ainsi que dans certaines cellules procaryotes telles que les cyanobactéries (Labbe *et al.* 1996; Usmanova *et al.* 1998). Elle représente 20% des protéines des cellules musculaires et de 1 à 10% des protéines des tissus non-musculaires. Sa structure primaire est hautement conservée entre les espèces. Ainsi, l'actine de levure est à 90% semblable à la forme humaine (Vandekerckhove *et al.* 1984).

Cette protéine, constituée de 375 acides aminés pour un poids moléculaire de 42 kDaltons¹, est codée par une famille multigénique répartie sur plusieurs chromosomes (1, 2, 3 ainsi que X et Y chez l'Homme) (Alonso 1987). Après traduction, l'actine subit deux modifications, une acétylation de l'extrémité NH₂ (Gaetjens et Barany 1966) ainsi que la méthylation en position 3 d'une histidine (Raghavan *et al.* 1989). Six isoformes de la protéine ont été identifiées chez les mammifères (Herman 1993).

Les trois isoformes α sont spécifiques des cellules des muscles squelettique, cardiaque et lisse. Les deux isoformes β sont rencontrées dans les tissus non-musculaires alors que l'isoforme γ est présente dans les muscles lisses. Les différences structurales entre les isoformes sont essentiellement localisées à l'extrémité NH₂-terminale de la protéine et affectent leur charge nette. L'expression et la régulation de ces isoformes dépendent à la fois du tissu cellulaire et du stade de développement de l'organisme (Minty *et al.* 1982; Paterson et Eldridge 1984; Ordahl 1986). Même si certaines isoformes peuvent être coexprimées par une même cellule, elles sont généralement compartimentalisées dans des structures subcellulaires différentes (Bravo *et al.* 1981; Vandekerckhove *et al.* 1986; Otey *et al.* 1988; Peng et Fischman 1991) et ne peuvent pas échanger leurs fonctionnalités (Chaponnier *et al.* 1995; Kumar *et al.* 1997). Cependant, les différentes classes d'actines humaines polymérisent de la même façon *in vitro* (De La Cruz et Pollard 1994), les polymères obtenus n'ayant que de légères différences structurales (Allen *et al.* 1996). De plus, il a été démontré que de l'actine

¹ (42 kg.mol⁻¹)

squelettique microinjectée dans des fibroblastes pouvait tout à fait s'insérer dans les fibres de stress constituées d'une autre isoforme (McKenna *et al.* 1985a; McKenna *et al.* 1985b).

La propriété fondamentale de l'actine est en effet sa capacité à polymériser et à passer ainsi, de manière réversible, d'une forme monomère que l'on qualifie d'actine globulaire (Actine G) à une forme polymérisée ou filamenteuse (Actine F).

b- L'actine G

Sous sa forme monomère, l'actine se présente sous la forme d'une sphère de 5 nm de diamètre (Norman *et al.* 2005). La structure cristallographique a été résolue par diffraction X tout d'abord de la protéine stabilisée par son association avec les DNase I avec une résolution de 2,8 Å (Kabsch *et al.* 1990; Kabsch et Vandekerckhove 1992) puis ensuite de la protéine non complexée avec une résolution de 1,5 Å (Otterbein *et al.* 2001). Dans cette structure (figure 1), on note la présence de deux lobes constitués chacun de deux sous-domaines. Le premier sous-domaine (sous-domaine I) est constitué par les segments non-consécutifs 1-32, 70-144 et 338-372 et contient donc les deux extrémités de la protéine (NH₂-terminale et COOH-terminale). Le sous-domaine II qui complète le premier lobe est formé par le segment 33-69. L'autre lobe comporte les sous-domaines III, constitué des segments 145-180 et 230-337, et IV qui englobe la partie centrale de la protéine entre les résidus 181 et 269.

Au cœur de ce globule, dans le sillon formé entre les deux domaines, se trouve un site de complexation d'un nucléotide (ATP ou ADP) associé à un cation divalent (Mg²⁺ ou Ca²⁺) (Tsuboi 1968; Frieden et Patane 1985; Valentin-Ranc et Carlier 1989). Cette association avec un nucléotide et un cation permet la stabilisation de la protéine et limite donc sa dénaturation. Cependant, nucléotides et cations restent susceptibles d'être échangés avec le milieu extérieur au cours de la polymérisation (Carlier et Pantaloni 1986).

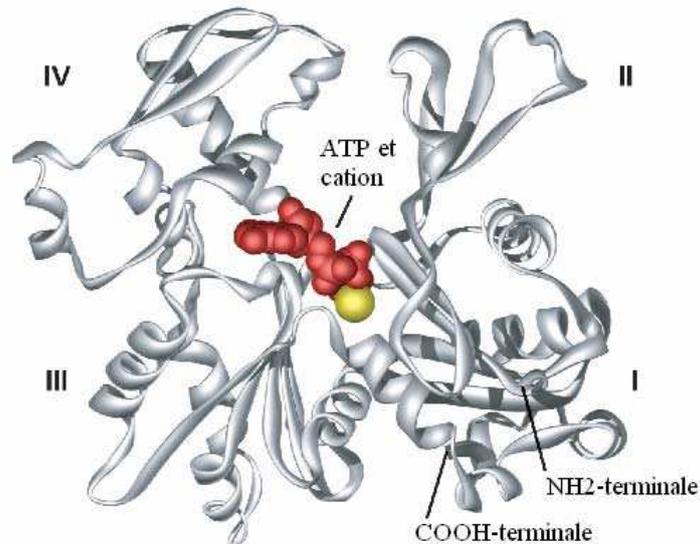


Figure 1 : Représentation schématique de la structure cristallographique d'un monomère d'actine. Les 4 sous-domaines (I à IV) sont représentés en gris, l'ATP en rouge et le cation divalent en jaune. Figure d'après Lodish *et al.* (Lodish *et al.* 2000)

c- L'actine F

Les monomères d'actine G ont la possibilité de s'associer selon un arrangement hélicoïdal (Figure 2). Cet enroulement dextre compte 13 monomères par tour d'hélice. Ainsi, chaque monomère est lié par des forces électrostatiques et hydrophobes avec 4 voisins, un au-dessus, un au-dessous et un de chaque côté. Les interactions impliquées dans cette polymérisation impliquent les résidus 322-325 avec 243-345, 286-289 avec 202-289 et 166-169 et 375 avec 41-45. Tous les monomères ont alors la même orientation ce qui justifie le caractère polarisé des filaments d'actine. Les sous-domaines II et IV sont toujours orientés vers la même extrémité du filament qui est dite pointue (ou -) alors que les sous-domaines I et III sont exposés à l'autre extrémité qui est dite barbée (ou +) (Moore *et al.* 1970).

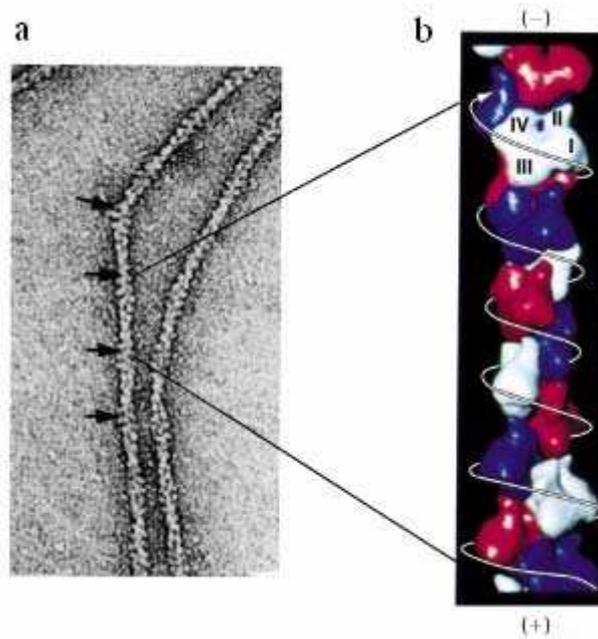


Figure 2 :
a) Filaments d'actine observés par microscopie électronique en transmission.
b) Représentation schématique de l'hélice polarisée d'actine.
 Par souci de clarté, les monomères sont représentés avec des couleurs différentes.
 Figure d'après Lodish *et al.*

2- La polymérisation de l'actine

a- In vitro

La polymérisation *in vitro* de l'actine qui ne nécessite pas d'apport d'énergie et en particulier pas celle de l'hydrolyse de l'ATP lié à l'actine (Cooke 1975), se déroule en trois étapes théoriques : la nucléation, l'élongation et l'équilibre dynamique (Figure 3).

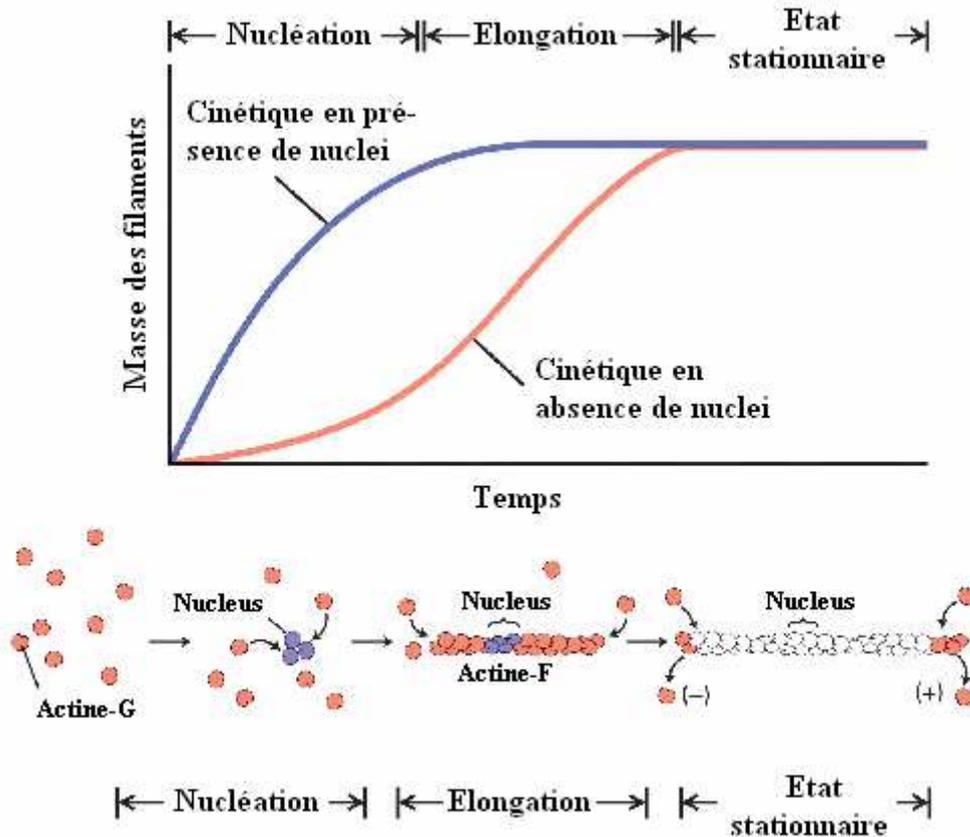


Figure 3 : Schéma théorique de la polymérisation de l'actine en présence et en absence de *nuclei*. Figure d'après Lodish *et al.*

Au cours de la nucléation, les monomères d'actine s'agrègent en dimères puis en trimères instables jusqu'à former des noyaux de polymérisation, les *nuclei* qui sont les premiers oligomères dont la dissociation est moins favorable que l'association avec d'autres monomères.

Après la formation de ces *nuclei* intervient l'étape d'élongation au cours de laquelle des monomères d'actine sont additionnés au niveau des deux extrémités du filament. En raison de l'asymétrie du filament, les cinétiques de polymérisation aux deux extrémités ne sont pas les mêmes et la vitesse de polymérisation de l'extrémité (+) dite barbée est 5 à 10 fois plus rapide que celle à l'extrémité (-) dite pointue (Bonder *et al.* 1983). On observe donc l'allongement des filaments néoformés de même que la rupture de certains filaments pour donner deux filaments plus petits qui peuvent à leur tour s'allonger. De façon générale, cette étape voit la part de l'actine F augmenter alors que la concentration en monomère diminue (Carlier et Pantaloni 1986).

Lorsque celle-ci atteint la concentration critique de polymérisation de l'actine (C_c), le régime devient alors équilibré. On observe simultanément une polymérisation d'actine à

l'extrémité barbée et une dépolymérisation au niveau de l'extrémité pointue. Au cours de cet état d'équilibre dynamique, la concentration en actine monomérique de même que la longueur des filaments restent constantes. On peut ainsi définir deux concentrations critiques sensiblement différentes aux deux extrémités du filament, la concentration à l'extrémité barbée étant plus faible ($0,1 \mu\text{M}$) que celle de l'extrémité pointue ($0,7 \mu\text{M}$) (Sheterline et Sparrow 1994; Sheterline *et al.* 1995)(Figure 4). De plus, après incorporation d'un monomère d'actine-ATP dans le polymère, le nucléotide est hydrolysé pour donner de l'ADP et un phosphate inorganique (P_i) qui est libéré par la suite (Korn *et al.* 1987). L'hydrolyse du nucléotide s'accompagne de réarrangements conformationnels qui permettent la différenciation entre les actines présentes aux deux extrémités du polymère. De ce fait, la constante d'association de l'actine-ATP avec le polymère est plus grande que celle de l'actine-ADP et la tendance est inversée pour ce qui concerne la dissociation au niveau de l'extrémité (-). L'état d'équilibre se caractérise donc par une égalisation des vitesses d'assemblage à l'extrémité (+) et de désassemblage à l'extrémité (-). Pour boucler ce phénomène d'échange de monomère ou *treadmiling*, le nucléotide ADP est remplacé par un ATP au stade monomérique afin de restaurer le monomère polymérisable actine-ATP.

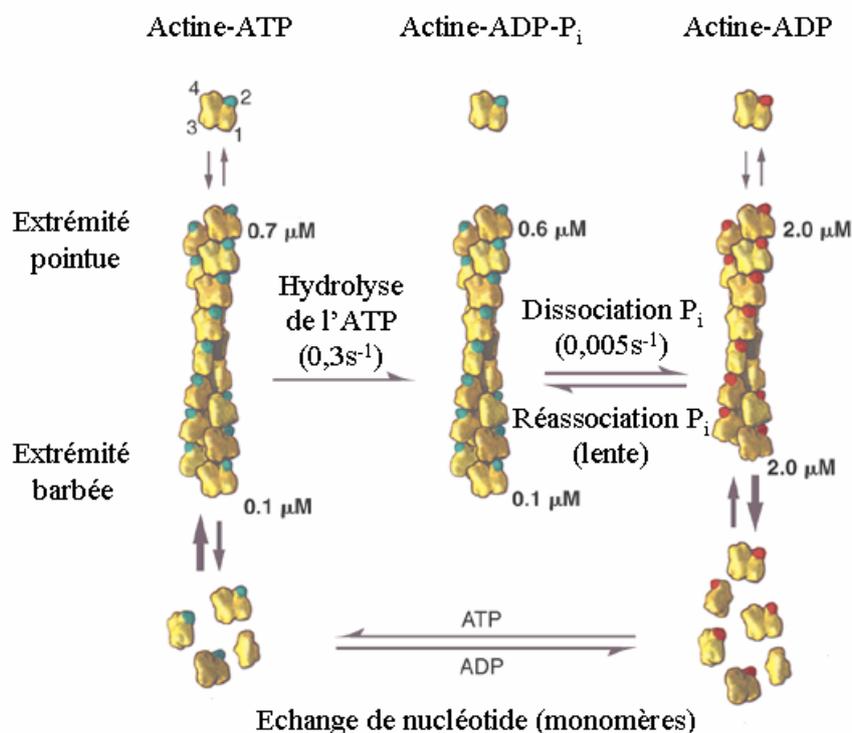


Figure 4 : Schéma de polymérisation de l'actine *in vitro* présentant les concentrations critiques des deux extrémités et les constantes de vitesse des réactions au niveau des nucléotides.

Figure d'après Pollard.

Cependant, ces trois étapes théoriques de la polymérisation de l'actine sont souvent difficiles à étudier expérimentalement, principalement la première étape de nucléation. En effet, les « germes » de nucléation des polymères sont bien souvent déjà présents dans les échantillons étudiés et la polymérisation, ainsi largement favorisée, débute directement par la phase d'élongation.

b- In vivo

Au sein de la cellule, la dynamique de polymérisation de l'actine est plus complexe qu'*in vitro*. En effet, de nombreuses protéines entrent en interaction avec l'actine, on parle alors de protéines effectrices de la polymérisation. Ces molécules, rassemblées sous le terme d'ABP², sont classées selon leur mode de liaison à l'actine (Weeds 1982; Pollard et Cooper 1986).

Tout d'abord, dans les cellules, la concentration en actine G est beaucoup plus importante que la concentration critique déterminée pour l'actine *in vitro* (0,5 mM). Cette concentration devrait normalement induire la polymérisation de la majeure partie de ce stock d'actine. En fait, celle-ci est stockée par une classe de protéines dites de séquestration parmi laquelle on retrouve la cofiline (Haarer et Brown 1990) qui permet en outre d'accélérer l'échange ADP/ATP au stade monomérique et la thymosine β 4 (Nachmias 1993).

Les protéines dites de fragmentation et/ou de coiffe régulent la longueur des filaments en les scindant en filaments plus courts ou bloquent l'une des extrémités du filament. La famille des gelsolines est capable de ces deux activités (dos Remedios *et al.* 2003). Après l'association au microfilament, la gelsoline induit un changement de conformation et une fragilisation de l'actine F. Cela conduit à la rupture du filament et à la génération d'une nouvelle extrémité (+) et d'une nouvelle extrémité (-). La gelsoline coiffe alors l'extrémité (+) du filament, tandis que l'extrémité (-) qui reste libre se dépolymérise.

D'autres protéines sont uniquement capables de fragmentation. Parmi celles-ci se trouvent la cofiline et les ADF³ (Bamburg *et al.* 1980). A nouveau, elles s'associent au filament d'actine, le fragilisent et permettent sa rupture.

² Actin Binding Proteins

³ Actin Depolymerization Factors

Enfin, d'autres protéines ne sont capables que d'une activité de coiffe parmi lesquelles on trouve par exemple CapZ (Schafer *et al.* 1995) et la tropomoduline (Fowler *et al.* 1993).

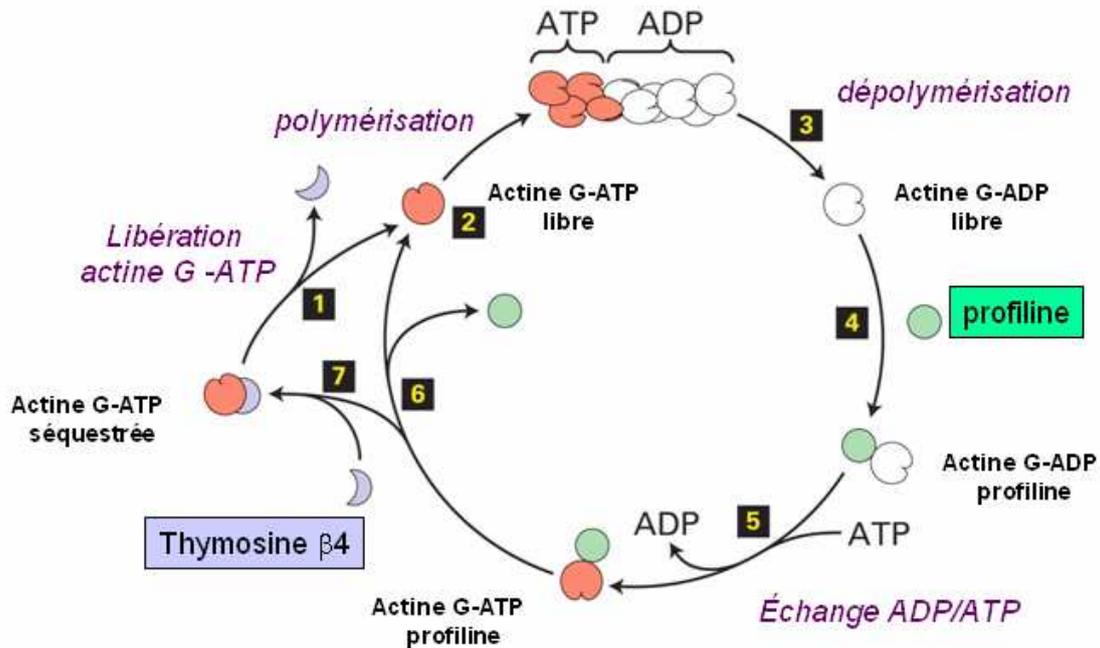


Figure 5 : Régulation de la polymérisation de l'actine par des protéines effectrices.

Ainsi, la polymérisation *in vivo* de l'actine est régulée par ces différentes classes de protéines qui interviennent plus ou moins directement. (Figure 5). Les paramètres liés à la cinétique sont donc différents selon que l'on travaille avec des échantillons d'actine purifiée ou en présence des ces protéines effectrices.

3- Le cytosquelette d'actine

Les filaments d'actine, ou microfilaments, sont un des constituants principaux du cytosquelette (le squelette des cellules) avec les filaments intermédiaires et les microtubules. Ils participent à l'architecture et à l'organisation des cellules et des tissus au sein d'un réseau complexe et dynamique. Le cytosquelette d'actine est organisé, d'une part, sous la forme d'un réseau bidimensionnel associé à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'ABP dites d'ancrage (comme la ponticuline (Chia *et al.* 1993), les protéines de la bande 4.1 (Arpin *et al.* 1994) ou la zyxine (Beckerle 1986)) et, d'autre part, sous la forme d'un faisceau

tridimensionnel de câbles et fibres de stress qui sous-tendent et structurent véritablement le cytoplasme. Ces faisceaux, qui peuvent être lâches ou serrés, sont associées par des ABP de pontage comme la fimbrine ou les plastines (Lin *et al.* 1994).

Le cytosquelette d'actine tient également un rôle important dans la migration cellulaire. (Figure 6). Au sein des structures de motilité que sont les filopodes qui prolongent le lamellipode, les microfilaments d'actine s'agencent en câbles de traction qui s'ancrent au niveau de plaques d'adhérence pour permettre la mise sous tension du corps cellulaire. La cellule peut ainsi se propulser en avant pour ramper sur son substrat. A l'autre extrémité de la cellule, l'actine est dépolymérisée et les monomères restaurés sont ensuite à nouveau recrutés à l'extrémité protrusive de la cellule. Des processus similaires sont impliqués dans des phénomènes tels que le développement embryonnaire, la réparation tissulaire ou l'immunité.

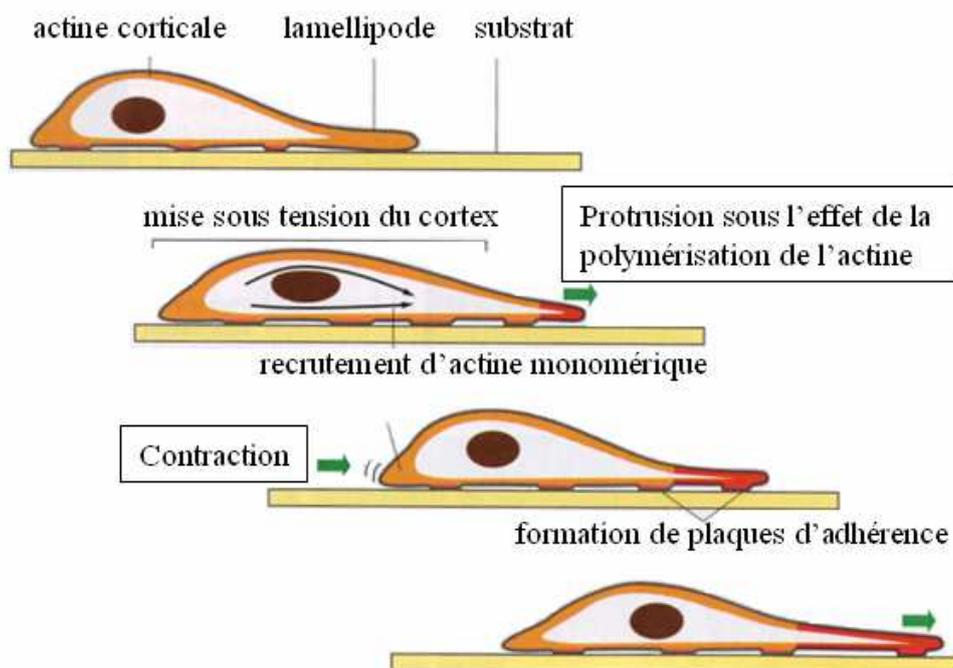


Figure 6 : Le lamellipode et la migration cellulaire.
Figure d'après Alberts *et al.* (Alberts *et al.* 2002)

En interaction avec une protéine motrice, la myosine, l'actine tient également une place fondamentale dans la contraction musculaire que nous choisissons de ne pas développer ici.

4- Actine et oncogenèse

Nous venons de décrire comment le cytosquelette d'actine était impliqué dans un certain nombre de fonctions et de phénomènes physiologiques parmi lesquels la morphologie, la migration, la croissance et la différenciation cellulaires. C'est pourquoi la dérégulation et la perte de l'intégrité du cytosquelette d'actine sont souvent à l'origine d'un processus qui peut favoriser l'oncogenèse. Contrairement aux tumeurs bénignes qui restent souvent localisées, les tumeurs cancéreuses acquièrent parfois la propriété d'être invasives. Cette invasion se déroule en deux étapes.

Tout d'abord, on observe une invasion locale. La dérégulation de la dynamique de polymérisation de l'actine consécutive à la sous-expression de protéines associées aux filaments d'actine a pour effet la perte des plaques d'adhérence et des jonctions intercellulaires. On parle d'étape pré-invasive. Les cellules perdent les contacts qu'elles établissaient avec les autres cellules et la matrice extracellulaire. Il n'y a plus alors d'inhibition de contact et les cellules se multiplient de façon désordonnée. Elles commencent à envahir les tissus sous-jacents. Par la suite, elles forment une masse tumorale qualifiée de carcinome micro-invasif puis invasif.

De plus, la répartition de l'actine dans les cellules dont le cytosquelette est désorganisé est beaucoup plus polarisée (figure 7). Une activité importante peut donc avoir lieu sur le front du lamellipode ce qui confère à la cellule une motilité plus grande. Les cellules tumorales peuvent alors envahir les systèmes circulants (sanguin et lymphatique) de l'organisme et être à l'origine de métastases. L'invasion est alors à distance.

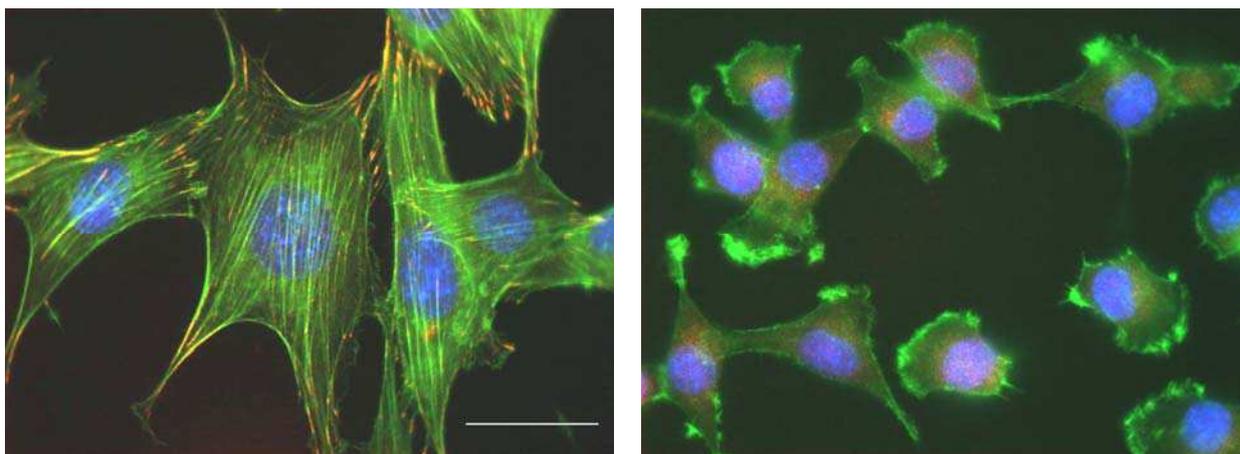


Figure 7 : Images en épifluorescence de cellules fibroblastiques murines normales (NIH3T3) et exprimant un phénotype tumoral (NIH3T3-EF).

Le cytosquelette d'actine est marqué par la phalloïdine-Alexa (vert), le noyau au DAPI⁴ (bleu) et la zyxine par un anticorps anti-zyxine couplé à de la rhodamine (rouge). La barre d'échelle correspond à 5 μm

A partir de ces constatations, on comprend bien pourquoi l'étude de la polymérisation de l'actine peut avoir un intérêt pharmacologique important. En particulier la recherche de composés ayant une influence positive sur la polymérisation et permettant de faire de la réversion phénotypique (Lemoigne 2006) est un axe majeur de recherche développé au Laboratoire de Biotechnologies et Pharmacologie génétique Appliquées (UMR 8113).

5- Les techniques de mesure de la polymérisation de l'actine

De nombreuses techniques ont été mises au point pour mesurer la polymérisation de l'actine. Parmi ces techniques, certaines mettent en œuvre des méthodes physiques telles que la diffusion quasi-élastique de la lumière à 400 nm (Fujime et Ishiwata 1971), la mesure de la turbidité à 310 nm (Tachibana *et al.* 1977), le dichroïsme circulaire dans l'UV ou encore la biréfringence (Oosawa *et al.* 1977). Ces techniques, bien que de natures essentiellement différentes ont toutes en commun une relative sensibilité vis-à-vis du degré de purification de l'échantillon et sont généralement mises en œuvre avec de l'actine purifiée. La présence d'autres protéines dans un échantillon (par exemple un extrait cellulaire) pourrait être la cause d'une variation artificielle des paramètres mesurés par ces techniques qui ne correspondrait

⁴ Di Aminido Phényl Indole

pas à de la polymérisation. Ces différents paramètres sont par ailleurs moins adaptés au développement d'une instrumentation d'imagerie de cette polymérisation.

D'autres techniques utilisent des paramètres liés à la fluorescence. En particulier, le système actine-pyrène a été largement étudié (Kouyama et Mihashi 1981; Lin et Dowben 1982; Cooper *et al.* 1983). Les monomères d'actine font l'objet, après une étape de purification, d'un marquage de la cystéine 373 (la fonction thiol la plus réactive de la séquence protéique) par le N-(pyrén-1-yl)iodoacétamide. La polymérisation de l'actine s'accompagne alors d'une exaltation de la fluorescence émise à 407 nm sous excitation à 365 nm. Cette exaltation s'explique par une légère réorganisation structurale de l'actine lors de la polymérisation qui tend à éloigner du pyrène des résidus tryptophane et tyrosine, empêchant par là-même un transfert d'énergie qui éteint sa fluorescence. Si ce système est souvent considéré comme le système référence de mesure de la polymérisation de l'actine, ces mesures n'ont toujours été effectuées que sur des échantillons d'actine purifiée. Il s'avère que cette technique est extrêmement sensible et ne convient pas à la mesure de la polymérisation dans des extraits protéiques.

La mesure de la polymérisation d'actine par la détection de fluorescence d'excimères du pyrène est également possible (Bubb *et al.* 2002). L'association de plusieurs monomères marqués consécutifs s'accompagne de l'apparition d'une faible bande de fluorescence d'excimères entre 450 et 470 nm. Cependant, pour être dans des conditions où de tels excimères sont observables, il faut une fraction d'actine marquée très importante (de l'ordre de 75%) et donc à nouveau une importante étape de purification et de marquage est nécessaire pour mettre en œuvre cette technique.

Ainsi, malgré le large panel de méthodes déjà décrites, il est apparu nécessaire de développer une nouvelle technique de mesure de cette polymérisation qui soit à la fois facile à mettre en œuvre dans l'optique d'un criblage haut débit mais également peu sensible au degré de purification de l'échantillon étudié *in vitro*. Nous avons choisi de développer une technique basée sur l'utilisation de l'anisotropie de fluorescence que nous nous proposons de présenter dans le premier chapitre de ce manuscrit.

II- L'ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

L'interaction entre une onde lumineuse et une molécule qui est à l'origine de la fluorescence, dépend de l'orientation relative du champ électrique de cette onde électromagnétique excitatrice avec le moment de transition de la molécule. Ainsi, l'excitation des molécules d'une solution homogène par une lumière polarisée n'est pas aléatoire. Par la suite, à l'émission, l'orientation rémanente du moment de transition de la molécule émettrice de la fluorescence n'est pas aléatoire et dépend de caractéristiques physico-chimiques de la molécule et de son environnement. L'émission est donc polarisée; on parle alors d'anisotropie de fluorescence. Dans cette partie introductive, nous nous attacherons à définir le concept d'anisotropie de fluorescence ainsi que les différents facteurs qui l'influencent (Lakowicz 1999; Rettig *et al.* 1999; Valeur 2001; Valeur et Brochon 2001).

1- Définition

Si l'on excite un échantillon avec une lumière polarisée que nous choisirons verticale pour la suite de la démonstration, l'intensité de l'émission selon l'orientation parallèle à l'excitation (notée $I_{//}$) est différente (et supérieure) à celle selon l'orientation perpendiculaire (notée I_{\perp}). On peut mettre en évidence cette différence d'intensité en calculant la polarisation (P) selon l'équation suivante :

$$P = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}} \quad (1)$$

Cependant, pour des raisons de simplification de calcul (Jablonski 1960), il est préférable d'utiliser l'anisotropie (r) qui est directement liée à la grandeur précédente et qui est définie comme suit :

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

Cette grandeur est sans dimension. C'est le rapport entre la différence d'intensité selon les deux polarisations et l'intensité totale. Les deux grandeurs précédentes sont évidemment reliées par une relation simple.

$$P = \frac{3r}{2+r} \quad (3)$$

$$r = \frac{2P}{3-P} \quad (4)$$

2- Théorie

a- Cas d'une molécule unique

Pour commencer le calcul de l'anisotropie, on peut se placer dans un cas idéal extrêmement simplifié dans lequel : i) les moments de transitions à l'émission et à l'excitation restent parallèles, ii) la molécule reste immobile, il n'y a pas de réorientation diffusionnelle et iii) dans lequel l'orientation à l'état fondamental est parfaitement aléatoire. Dans cet exemple, on excite selon une direction verticale portée par l'axe z une molécule unique qui fait un angle θ avec l'axe z et un angle Φ avec l'axe x (Figure 8).

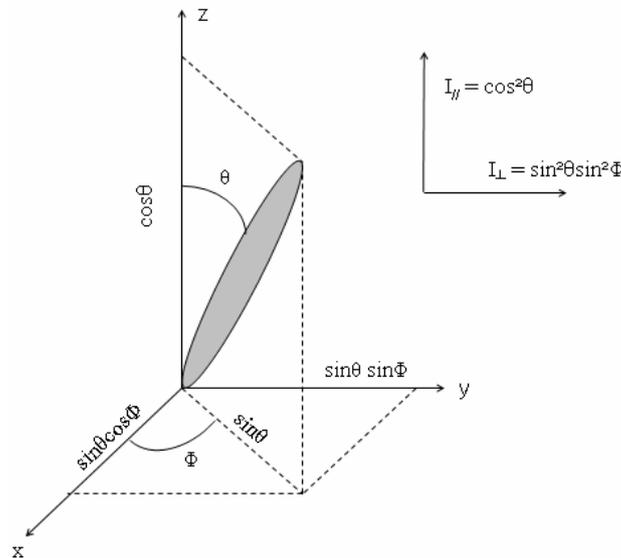


Figure 8 : Intensités de l'émission parallèle et perpendiculaire d'une molécule unique.

Cette molécule se comporte comme un dipôle radiant (Selényi 1939). L'intensité d'émission d'un tel dipôle est proportionnelle au carré de sa projection suivant l'axe d'observation. On obtient ainsi les intensités suivantes :

$$I_{//}(\theta, \Phi) = \cos^2 \theta \quad (5)$$

$$I_{\perp}(\theta, \Phi) = \sin^2 \theta \sin^2 \Phi \quad (6)$$

Ensuite, l'excitation étant dirigée selon l'axe z, l'excitation de toute molécule dans un plan perpendiculaire doit être la même et ne doit donc pas dépendre de l'angle Φ . On peut donc éliminer la dépendance en Φ de l'équation (6) en la remplaçant par la valeur moyenne de la fonction sur l'ensemble du plan $\langle \sin^2 \Phi \rangle$ obtenue en calculant l'intégrale suivante :

$$\langle \sin^2 \phi \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} \sin^2 \phi d\phi}{\int_0^{2\pi} d\phi} = \frac{1}{2} \quad (7)$$

$$\text{d'où } I_{\perp}(\theta) = \frac{1}{2} \sin^2 \theta \quad (8)$$

Si l'on s'intéresse maintenant à une collection de molécules individuelles, celles-ci sont choisies avec une distribution relative $f(\theta)$ par rapport à l'axe z . Les intensités mesurées sont alors :

$$I_{\parallel} = \int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta) \cos^2(\theta) d\theta = k \langle \cos^2 \theta \rangle \quad (9)$$

$$I_{\perp} = \frac{1}{2} \int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta) \sin^2(\theta) d\theta = \frac{k}{2} \langle \sin^2 \theta \rangle \quad (10)$$

Ainsi, en substituant (9) et (10) dans l'expression (2) et en utilisant l'identité remarquable $\cos^2\theta + \sin^2\theta = 1$, on obtient :

$$r = \frac{3\langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} \quad (11)$$

Deux constatations découlent de cette expression. Tout d'abord, l'anisotropie d'une seule molécule orientée selon l'axe z ($\theta = 0$) et ayant ses moments de transitions à l'excitation et l'émission colinéaires peut atteindre l'unité. Ensuite, il existe également un angle θ pour lequel cette anisotropie s'annule. Cet angle θ , solution de l'équation $\cos^2\theta = \frac{1}{3}$, vaut $54,7^\circ$ et est souvent qualifié d'« angle magique » (AM). Cependant, il faut maintenant prendre en compte les paramètres que nous avons, par souci de simplification, laissés de côté, à savoir la non-colinéarité des moments de transitions ainsi que l'effet de la photosélection.

b- Effet de la photosélection

Pour absorber une lumière polarisée, les molécules n'ont pas besoin d'avoir leurs moments de transition absolument parallèles avec le champ électrique de la lumière excitatrice. La probabilité d'absorption est proportionnelle au carré de la projection de l'intensité sur la direction du moment dipolaire, soit au carré du cosinus de l'angle que fait le moment dipolaire de la molécule avec le champ électrique (Spencer et Weber 1970) que nous

choisissons toujours colinéaire à l'axe z. Cette probabilité d'excitation des molécules est appelée photosélection et une représentation en est donnée sur la figure 9.

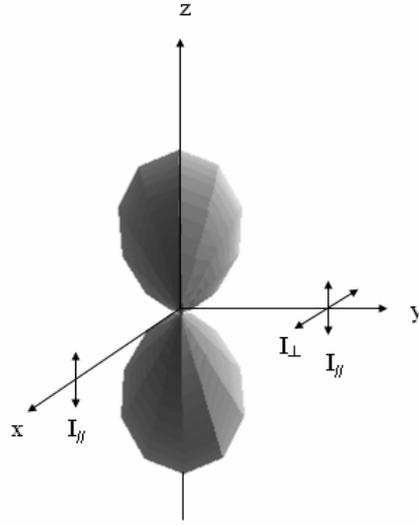


Figure 9 : Photosélection par une excitation verticale.

La distribution des molécules excitées par cette photosélection est le produit de cette photosélection par la probabilité de trouver une molécule dans la zone d'excitation. Dans le cas d'une répartition aléatoire des molécules à l'état fondamental, le nombre de molécules ayant un moment de transition formant un angle entre θ et $\theta + d\theta$ avec l'axe z est proportionnel à $\sin\theta d\theta$. Ainsi, la distribution des molécules excitées est donnée par

$$f(\theta)d\theta = \cos^2(\theta)\sin(\theta)d\theta \quad (12)$$

La valeur moyenne de $\cos^2\theta$ sur la distribution $f(\theta)$ peut alors être calculée par la formule suivante :

$$\langle \cos^2\theta \rangle_{f(\theta)} = \frac{\int_0^{\frac{\pi}{2}} \cos^2(\theta)f(\theta)d\theta}{\int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta)d\theta} = \frac{\int_0^{\frac{\pi}{2}} \cos^4(\theta)\sin(\theta)d\theta}{\int_0^{\frac{\pi}{2}} \cos^2(\theta)\sin(\theta)d\theta} = \frac{\frac{[\cos^5(\theta)]_0^{\frac{\pi}{2}}}{5}}{\frac{[\cos^3(\theta)]_0^{\frac{\pi}{2}}}{3}} = \frac{3}{5} \quad (13)$$

qui donne par substitution dans l'équation (11) une valeur maximale de $\frac{2}{5} = 0,4$ dans le cas où les dipôles à l'excitation et à l'émission restent colinéaires et en l'absence de processus dépolarisants. Cette valeur maximale de 0,4 est donc nettement inférieure à la valeur maximale théorique attendue pour un fluorophore isolé. Cependant, différents facteurs peuvent entraîner des valeurs expérimentales mesurées supérieures à 0,4. C'est le cas par

exemple de solutions diffusantes ou encore dans le cas d'excitation multiphotonique (Callis 1997a; Callis 1997b).

c- Effet de la non-colinéarité des moments de transition

Jusqu'ici, nous avons supposé que les moments de transitions à l'excitation et à l'émission étaient parallèles. Ce n'est toutefois généralement pas le cas et on observe souvent un angle β entre ces deux moments. Une démonstration semblable à la précédente permet de montrer que cette variation avant l'émission résulte en une dépolarisation supplémentaire de la forme $\frac{3\cos^2(\beta)-1}{2}$. On observe donc le produit de ces deux contributions dépolarisantes d'où l'expression de l'anisotropie fondamentale d'un fluorophore (r_0) sous la forme :

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2(\beta)-1}{2} \right) \quad (14)$$

Jusqu'à présent, nous n'avons pris en compte que les facteurs intrinsèques de dépolarisation de la fluorescence, à savoir la réorientation du moment dipolaire entre l'absorption et l'émission. Les molécules étaient considérées comme immobiles et les états excités restaient localisés sur le fluorophore excité. L'anisotropie décroît également pour des causes extrinsèques pendant la durée de vie de l'état excité telles que la diffusion rotationnelle ou le transfert résonant d'énergie entre fluorophores (Weber 1966).

d- Effet de la diffusion rotationnelle.

Si l'on considère dans un premier temps que la molécule fluorescente étudiée peut être assimilée à une sphère diffusant dans un milieu isotrope, le déclin temporel de l'anisotropie suite à l'excitation par une source pulsée est une exponentielle décroissante de la forme :

$$r(t) = r_0 \exp(-t/\tau_C) \quad (15)$$

où τ_C est le temps de corrélation rotationnelle. En effet, il se trouve que la distribution angulaire formée par la photosélection initiale est une solution propre de la diffusion angulaire dans un espace isotrope. Le temps de corrélation rotationnel peut alors s'exprimer en fonction de la viscosité (η), de la température (T), du volume (V) de la molécule et de la constante R des gaz parfaits par la relation :

$$\tau_c = \frac{\eta V}{RT} \quad (16)$$

On peut alors calculer l'anisotropie stationnaire comme le rapport suivant où $I(t)$ est le déclin de l'intensité de fluorescence.

$$r = \frac{\int_0^{\infty} I(t)r(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt} \quad (17)$$

Ainsi, si on se place dans le cas d'un déclin monoexponentiel de la fluorescence avec une durée de vie τ , on obtient

$$r = \frac{\int_0^{\infty} I_0 \exp(-t/\tau) r_0 \exp(-t/\tau_c) dt}{\int_0^{\infty} I_0 \exp(-t/\tau) dt} = \frac{r_0}{1 + (\tau/\tau_c)} \quad (18)$$

Cette expression est l'expression de Perrin dans le cas des rotors sphériques (Perrin 1926; Perrin 1929). Dans les cas extrêmes, si le temps de corrélation est beaucoup plus grand que la durée de vie de fluorescence ($\tau_c \gg \tau$), l'anisotropie mesurée (r) est égale à l'anisotropie fondamentale (r_0) alors que s'il est plus court ($\tau_c \ll \tau$), l'anisotropie est nulle. On peut de plus définir le coefficient de diffusion rotationnelle de la molécule D par $\tau_c = (6D)^{-1}$.

e- Effet du transfert d'énergie

Un dernier facteur important de dépolarisation de la fluorescence qui affecte les déclins d'anisotropie est le transfert d'énergie qui intervient au travers d'interaction dipôle-dipôle à longue distance et sans émission de photon qui peut être décrit par le modèle de Förster (Förster 1948). Ce transfert d'énergie par résonance que l'on qualifie de FRET⁵ intervient entre une molécule dite donneuse et une molécule acceptrice. Ces molécules peuvent être de nature différente, on parle alors d'hétéro-FRET ou bien encore identiques dans le cas de l'homo-FRET. L'interaction entre les deux molécules dépend de l'orientation relative et de la distance qui sépare leurs moments de transition (figure 10) ainsi que du recouvrement entre le spectre d'émission de fluorescence du donneur et de celui d'absorption de l'accepteur (Stryer 1978).

⁵ Förster Resonance Energy Transfer ou Fluorescence Resonance Energy Transfer

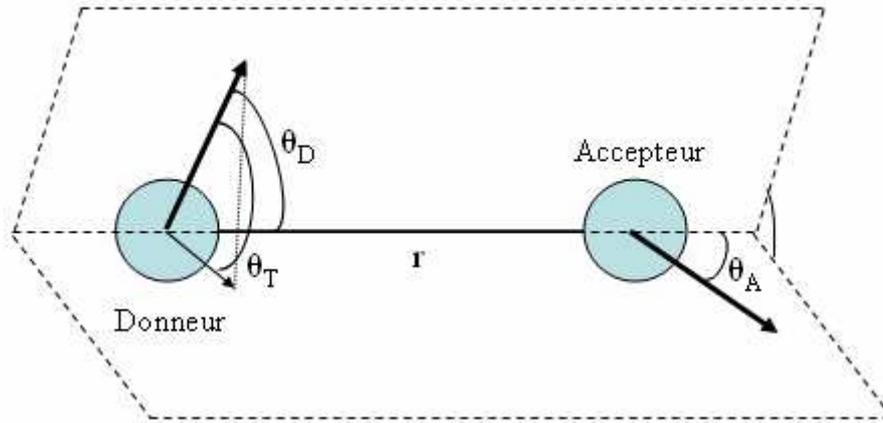


Figure 10 : Orientation relative des moments de transition du donneur et de l'accepteur.

L'efficacité E du transfert de Förster varie inversement avec la puissance sixième de la distance r qui sépare le donneur et l'accepteur.

$$E = \left[1 + \left(\frac{r}{R_0} \right)^6 \right]^{-1} \quad (19)$$

où R_0 est le rayon de Förster qui correspond à la distance où l'efficacité du transfert est de 50%. On peut calculer ce rayon de Förster à partir de l'expression suivante :

$$R_0 = 0,2108 [\kappa^2 \Phi_D^0 n^{-4} J]^{1/6} \quad (20)$$

où κ est le facteur d'orientation qui se calcule par la relation (21), Φ_D^0 est le rendement quantique du donneur en l'absence de l'accepteur, n est l'indice du milieu et J est l'intégrale de recouvrement donnée par la relation (22)

$$\kappa = [\cos \theta_T - 3 \cos \theta_A \cos \theta_D] \quad (21)$$

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F_D^0(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_a^{\infty} F_D^0(\lambda) d\lambda} \quad (22)$$

avec $F_D^0(\lambda)$ l'émission de fluorescence du donneur en absence de l'accepteur et $\varepsilon_A(\lambda)$ le coefficient d'absorption molaire de l'accepteur.

Ce transfert d'énergie que l'on observe classiquement dans une gamme de distance allant jusqu'à la dizaine de nanomètres se traduit par une extinction de la fluorescence du donneur et par une diminution de sa durée de vie de fluorescence ainsi que par une exaltation

de l'émission de fluorescence de l'accepteur. Ses conséquences sont aussi visibles sur l'anisotropie de fluorescence de l'accepteur qui est réduite alors que celle du donneur peut passer par un maximum. Des modélisations de ces déclins, développées en particulier par Bernard Valeur, peuvent permettre d'accéder à des distances interchromophoriques dans des assemblages multichromophoriques (Berberan-Santos et Valeur 1991; Berberan-Santos *et al.* 1998).

3- Mesure expérimentale

a- Dispositif expérimental

La mesure de l'anisotropie, qu'elle soit stationnaire ou résolue dans le temps nécessite donc la mesure des composantes parallèles et perpendiculaires de l'intensité de fluorescence. Les fluorimètres classiques comportent généralement un seul photomultiplicateur et adoptent la forme d'un L pour la mesure de la fluorescence dans une direction perpendiculaire à l'excitation.

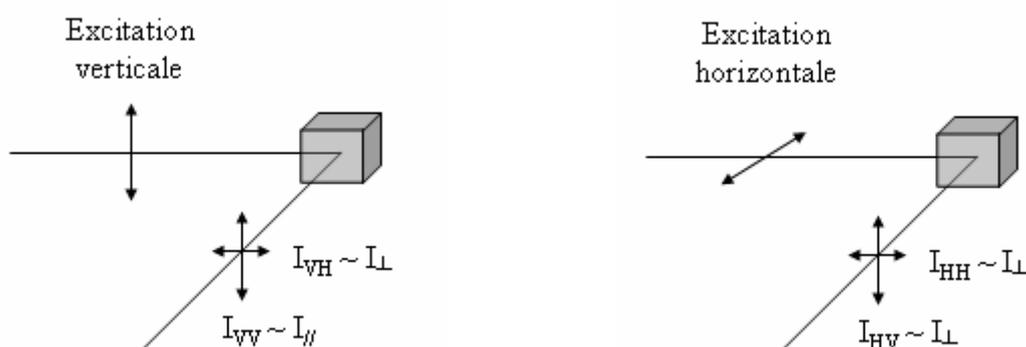


Figure 11 : Schéma des différentes polarisations mesurées dans un système en L

Les polarisations incidentes et émises sont sélectionnées par des polariseurs horizontaux ou verticaux et les longueurs d'ondes, à l'excitation ou à l'émission sont sélectionnées par des monochromateurs. Or ces monochromateurs n'ont pas toujours la même efficacité de transmission dans toutes les directions. Il faut donc s'affranchir de ces variations par la mesure précise d'une fonction d'appareil (G) qui tienne compte de ces différences de sensibilité des monochromateurs. Ainsi, sous une excitation verticale, on mesure des intensités proportionnelles aux intensités parallèles et perpendiculaires attendues. Si on note

S_V et S_H les sensibilités respectives des monochromateurs, on peut exprimer les composantes mesurées de la façon suivante :

$$I_{VV} = kS_V I_{//} \quad (23)$$

$$I_{VH} = kS_H I_{\perp} \quad (24)$$

où k est une constante de proportionnalité qui ne dépend plus de la sensibilité instrumentale liée à la polarisation mais d'autres facteurs instrumentaux ainsi que du rendement quantique de fluorescence de l'échantillon étudié.

Alors,

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V}{S_H} \frac{I_{//}}{I_{\perp}} = G \frac{I_{//}}{I_{\perp}} \quad (25)$$

ce qui permet de définir la fonction G comme le rapport des sensibilités. On peut déterminer cette fonction G en excitant horizontalement. Les deux composantes mesurées sont alors proportionnelles à l'intensité I_{\perp} et valent :

$$I_{HV} = kS_V I_{\perp} \quad (26)$$

$$I_{HH} = kS_H I_{\perp} \quad (27)$$

Ce qui donne, en faisant le rapport entre (26) et (27) :

$$G = \frac{S_V}{S_H} = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (28)$$

Par la suite, en combinant (2) et (25) et en utilisant l'expression de G calculée par (28), on obtient l'expression suivante :

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (29)$$

qui sert en pratique pour le calcul de l'anisotropie.

b- Mise en évidence de l'anisotropie sur les déclins

L'expression temporelle de l'anisotropie de fluorescence est analogue à la définition de l'équation (2).

$$r(t) = \frac{I_{//}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{//}(t) + 2I_{\perp}(t)} = \frac{I_{//}(t) - I_{\perp}(t)}{I(t)} \quad (30)$$

dont il est possible de tirer les expressions des composantes parallèles et perpendiculaires de la fluorescence de molécules caractérisées par leur intensité totale et leur anisotropie.

$$I_{//}(t) = \frac{I(t)}{3} [1 + 2r(t)] \quad (31)$$

$$I_{\perp}(t) = \frac{I(t)}{3} [1 - r(t)] \quad (32)$$

Dans l'hypothèse simplificatrice d'une seule durée de vie de fluorescence ($I(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$) et d'un seul temps de corrélation rotationnelle ($r(t) = r_0 \exp(-t/\tau_c)$), ces deux composantes deviennent :

$$I_{//}(t) = \frac{I_0}{3} \exp(-t/\tau) [1 + 2r_0 \exp(-t/\tau_c)] \quad (33)$$

$$I_{\perp}(t) = \frac{I_0}{3} \exp(-t/\tau) [1 - r_0 \exp(-t/\tau_c)] \quad (34)$$

Ces expressions permettent d'expliquer les formes caractéristiques des déclin de ces différentes polarisations. En effet, dans le cas général où l'anisotropie décline plus vite que la fluorescence ($\theta < \tau$), le déclin parallèle présente une composante plus rapide alors que le déclin perpendiculaire présente lui un méplat avant que ces deux déclin ne se rejoignent après l'extinction de l'anisotropie.

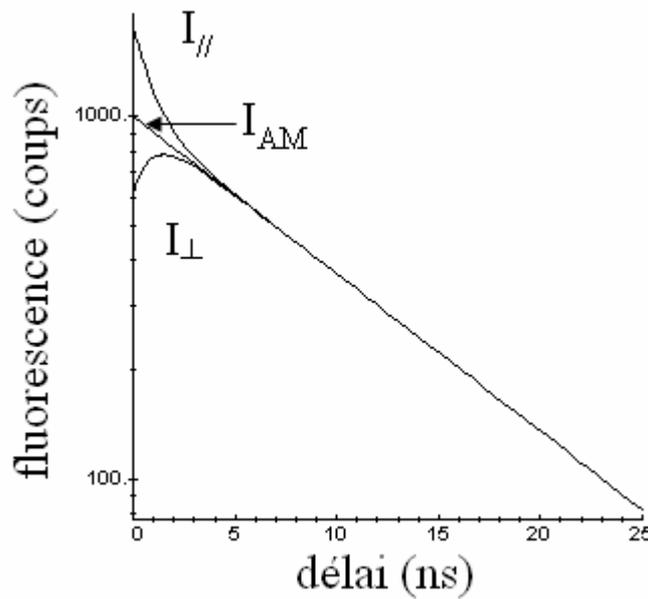


Figure 12 : Déclin de fluorescence parallèle ($I_{//}$), perpendiculaire (I_{\perp}) et à l'angle magique (I_{AM})

On avait noté plus haut que l'expression (11) de l'anisotropie pouvait s'annuler lorsqu'un angle de $54,7^\circ$ était présent entre les moments de transitions à l'excitation et à l'émission. Si ce même angle de $54,7^\circ$ est choisi entre les deux polariseurs qui sélectionnent les polarisations à l'excitation puis à l'émission, il n'y a pas d'effet de la polarisation sur le

déclin. Cet angle, qualifié d'angle magique, est particulièrement utilisé pour les mesures d'intensité de fluorescence et de durée de vie puisque ces mesures sont sensibles à la polarisation.

4- Actine et anisotropie

a- Fluorescence intrinsèque de l'actine

La technique sur laquelle nous envisageons de nous appuyer nécessite donc l'emploi d'une molécule fluorescente. La fluorescence intrinsèque de l'actine, comme de toute protéine, est due majoritairement aux trois acides aminés aromatiques : tyrosine, phénylalanine et surtout tryptophane (Tableau 1), mais les rendements quantiques sont assez faibles. La séquence peptidique (cf. annexe I) de l'actine ne compte que 4 résidus tryptophane, ce qui n'est pas suffisant pour cette application. De plus, l'excitation de ces acides aminés se fait dans l'ultra-violet. Ce domaine n'est pas très favorable aux applications sous microscope en raison du coût très élevé des optiques traitées pour l'utilisation en UV. D'autre part, une excitation dans cette gamme de longueur d'onde est peu sélective dans des échantillons protéiques.

Acide aminé	Absorption		Emission de fluorescence		Durée de vie (ns)
	Maximum (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Maximum (nm)	Rendement quantique	
Tyrosine	274	1400	303	0,14	3,6
Phénylalanine	257	200	282	0,04	6,4
Tryptophane	280	5600	348	0,20	2,6

Tableau 1 : Caractéristiques photochimiques des acides aminés fluorescents en solution.

b- Les marqueurs fluorescents

Il nous est donc apparu nécessaire d'utiliser un marqueur fluorescent greffé de façon covalente sur la protéine. De tels marqueurs sont développés depuis plusieurs décennies pour différents types d'applications biologiques telles que l'imagerie, l'histologie ou la cytométrie. Parmi les familles de molécules étudiées, celle des rhodamines, dont la structure de base est la fluorone, présente une résistance particulière au photoblanchiment. Elle est, de plus, moins

sensible aux variations de pH que les dérivés de la fluorescéine (Brandtzaeg 1975; McKay *et al.* 1981).

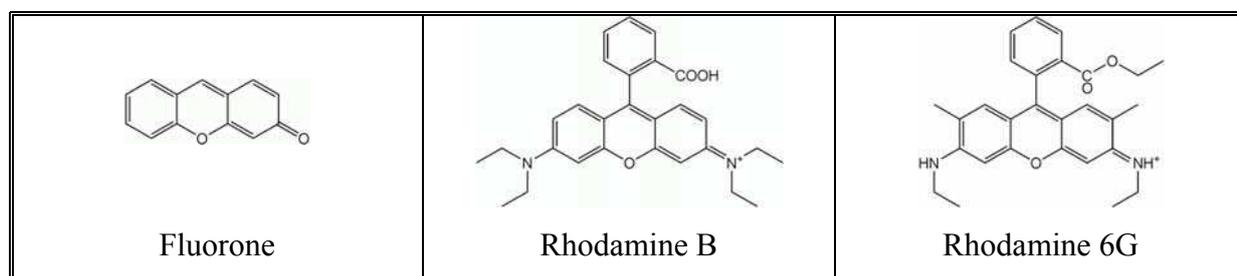


Figure 13 : Structure de la fluorone ainsi que de deux rhodamines.

Malgré ces avantages, les premières tentatives de conjugaison de tétraméthylrhodamines sur des protéines se sont soldées par une perte considérable de fluorescence en raison d'agrégation et de formation d'espèces non-fluorescentes qui absorbent aux longueurs d'onde d'émission des rhodamines (520 nm) (Ravdin et Axelrod 1977; Valdes-Aguilera et Neckers 1989). Afin d'éviter la formation d'agrégats, des sulfonations ont été réalisées. En effet, le caractère plus polaire de la fonction acide sulfonique devrait permettre d'aller à l'encontre de la tendance naturelle que ces molécules ont à s'associer (Mujumdar *et al.* 1993). De tels résultats ont été démontrés pour des carbocyanines (Wessendorf et Brelje 1992) ainsi que pour des dérivés du pyrène tels que ceux de la *Cascade Blue* (Whitaker *et al.* 1991). Différents dérivés sulfonés de rhodamine ainsi que d'aminocoumarine ont été développés par Molecular Probes™. Ils constituent la famille des fluorophores Alexa, reconnus pour leur stabilité vis-à-vis de la lumière et du pH (Panchuk-Voloshina *et al.* 1999).

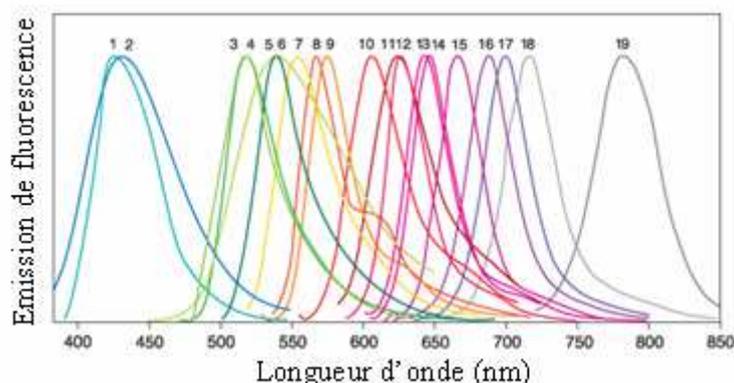


Figure 14 : Spectres d'émission de fluorescence de la famille Alexa. 1 – Alexa405, 2 – Alexa350, 3 – Alexa500, 4 – Alexa488, 5 – Alexa430, 6 – Alexa514, 7 – Alexa532, 8 – Alexa555, 9 – Alexa-546, 10 – Alexa568, 11 – Alexa594, 12 – Alexa610, 13 – Alexa633, 14 – Alexa635, 15 – Alexa647, 16 – Alexa660, 17 – Alexa680, 18 – Alexa700, 19 – Alexa750.

Figure issue du site Internet www.invitrogen.com

c- L'Alexa488

Au sein de cette famille, notre choix s'est porté sur l'Alexa488 en raison de son absorption semblable à celle de la fluorescéine, centrée autour de 488 nm. Cette longueur d'onde correspondant à une raie d'émission des lasers à Argon, elle est utilisée couramment sur les plateformes de microscopies et de nombreuses optiques sont donc optimisées pour le travail à cette longueur d'onde.

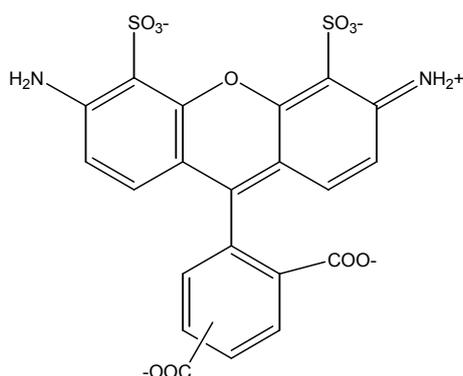


Figure 15 : Alexa488.

Bien que cette molécule soit largement employée dans de nombreuses applications, ses caractéristiques physico-chimiques décrites dans les différentes publications ne sont pas toujours identiques. Il nous a donc semblé intéressant de les déterminer sur nos instruments et particulièrement les paramètres d'anisotropie stationnaire et résolue dans le temps.

Cette molécule, telle qu'elle a été conçue par Molecular Probes™ (Mao *et al.* 2000), a une spectroscopie classique qui a beaucoup de similitude avec celle de la fluorescéine. Dans l'eau distillée et à température ambiante, elle a une absorption fine et centrée autour de 493 nm et une bande d'émission de fluorescence à 518 nm lorsqu'on excite au maximum de l'absorption. Le spectre d'excitation de fluorescence est absolument superposable au spectre d'absorption, indiquant qu'il n'y a pas de formation de dimères non fluorescents à l'état fondamental aux concentrations étudiées.

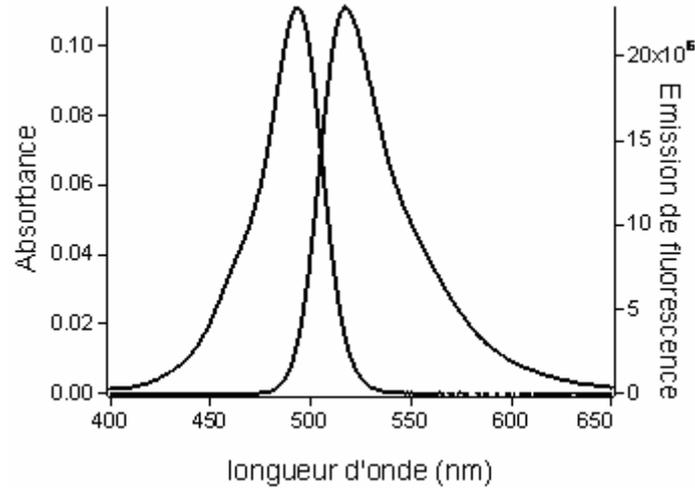


Figure 16 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de l'Alexa488 dans l'eau. ($C=1,55 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $\text{pH}=7$)

Une gamme de concentration permet de déterminer un coefficient d'extinction molaire de $70\,900 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ alors que la comparaison de son émission de fluorescence avec celle de la rhodamine B, mesurée avec une solution de même absorbance (cf. Matériel et Méthodes), nous permet de calculer un excellent rendement quantique de fluorescence de $0,959 \pm 0,015$. Le déclin de la fluorescence mesuré en cuve à l'angle magique est présenté sur la figure 17. Ce déclin présente une seule durée de vie de fluorescence et peut être modélisé par une monoexponentielle décroissante avec un temps caractéristique de $4,2 \pm 0,2 \text{ ns}$.

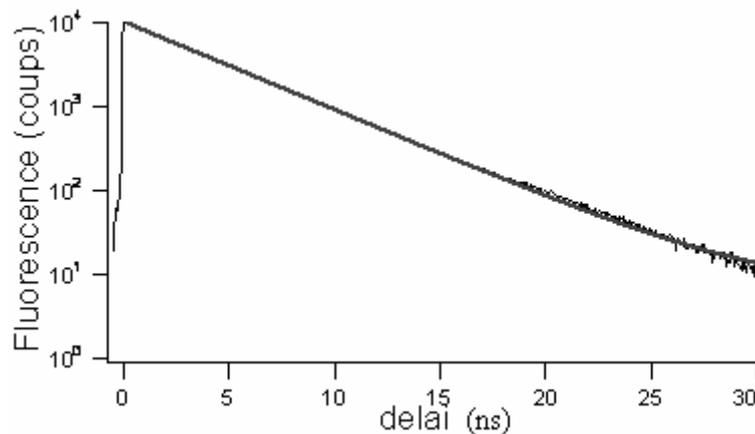


Figure 17: Déclin de la fluorescence de l'Alexa488 ($1,55 \mu\text{mol.L}^{-1}$) dans l'eau à l'angle magique. ($\lambda_{\text{ex}}=495 \text{ nm}$, l'émission est enregistrée au dessus de 510 nm)

Nous avons montré dans la partie précédente que l'anisotropie de fluorescence pouvait être directement reliée à des paramètres physicochimiques tels que la viscosité du solvant. C'est pourquoi nous avons décidé d'en faire l'étude sur une gamme de solvants de différentes viscosités : de l'eau ainsi que des mélanges de fractions croissantes de glycérol et d'eau. Les

paramètres d'anisotropie stationnaire et résolue en temps sont rassemblés dans le tableau 2. Ces résultats sont conformes aux attentes et nous permettent de considérer l'Alexa488 comme une bonne sonde de viscosité locale à travers ses paramètres d'anisotropie tant stationnaire (qui croît avec la viscosité) que résolue dans le temps puisque la relaxation de l'anisotropie s'allonge quand la viscosité du milieu augmente.

Solvant	Eau	Glycérol 10%	Glycérol 30%	Glycérol 50%
Viscosité relative	1	1,3	3,2	15,4
Anisotropie stationnaire	0,018	0,020	0,054	0,164
τ_C (temps de corrélation rotationnelle)	0,17 ns	0,24 ns	0,70 ns	2,07 ns

Tableau 2 : Paramètres d'anisotropie de l'Alexa488 (1,55 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) en fonction de la viscosité du solvant.

On peut remarquer que le paramètre de temps de corrélation rotationnelle varie bien linéairement avec la viscosité comme prévu par la formule (16). Par ailleurs, les durées de vies et les rendements quantiques de fluorescence ne sont que peu modifiés par le changement de viscosité.

d- L'actine-Alexa488

Pour le greffage sur la protéine, l'Alexa488 est utilisé sous la forme d'un ester succinimidyle de l'acide carboxylique en position 5 ou 6 (Haugland *et al.* 2002). Cette fonction est alors particulièrement réactive avec les amines primaires de la protéine - à savoir les amines des chaînes latérales des lysines accessibles ainsi que l'amine terminale qui se trouve sur la périphérie du lobe I - pour former des liaisons carboxamide en milieu légèrement basique (Panchuk-Voloshina *et al.* 1999). Les positions exactes de greffage de la molécule fluorescente sur la protéine ne sont d'ailleurs pas connues et le fabricant se refuse à donner plus de précisions sur cette molécule qui fait naturellement l'objet d'un brevet (Mao *et al.* 2000). Il précise cependant que les lots ne sont pas tous identiques et qu'ils comptent entre 1 et 2,1 molécules d'Alexa488 par protéine.

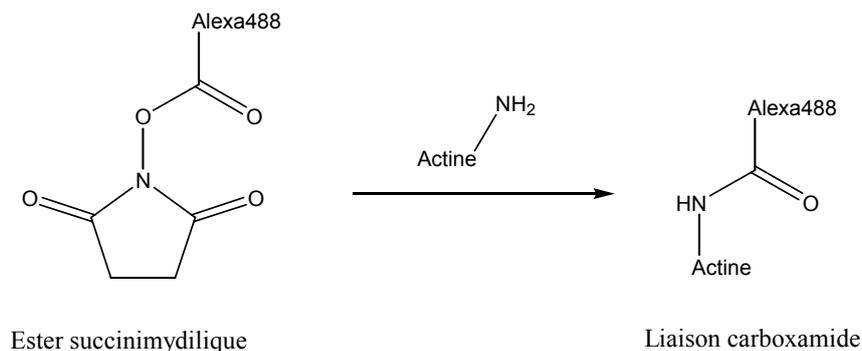


Figure 18 : Marquage de l'actine

La spectroscopie de la protéine marquée a été étudiée. Les absorption et émission de fluorescence de l'Alexa488 sont peu modifiées par le greffage sur l'actine ($\lambda_{\text{abs}}=493$ nm, $\lambda_{\text{em}}=517$ nm), de même que le déclin de la fluorescence qui est présenté sur la figure 19 et qui présente une durée de vie de $3,9 \pm 0,2$ ns.

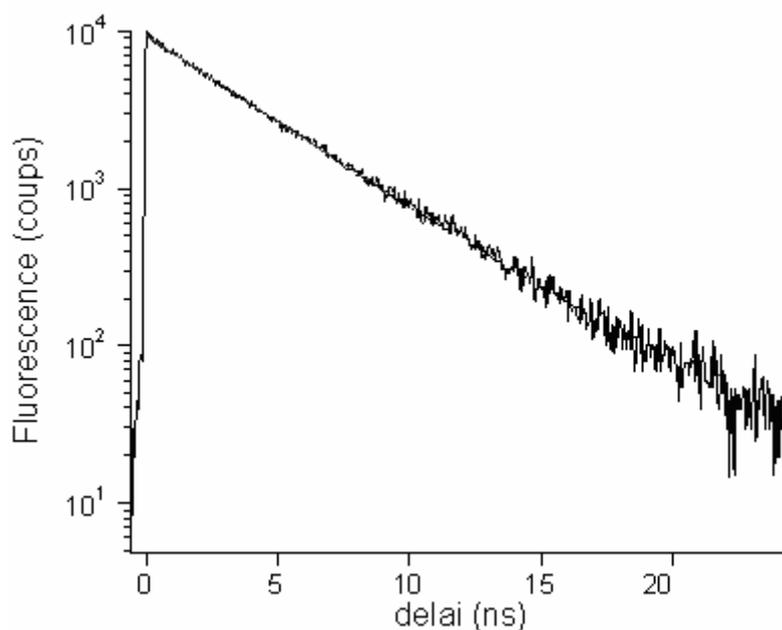


Figure 19 : Déclin de la fluorescence de l'actine-Alexa488. $C=1,2\mu\text{M}$ dans du tampon G.
($\lambda_{\text{ex}}=495$ nm, l'émission est enregistrée au dessus de 510nm)

L'actine marquée est alors également étudiée dans des mélanges de proportions variables de tampon G et de glycérol afin d'avoir des viscosités croissantes. Dans le tampon G, la relaxation (0,36 ns) est proche de la relaxation de l'Alexa488 dans l'eau (0,17 ns) ce qui nous indique, d'une part, que le greffage s'est bien fait sur une amine située à l'extérieur de la protéine et qu'elle est donc encore relativement disponible au solvant et, d'autre part, que ce greffage est assez libre et que la molécule n'est pas trop contrainte dans sa libration, c'est-à-

dire qu'elle peut toujours bouger au bout de la chaîne qui a servi au greffage. Car c'est bien la libration du chromophore qui est mesurée et non la rotation de l'actine marquée. En effet, on peut évaluer la constante de temps caractéristique associée à la rotation de la protéine avec l'expression de Debye (16). En approximant la molécule à une sphère de 2,5 nm de rayon (r) (Norman *et al.* 2005), on a alors

$$\tau_c = \frac{\eta V}{RT} = \frac{4\pi\eta r^3}{3kT} \approx 16 \text{ ns},$$

ce qui est environ un ordre de grandeur plus grand que les relaxations rapides mesurées. De telles composantes longues peuvent être déterminées sur les déclin, cependant, leur poids est généralement très faible. Ainsi, un ajustement biexponentiel du déclin d'anisotropie de fluorescence de l'actine-Alexa488 dans le tampon G présente une composante associée à un temps caractéristique de 16 ns qui représente moins de 3% du déclin. De plus, la précision sur ces temps de corrélation longs est assez médiocre puisqu'ils sont beaucoup plus longs que la durée de vie de fluorescence : il faut donc faire des ajustements sur la fin du déclin qui est souvent très bruitée. C'est pourquoi, afin d'avoir une meilleure précision sur la composante courte, nous avons mesuré ces déclin sur des fenêtres temporelles courtes et nous avons ajusté au mieux la composante courte du déclin, associée au mouvement du fluorophore seule.

L'augmentation de la viscosité du milieu s'accompagne d'un ralentissement de cette composante courte de la relaxation de l'anisotropie du même ordre de grandeur que celui de la molécule libre.

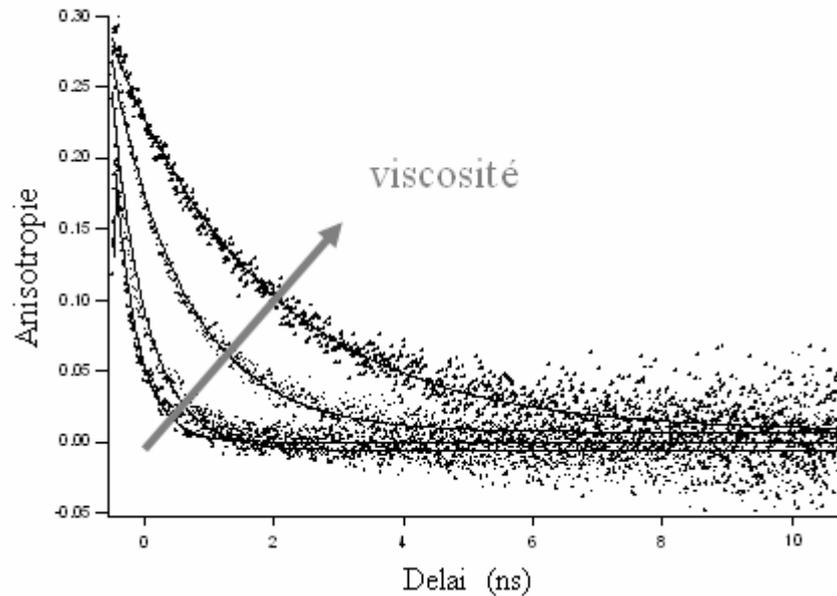


Figure 20 : Relaxation de l'anisotropie de l'actine-Alexa488 en fonction de la viscosité.
 Les déclinés de fluorescence de l'actine-Alexa488 sont mesurés dans des mélanges tamponG/Glycérol de rapports variables (100/0 – 95/5 – 75/25 – 50/50)

Fraction de glycérol dans le tampon G	0 %	5 %	25 %	50 %
Viscosité relative	1	1,13	2	15,4
τ_C (temps de corrélation rotationnelle)	0,36 ns	0,54 ns	1,0 ns	2,1 ns

Tableau 3 : Relaxation de l'anisotropie de l'actine-Alexa488 en fonction de la viscosité.

Enfin, grâce à la petite taille relative du fluorophore sur la protéine, l'actine marquée n'est pas dénaturée et ne perd pas ses capacités à polymériser ou encore à copolymériser avec de l'actine non marquée (Bear *et al.* 2002). Elle peut donc être utilisée, en faible proportion afin de servir de traceur dans des expériences de polymérisation *in vitro* telle que celles que nous nous proposons de décrire dans ce chapitre.

III – LE TEST

1- Description

a- « Cahier des charges »

Nous avons montré, dans la première partie de ce chapitre, l'intérêt que pouvait avoir la recherche de molécules favorisant la polymérisation de l'actine. Dans ce but, il était nécessaire de développer un test simple qui permette de déterminer rapidement si des molécules ont une influence sur la dynamique de polymérisation de l'actine et ce afin de cribler des chimiothèques. Ce premier criblage doit ainsi sélectionner les molécules susceptibles d'avoir un intérêt thérapeutique avant qu'elles ne soient testées plus spécifiquement, notamment au niveau cellulaire. Le test développé doit donc être facile à mettre en œuvre, rapide et facilement transposable voire automatisable pour faire du criblage « haut débit ». Il devait de plus être suffisamment robuste pour être utilisé avec des échantillons directement extraits de cellules sans trop d'étapes de purifications préalables. En effet, pour minimiser les coûts d'exploitation du test, les expériences sont faites sur des « extraits cellulaires » qui peuvent être produits facilement et en quantité importante par opposition avec des expériences sur de l'actine purifiée commerciale relativement plus onéreuse.

b- Mise en œuvre

Dans les deux types d'échantillons (actine purifiée et extraits cellulaires), on initie la polymérisation par ajout de tampon dit « tampon de polymérisation » après avoir rajouté une fraction (5%) de protéines marquées par l'Alexa488. Le tampon de polymérisation contient des cations ainsi que de l'ATP afin de restaurer les nucléotides des monomères d'actine qui auraient pu perdre ou hydrolyser l'ATP. Les protéines marquées sont alors incorporées dans le polymère formé.

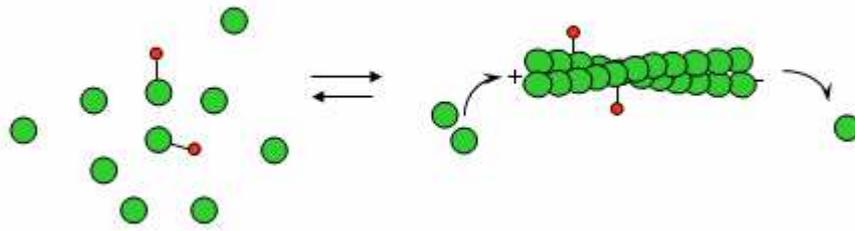


Figure 21 : Représentation schématique de la polymérisation de l'actine.
 Les monomères d'actine sont représentés en vert et les actines marquées par l'Alexa488 portent un petit label rouge.

On suit alors l'évolution de l'anisotropie stationnaire de fluorescence du système à la longueur d'onde d'émission d'un laser à argon (488 nm) au moyen d'un appareil (Beacon™) qui mesure les intensités de fluorescence des deux polarisations alternativement pendant le temps de la polymérisation. Cette cinétique (figure 22) présente une évolution similaire à celle de la cinétique présentée figure 3 en présence de nucléi. Comme attendu, bien que l'échantillon comporte de l'actine purifiée sensée être monomère, des germes de polymérisation sont vraisemblablement présents au début de l'expérience. L'étape de nucléation n'est donc pas accessible, seule l'élongation est mesurée.

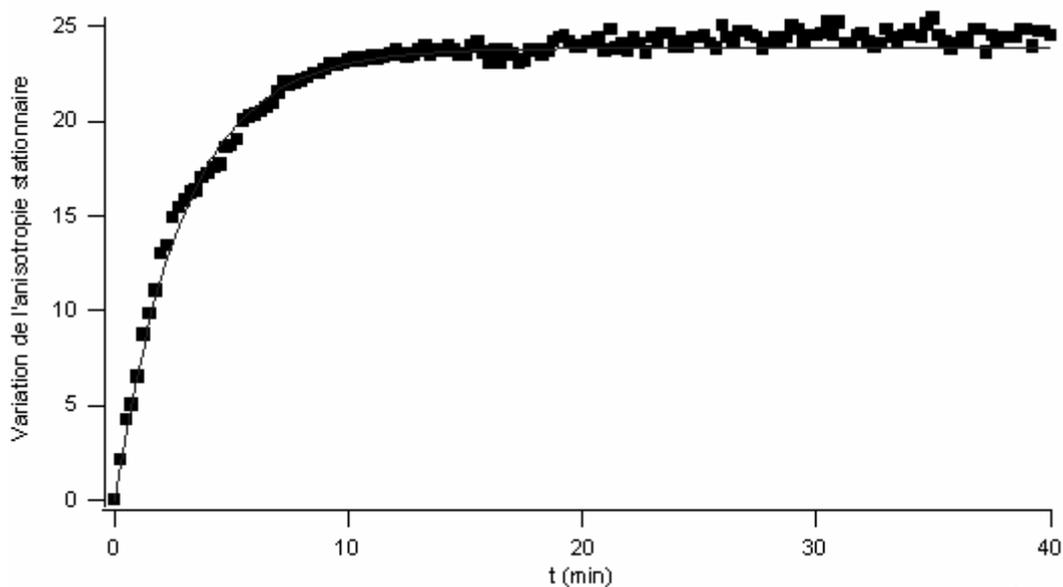


Figure 22 : Suivi de la polymérisation d'actine purifiée ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) par anisotropie stationnaire de fluorescence.

c- Exploitation

Dans une première approximation, cette cinétique peut être modélisée par une simple exponentielle de la forme

$$\Delta A(t) = \Delta A_{\max} [1 - \exp(-kt)] \quad (35)$$

qui se caractérise par la hauteur du plateau de l'anisotropie ΔA_{\max} qui traduit le ratio entre l'actine F et l'actine G lorsque l'équilibre est atteint et la constante de temps k qui est la constante de pseudo-premier ordre associée à cette cinétique.

Dans la cinétique présentée à la figure 22, l'ajustement numérique de ces deux paramètres donne les valeurs suivantes : $\Delta A_{\max} = 23,8$ et $k = 0,339 \text{ min}^{-1}$. Nous verrons plus tard que ces valeurs dépendent des différents paramètres de l'échantillon, particulièrement la nature de l'actine polymérisée (purifiée ou extraits cellulaires) ou encore sa concentration.

2- Validations du test

a- Imagerie des filaments formés

Afin de nous assurer que l'augmentation de l'anisotropie stationnaire de fluorescence ne résultait pas d'un artefact expérimental, nous avons observé en microscopie confocale de fluorescence les filaments formés au cours de cette polymérisation. La quantité de marqueur fluorescent (5%) n'étant pas suffisante pour l'imagerie confocale, les filaments ont été marqués avant l'observation par de la phalloïdine-Alexa488. La phalloïdine est un heptapeptide bicyclique (Wieland et Faulstich 1978) extrait du champignon toxique l'*Amanita phalloides* (Lynen et Wieland 1937) qui a la propriété de s'associer avec l'actine filamenteuse (Low et Wieland 1974; Wieland 1976). Cette fixation se fait par un site partagé par deux monomères consécutifs dans le filament (Barden *et al.* 1987; Faulstich *et al.* 1993; Steinmetz *et al.* 1998) ce qui fait de la phalloïdine un marqueur spécifique de l'actine polymérisée. Associé à un chromophore fluorescent, l'Alexa488, la phalloïdine permet un bon marquage des filaments d'actine à la fois *in vitro* mais aussi *in vivo* (Barak *et al.* 1980; Faulstich *et al.* 1988).

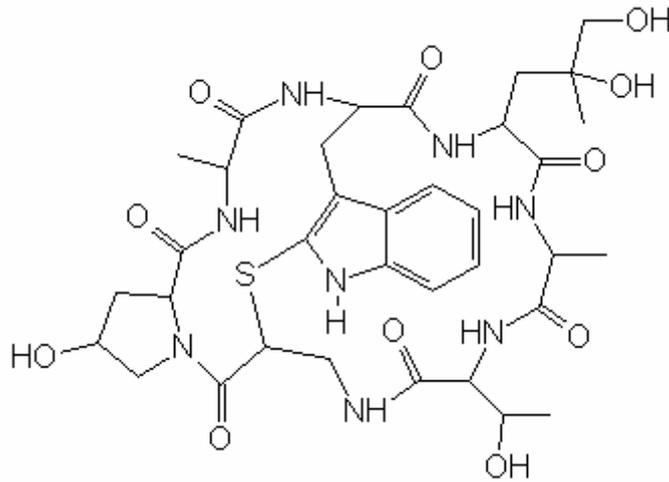


Figure 23 : Phalloïdine

Le degré de polymérisation des échantillons étudiés en anisotropie de fluorescence est donc suivi par imagerie. Un premier échantillon est tout d'abord prélevé avant l'addition du tampon de polymérisation. L'addition de la phalloïdine a un effet propolymérisant. En effet, la fixation de la toxine sur deux monomères consécutifs a pour effet de stabiliser les petits polymères. Ceci explique la présence de petits filaments marqués de quelques microns sur l'image de la figure 24 avant polymérisation. Le contraste avec l'échantillon après polymérisation est néanmoins flagrant. Dans cet échantillon, on observe de très longs filaments linéaires et parallèles (plusieurs centaines de microns) qui ont été polymérisés *in vitro* pendant la mesure d'anisotropie. L'augmentation de l'anisotropie de fluorescence dans l'échantillon s'est donc bien accompagnée d'une polymérisation.

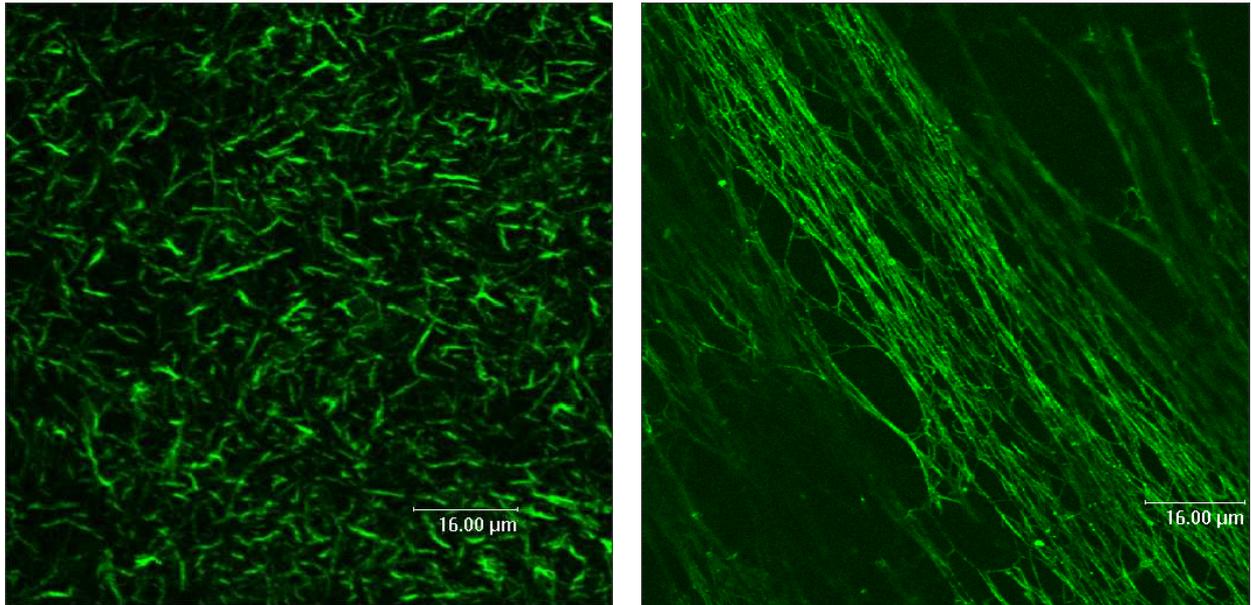


Figure 24: Images en microscopie confocale des échantillons avant et après polymérisation avec marquage à la phalloïdine-Alexa488

b- Pas de séquestration du chromophore.

La polymérisation d'extraits cellulaires s'accompagne également d'une augmentation de l'anisotropie stationnaire. Comme nous l'avons indiqué plus haut, la composition de ces échantillons est moins bien caractérisée que les échantillons d'actine purifiée. On pourrait penser que l'augmentation de l'anisotropie pourrait avoir une cause artificielle comme par exemple un emprisonnement du chromophore par une protéine séquestratrice induisant une augmentation de l'anisotropie qui ne traduirait pas une polymérisation. Une étude comparée de la relaxation de l'anisotropie sur des filaments polymérisés en absence de telles molécules (actine purifiée) et en leur présence éventuelle permet de s'affranchir de ce type d'hypothèse. Les résultats, présentés sur la figure 25, montrent clairement que l'anisotropie relaxe de la même façon, il n'y a donc pas de contrainte artificielle supplémentaire sur la libération de l'Alexa488 dans le cas d'extraits cellulaires.

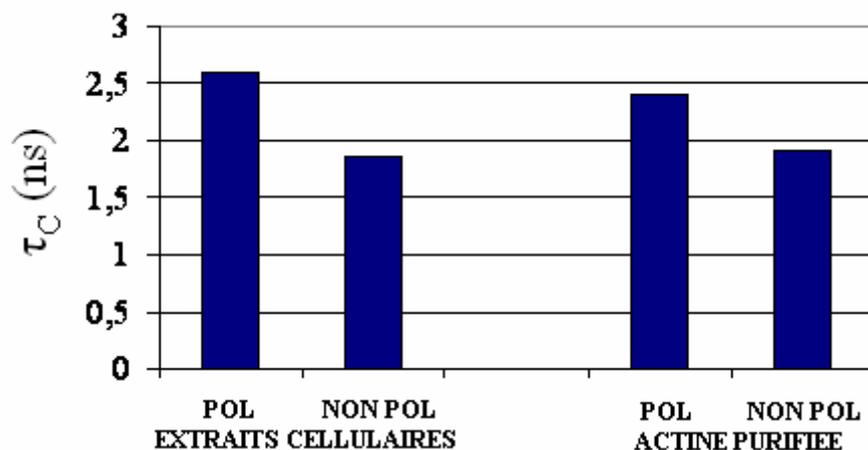


Figure 25: Relaxation de l'anisotropie de fluorescence (τ_c) de filaments d'actine (issus d'extraits cellulaires ou d'actine purifiée) polymérisés (POL) et dépolymérisés (NON POL).

c- Validation expérimentale : influence de la présence de cations.

Après ces validations de principe, il était important de s'assurer que le test ainsi développé répondait effectivement aux conditions de polymérisation qui peuvent être plus ou moins favorables. Ainsi, on a vu au début de ce chapitre qu'un cation divalent avait une place particulière au cœur de l'actine pour la complexation du nucléotide. Afin de faire varier la disponibilité de ces cations, on utilise le complexe acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA) qui est bien connu pour ses propriétés complexantes des cations divalents (Schwarzenbach 1960). Ainsi, en ajoutant aux échantillons une solution d'EDTA, l'équilibre de complexation des cations entre l'actine et l'EDTA est déplacé, diminuant la disponibilité des actines polymérisables. Les cinétiques mesurées dans ces conditions, et présentées sur la figure 26, rendent bien compte de cette tendance. Les résultats des ajustements de ces cinétiques avec l'expression (35) sont donnés dans le tableau 4.

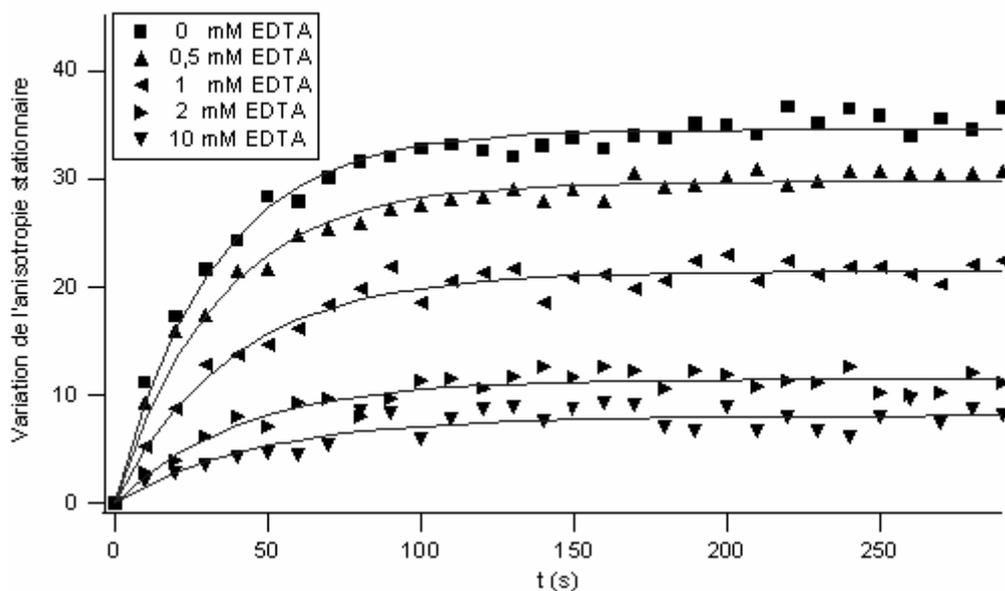


Figure 26: Influence de la présence des cations divalents sur la polymérisation d'actine purifiée (0,2 mg.mL⁻¹).

[EDTA] (mM)	0	0,5	1	2	10
ΔA_{\max}	34,5	29,7	21,4	11,5	8,1
k (s ⁻¹)	0,0313	0,0296	0,0262	0,0245	0,0212

Tableau 4: Evolution du plateau d'anisotropie (ΔA_{\max}) et de la constante de vitesse (k) en fonction de la concentration en EDTA

Plus la quantité d'EDTA est importante, moins la polymérisation se fait. Ceci se traduit d'une part par un plateau d'anisotropie de fluorescence moins haut, ce qui traduit un rapport entre l'actine F et l'actine G moins favorable aux filaments. D'autre part, la pente à l'origine plus faible, ce qui signifie une vitesse de polymérisation moins importante.

d- Autres validations

D'autres validations du même ordre (influence de la concentration initiale, de la présence d'ATP) ainsi qu'une systématisation de ces mesures (en extraits cellulaires) ont été réalisées au laboratoire par Mademoiselle Valérie Polard et sont décrites dans l'article présenté en annexe de ce manuscrit.

En particulier, il convient de détailler ici deux résultats intéressants obtenus par ce test. Tout d'abord, celui-ci permet parfaitement de différencier deux échantillons présentant des

phénotypes modèles de cellules normales (NIH 3T3) et de cellules tumorales (NIH 3T3 EF) (Figure 27). Ces dernières ont pour caractéristique principale de présenter une désorganisation totale de leur cytosquelette due à une dépolymérisation importante de l'actine. Ces deux échantillons se distinguent par des plateaux d'anisotropie différents (42 contre 63 pour des cellules normales) et par une vitesse initiale moindre pour l'échantillon extrait des cellules tumorales ($0,039 \text{ s}^{-1}$ contre $0,078 \text{ s}^{-1}$).

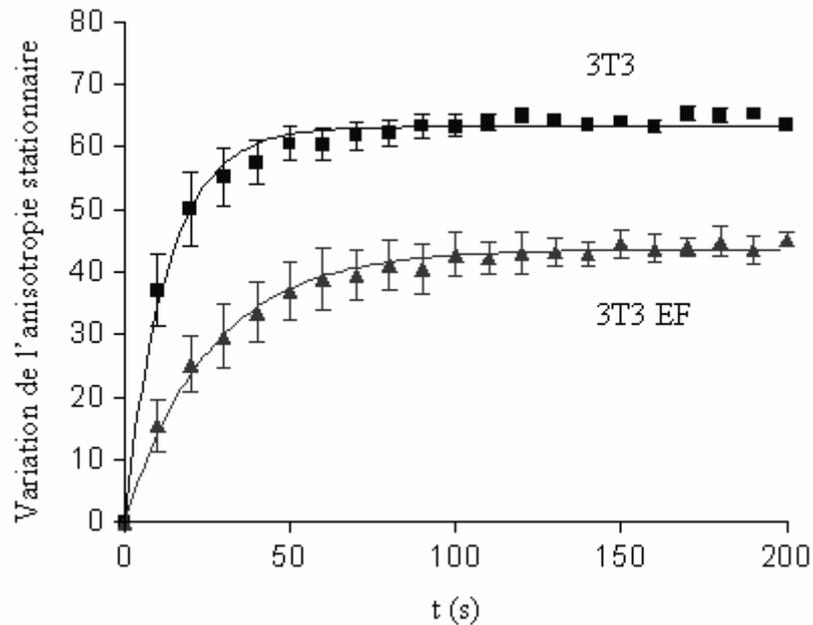


Figure 27: Cinétiques de polymérisations d'extraits cellulaires 3T3 (normales) et 3T3-EF (tumorales)

L'échantillon tumoral a pu, par la suite, être utilisé afin de déterminer des molécules ayant un effet sur la polymérisation de l'actine. Dans un premier temps, nous avons considéré des molécules connues pour ce type de propriétés comme la Jasplakinolide (Bubb *et al.* 1994; Bubb *et al.* 2000; Visegrady *et al.* 2004) (figure 28).

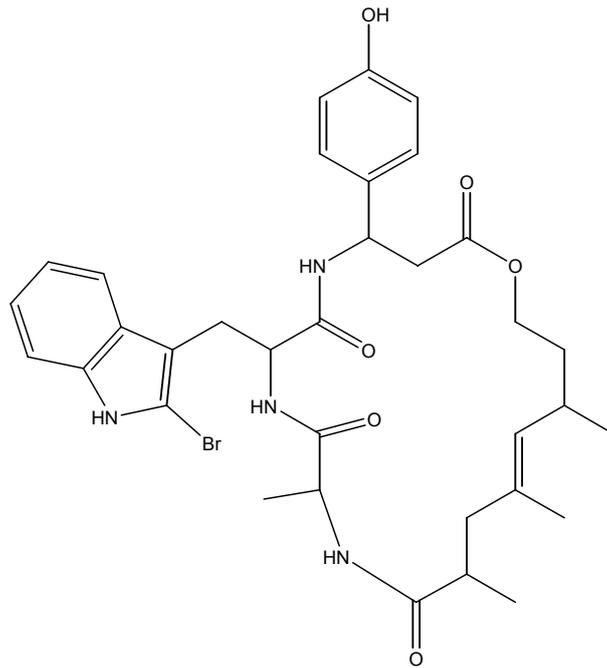


Figure 28 : Structure de la Jasplakinolide

Une concentration de 10 μM de Jasplakinolide permet de restaurer à la fois les valeurs du plateau et de vitesse initiale de polymérisation d'un échantillon de 3T3-EF (figure 29). Ronan Lemoigne a par ailleurs démontré au laboratoire que cette molécule permettait la réversion phénotypique dans les cellules modèles étudiées (Lemoigne 2006).

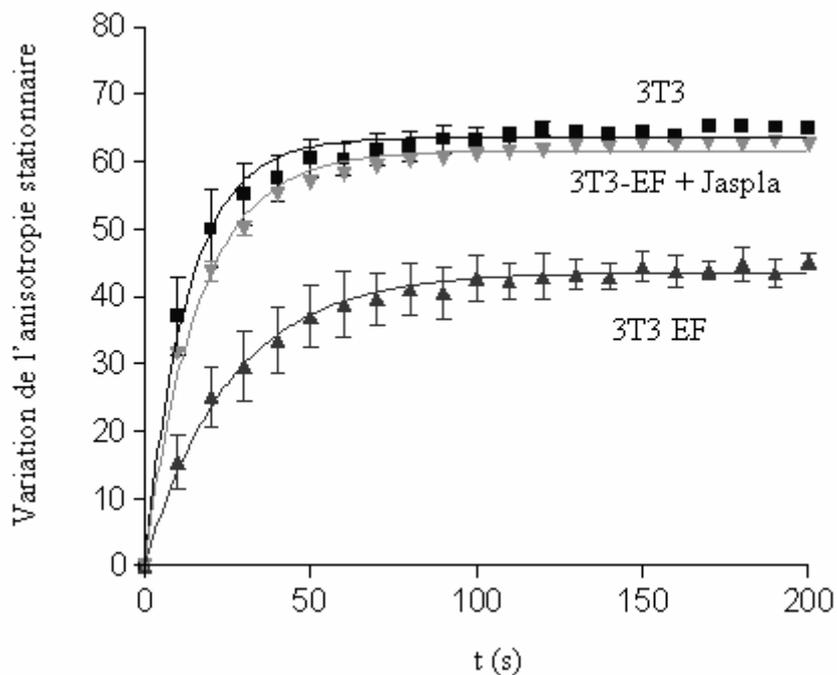


Figure 29: Effet de la Jasplakinolide (Jaspla) sur la cinétique de polymérisation d'extraits tumoraux

Ainsi, nous parvenons à bien corrélérer la capacité d'un échantillon d'actine à polymériser par la mesure d'un paramètre de fluorescence. Par la suite, ce test, qui fait l'objet d'un brevet déposé par la société BioAlliance Pharma en partenariat avec le LBPA (Pragnon *et al.* 2004), a été développé sur un autre instrument permettant la mesure de l'anisotropie stationnaire de fluorescence sur des plaques 96 puits permettant de faire du criblage haut débit de molécules effectrices de la polymérisation. De telles molécules (Lemoigne 2006) sont maintenant l'objet d'études cliniques plus avancées.

Il est également intéressant de noter que parmi les molécules détectées par ce test en extrait cellulaire, certaines molécules n'interviennent pas directement sur l'actine F (stabilisation directe) mais sur des protéines effectrices de la polymérisation. Elles n'ont aucun effet sur la polymérisation d'actine purifiée et n'aurait donc pas pu être révélées par un test classique.

Par ailleurs, cette méthode a été étendue au-delà de nos modèles d'étude (NIH 3T3/3T3-EF) à des différentes lignées cellulaires tumorales (mélanome B16F0/B16F10, sarcome d'Ewing , ...)

Références

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the cell*. New York, Garland Science.
- Allen, P. G., Shuster, C. B., Kas, J., Chaponnier, C., Janmey, P. A. et Herman, I. M. (1996). "Phalloidin binding and rheological differences among actin isoforms." *Biochemistry* **35**(45): 14062-9.
- Alonso, S. (1987). "Coexpression and evolution of the two sarcomeric actin genes in vertebrates." *Biochimie* **69**(11-12): 1119-25.
- Arpin, M., Algrain, M. et Louvard, D. (1994). "Membrane-actin microfilament connections: an increasing diversity of players related to band 4.1." *Curr Opin Cell Biol* **6**(1): 136-41.
- Bamburg, J. R., Harris, H. E. et Weeds, A. G. (1980). "Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain." *FEBS Lett* **121**(1): 178-82.
- Barak, L. S., Yocum, R. R., Nothnagel, E. A. et Webb, W. W. (1980). "Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-phalloidin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(2): 980-4.
- Barden, J. A., Miki, M., Hambly, B. D. et Dos Remedios, C. G. (1987). "Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin." *Eur J Biochem* **162**(3): 583-8.
- Bear, J. E., Svitkina, T. M., Krause, M., Schafer, D. A., Loureiro, J. J., Strasser, G. A., Maly, I. V., Chaga, O. Y., Cooper, J. A., Borisy, G. G. et Gertler, F. B. (2002). "Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility." *Cell* **109**(4): 509-21.
- Beckerle, M. C. (1986). "Identification of a new protein localized at sites of cell-substrate adhesion." *J Cell Biol* **103**(5): 1679-87.
- Berberan-Santos, M. N., Choppinet, P., Fedorov, A., Jullien, L. et Valeur, B. (1998). "Multichromophoric Cyclodextrins.6. Investigations of excitation energy hopping by Monte-Carlo simulations and time-resolved fluorescence anisotropy." *J.Am.Chem.Soc* **121**: 2526-2533.
- Berberan-Santos, M. N. et Valeur, B. (1991). "Fluorescence depolarization by electronic energy transfert in donor-acceptor pairs of like and unlike chromophores." *J. Chem. Phys.* **11**: 8048-8055.
- Bonder, E. M., Fishkind, D. J. et Mooseker, M. S. (1983). "Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament." *Cell* **34**(2): 491-501.
- Brandtzaeg, P. (1975). "Rhodamine conjugates: specific and nonspecific binding properties in immunohistochemistry." *Ann N Y Acad Sci* **254**: 35-54.
- Bravo, R., Fey, S. J., Small, J. V., Larsen, P. M. et Celis, J. E. (1981). "Coexistence of three major isoactins in a single sarcoma 180 cell." *Cell* **25**(1): 195-202.
- Bubb, M. R., Govindasamy, L., Yarmola, E. G., Vorobiev, S. M., Almo, S. C., Somasundaram, T., Chapman, M. S., Agbandje-McKenna, M. et McKenna, R. (2002). "Polylysine induces an antiparallel

actin dimer that nucleates filament assembly: crystal structure at 3.5-Å resolution." *J Biol Chem* **277**(23): 20999-1006.

Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L. et Korn, E. D. (1994). "Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin." *J Biol Chem* **269**(21): 14869-71.

Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B. et Fosen, K. M. (2000). "Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations." *J Biol Chem* **275**(7): 5163-70.

Callis, P. R. (1997a). *The theory of two-photon induced fluorescence anisotropy*. New York, Plenum Press.

Callis, P. R. (1997b). "Two-photon induced fluorescence." *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**: 271-297.

Carrier, M. F. et Pantaloni, D. (1986). "Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments." *Biochemistry* **25**(24): 7789-92.

Chaponnier, C., Goethals, M., Janmey, P. A., Gabbiani, F., Gabbiani, G. et Vandekerckhove, J. (1995). "The specific NH₂-terminal sequence Ac-EEED of alpha-smooth muscle actin plays a role in polymerization in vitro and in vivo." *J Cell Biol* **130**(4): 887-95.

Chia, C. P., Shariff, A., Savage, S. A. et Luna, E. J. (1993). "The integral membrane protein, ponticulin, acts as a monomer in nucleating actin assembly." *J Cell Biol* **120**(4): 909-22.

Cooke, R. (1975). "The role of the bound nucleotide in the polymerization of actin." *Biochemistry* **14**(14): 3250-6.

Cooper, J. A., Walker, S. B. et Pollard, T. D. (1983). "Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization." *J Muscle Res Cell Motil* **4**(2): 253-62.

De La Cruz, E. et Pollard, T. D. (1994). "Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments." *Biochemistry* **33**(48): 14387-92.

dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A. et Nosworthy, N. J. (2003). "Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments." *Physiol Rev* **83**(2): 433-73.

Faulstich, H., Zobeley, S., Heintz, D. et Drewes, G. (1993). "Probing the phalloidin binding site of actin." *FEBS Lett* **318**(3): 218-22.

Faulstich, H., Zobeley, S., Rinnerthaler, G. et Small, J. V. (1988). "Fluorescent phallotoxins as probes for filamentous actin." *J Muscle Res Cell Motil* **9**(5): 370-83.

Förster, T. (1948). "Intramolecular energy migration and fluorescence." *Ann. Phys.* **2**: 55-75.

Fowler, V. M., Sussmann, M. A., Miller, P. G., Flucher, B. E. et Daniels, M. P. (1993). "Tropomodulin is associated with the free (pointed) ends of the thin filaments in rat skeletal muscle." *J Cell Biol* **120**(2): 411-20.

Frieden, C. et Patane, K. (1985). "Differences in G-actin containing bound ATP or ADP: the Mg²⁺-induced conformational change requires ATP." *Biochemistry* **24**(15): 4192-6.

- Fujime, S. et Ishiwata, S. (1971). "Dynamic study of F-actin by quasielastic scattering of laser light." *J Mol Biol* **62**(1): 251-65.
- Gaetjens, E. et Barany, M. (1966). "N-acetylaspartic acid in G-actin." *Biochim Biophys Acta* **117**(1): 176-83.
- Haarer, B. K. et Brown, S. S. (1990). "Structure and function of profilin." *Cell Motil Cytoskeleton* **17**(2): 71-4.
- Haugland, R. P., Singer, V. L. et Yue, S. T. (2002). Brevet n° Xanthene Dyes and their Application as Luminescence Quenching Compounds
- Herman, I. M. (1993). "Actin isoforms." *Curr Opin Cell Biol* **5**(1): 48-55.
- Jablonski, A. (1960). "On the notion of fluorescence anisotropy." *Bull.Acad.Pol.Sci.Ser. A*(8): 258-264.
- Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. et Holmes, K. C. (1990). "Atomic structure of the actin:DNase I complex." *Nature* **347**(6288): 37-44.
- Kabsch, W. et Vandekerckhove, J. (1992). "Structure and function of actin." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**: 49-76.
- Korn, E. D., Carlier, M. F. et Pantaloni, D. (1987). "Actin polymerization and ATP hydrolysis." *Science* **238**(4827): 638-44.
- Kouyama, T. et Mihashi, K. (1981). "Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin." *Eur J Biochem* **114**(1): 33-8.
- Kumar, A., Crawford, K., Close, L., Madison, M., Lorenz, J., Doetschman, T., Pawlowski, S., Duffy, J., Neumann, J., Robbins, J., Boivin, G. P., O'Toole, B. A. et Lessard, J. L. (1997). "Rescue of cardiac alpha-actin-deficient mice by enteric smooth muscle gamma-actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4406-11.
- Labbe, J. P., Harricane, M. C., Boyer, M., Derancourt, J., Roustan, C. et Benyamin, Y. (1996). "Biochemical evidence for the presence of an unconventional actin protein in a prokaryotic organism." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **114**(3): 287-93.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York, Kulwer Academic/Plenum Publishers.
- Thèse de Lemoigne, R. (2006) Université Paris XI. Etude de la réversion du phénotype tumoral par modulation pharmacologique du cytosquelette d'actine
- Lin, C. S., Shen, W., Chen, Z. P., Tu, Y. H. et Matsudaira, P. (1994). "Identification of I-plastin, a human fimbrin isoform expressed in intestine and kidney." *Mol Cell Biol* **14**(4): 2457-67.
- Lin, T. I. et Dowben, R. M. (1982). "Fluorescence spectroscopic studies of pyrene-actin adducts." *Biophys Chem* **15**(4): 289-98.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. et Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*, Freeman.
- Low, I. et Wieland, T. (1974). "The interaction of phalloidin. Some of its derivatives, and of other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscosimetry." *FEBS Lett* **44**(3): 340-3.
- Lynen, F. et Wieland, U. (1937). "Über die giftstoffe des Knollenblätterpilzes." *Justus Liebig's Ann. Chem.* **533**: 93-117.
- Mao, F., Leung, W. Y. et Haugland, R. P. (2000). Brevet n° 6130101. Sulfonated Xanthene Derivatives

- McKay, I. C., Forman, D. et White, R. G. (1981). "A comparison of fluorescein isothiocyanate and lissamine rhodamine (RB 200) as labels for antibody in the fluorescent antibody technique." *Immunology* **43**(3): 591-602.
- McKenna, N., Meigs, J. B. et Wang, Y. L. (1985a). "Identical distribution of fluorescently labeled brain and muscle actins in living cardiac fibroblasts and myocytes." *J Cell Biol* **100**(1): 292-6.
- McKenna, N. M., Meigs, J. B. et Wang, Y. L. (1985b). "Exchangeability of alpha-actinin in living cardiac fibroblasts and muscle cells." *J Cell Biol* **101**(6): 2223-32.
- Minty, A. J., Alonso, S., Caravatti, M. et Buckingham, M. E. (1982). "A fetal skeletal muscle actin mRNA in the mouse and its identity with cardiac actin mRNA." *Cell* **30**(1): 185-92.
- Moore, P. B., Huxley, H. E. et DeRosier, D. J. (1970). "Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments." *J Mol Biol* **50**(2): 279-95.
- Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Mujumdar, S. R., Lewis, C. J. et Waggoner, A. S. (1993). "Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters." *Bioconjug Chem* **4**(2): 105-11.
- Nachmias, V. T. (1993). "Small actin-binding proteins: the beta-thymosin family." *Curr Opin Cell Biol* **5**(1): 56-62.
- Norman, A. I., Ivkov, R., Forbes, J. G. et Greer, S. C. (2005). "The polymerization of actin: structural changes from small-angle neutron scattering." *J Chem Phys* **123**(15): 154904.
- Oosawa, F., Maeda, Y., Fujime, S., Ishiwata, S., Yanagida, T. et Taniguchi, M. (1977). "Dynamic characteristics of F-actin and thin filaments in vivo and in vitro." *J Mechanochem Cell Motil* **4**(1): 63-78.
- Ordahl, C. P. (1986). "The skeletal and cardiac alpha-actin genes are coexpressed in early embryonic striated muscle." *Dev Biol* **117**(2): 488-92.
- Otey, C. A., Kalnoski, M. H. et Bulinski, J. C. (1988). "Immunolocalization of muscle and nonmuscle isoforms of actin in myogenic cells and adult skeletal muscle." *Cell Motil Cytoskeleton* **9**(4): 337-48.
- Otterbein, L. R., Graceffa, P. et Dominguez, R. (2001). "The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state." *Science* **293**(5530): 708-11.
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M. K., Millard, P. J., Mao, F. et Leung, W. Y. (1999). "Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates." *J Histochem Cytochem* **47**(9): 1179-88.
- Paterson, B. M. et Eldridge, J. D. (1984). "alpha-Cardiac actin is the major sarcomeric isoform expressed in embryonic avian skeletal muscle." *Science* **224**(4656): 1436-8.
- Peng, I. et Fischman, D. A. (1991). "Post-translational incorporation of actin into myofibrils in vitro: evidence for isoform specificity." *Cell Motil Cytoskeleton* **20**(2): 158-68.
- Perrin, F. (1926). "Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules à l'état excité." *J. Phys. Radium Ser. 6*(7): 390-401.
- Perrin, F. (1929). "La fluorescence des solutions. Induction moléculaire. polarisation et durée d'émission. Photochimie." *Ann. Phys. Ser. 10*(12): 169-275.

- Pollard, T. D. et Cooper, J. A. (1986). "Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions." *Annu Rev Biochem* **55**: 987-1035.
- Pragnon, C., Polard, V., Subra, F. et Auclair, C. (2004). Brevet n° WO2004057337. Method for analyzing tumor aggressivity comprising measurement of polymerized actin
- Raghavan, M., Smith, C. K. et Schutt, C. E. (1989). "Analytical determination of methylated histidine in proteins: actin methylation." *Anal Biochem* **178**(1): 194-7.
- Ravdin, P. et Axelrod, D. (1977). "Fluorescent tetramethyl rhodamine derivatives of alpha-bungarotoxin: preparation, separation, and characterization." *Anal Biochem* **80**(2): 585-92.
- Rettig, W., Strehmel, B., Schrader, S. et Seifert, H. (1999). *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*. Berlin, Springer.
- Schafer, D. A., Hug, C. et Cooper, J. A. (1995). "Inhibition of CapZ during myofibrillogenesis alters assembly of actin filaments." *J Cell Biol* **128**(1-2): 61-70.
- Schwarzenbach, G. (1960). "Relationships between Metal Complex Stability and Structure of Complexing Agents." *Analytical Chemistry* **32**(1): 6-9.
- Selényi, P. (1939). "Wide-angle interferences and the nature of the elementary light sources." *Phys. Rev.* **56**: 477-479.
- Sheterline, P., Clayton, J. et Sparrow, J. (1995). "Actin." *Protein Profile* **2**(1): 1-103.
- Sheterline, P. et Sparrow, J. C. (1994). "Actin." *Protein Profile* **1**(1): 1-121.
- Spencer, R. D. et Weber, G. (1970). "Influence of Brownian rotations and energy tranfert upon the measurment of fluorescence lifetimes." *J. Chem. Phys.* **52**: 1654-1663.
- Steinmetz, M. O., Stoffler, D., Muller, S. A., Jahn, W., Wolpensinger, B., Goldie, K. N., Engel, A., Faulstich, H. et Aebi, U. (1998). "Evaluating atomic models of F-actin with an undecagold-tagged phalloidin derivative." *J Mol Biol* **276**(1): 1-6.
- Stryer, L. (1978). "Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler." *Annu Rev Biochem* **47**: 819-46.
- Tachibana, H., Husimi, Y. et Wada, A. (1977). "Kinetics of the polymerization reaction of tobacco mosaic virus protein: transient-saturation type polymerization reaction." *Biophys Chem* **6**(2): 173-89.
- Tsuboi, K. K. (1968). "Actin and bound-nucleotide stoichiometry." *Biochim Biophys Acta* **160**(3): 420-34.
- Usmanova, A., Astier, C., Mejean, C., Hubert, F., Feinberg, J., Benyamin, Y. et Roustan, C. (1998). "Coevolution of actin and associated proteins: an alpha-actinin-like protein in a cyanobacterium (*Spirulina platensis*)." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **120**(4): 693-700.
- Valdes-Aguilera, O. et Neckers, D. C. (1989). "Aggregation phenomena in xanthene dyes." *Acc. Chem. Res.* **22**: 171-177.
- Valentin-Ranc, C. et Carlier, M. F. (1989). "Evidence for the direct interaction between tightly bound divalent metal ion and ATP on actin. Binding of the lambda isomers of beta gamma-bidentate CrATP to actin." *J Biol Chem* **264**(35): 20871-80.
- Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence : Principle and Applications*, Wiley.

- Valeur, B. et Brochon, J. C. (2001). *New Trends in Fluorescence Spectroscopy. Applications to Chemical and Life Sciences*. Berlin, Springer.
- Vandekerckhove, J., Bugaisky, G. et Buckingham, M. (1986). "Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms." *J Biol Chem* **261**(4): 1838-43.
- Vandekerckhove, J., Lal, A. A. et Korn, E. D. (1984). "Amino acid sequence of *Acanthamoeba* actin." *J Mol Biol* **172**(1): 141-7.
- Visegrady, B., Lorinczy, D., Hild, G., Somogyi, B. et Nyitrai, M. (2004). "The effect of phalloidin and jasplakinolide on the flexibility and thermal stability of actin filaments." *FEBS Lett* **565**(1-3): 163-6.
- Weber, G. (1966). *Polarization of the fluorescence of solutions*. New York, John Wiley & Sons.
- Weeds, A. (1982). "Actin-binding proteins--regulators of cell architecture and motility." *Nature* **296**(5860): 811-6.
- Wessendorf, M. W. et Brelje, T. C. (1992). "Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas red, and cyanine 3.18." *Histochemistry* **98**(2): 81-5.
- Whitaker, J. E., Haugland, R. P., Moore, P. L., Hewitt, P. C. et Reese, M. (1991). "Cascade blue derivatives: water soluble, reactive, blue emission dyes evaluated as fluorescent labels and tracers." *Anal Biochem* **198**(1): 119-30.
- Wieland, T. (1976). "Interaction of phallotoxins with actin." *Adv Enzyme Regul* **15**: 285-300.
- Wieland, T. et Faulstich, H. (1978). "Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms." *CRC Crit Rev Biochem* **5**(3): 185-260.

Matériel et méthodes – Chapitre 1

Sommaire

Matériel	- 52 -
Spectroscopie stationnaire.....	- 52 -
Spectroscopie résolue en temps en cuve	- 53 -
Tampons	- 55 -
Méthodes	- 57 -
Détermination du rendement quantique de fluorescence	- 57 -
Culture cellulaire	- 57 -
Préparation des extraits cellulaires	- 58 -
Dosage des protéines par la méthode de Bradford	- 58 -
Mise en œuvre du test de polymérisation.....	- 59 -
Imagerie de filaments d’actine polymérisés <i>in vitro</i>	- 60 -
Marquage des filaments d’actine de cellules fixées	- 61 -
Références	- 63 -

Table des illustrations

Figure 30 : Montage expérimental	- 53 -
Figure 31 : Reconstruction du déclin de fluorescence par comptage monophotonique.....	- 55 -
Figure 32 : Bleu de Coomassie.	- 58 -
Figure 33 : Courbe d’étalonnage du dosage de Bradford.....	- 59 -
Figure 34 : Microscope confocal.....	- 61 -
Figure 35 : Triton-X100	- 61 -
Figure 36 : Cliché en microscopie confocale d’une cellule NIH 3T3 fixée et marquée par la phalloïdine-Alexa488	- 62 -

Matériel

Spectroscopie stationnaire

Les spectroscopies stationnaires d'absorption, d'émission et d'excitation de fluorescence ont principalement été étudiées sur trois instruments.

Les spectres d'absorption UV-Visible ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Cary 500 (Varian, Palo Alto, CA, USA) double faisceau. Le domaine spectral des deux lampes (arc deutérium pour l'UV et halogène au tungstène pour le visible) s'étend entre 175 et 3300 nm. Les cuves utilisées, qui sont les mêmes que celles utilisées en fluorescence, sont des cuves en quartz de chez B. Thuet (Bodelsheim, France) de trajet optique 1 cm et de volume 4 mL ou 400 μ L. Dans le cas des cuves amincies, les quatre faces restent polies et transparentes.

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont été réalisés avec un Spex-Fluorolog 3 (Jobin-Yvon/Horiba, Kyoto, Japon). Dans ce spectrofluorimètre en L, l'excitation est effectuée par une lampe à arc xénon qui émet entre 200 et 900 nm. Les longueurs d'ondes à l'excitation comme à l'émission sont sélectionnées par des monochromateurs constitués de réseaux blazés de 1200 traits. mm^{-1} . Les bandes passantes de ces monochromateurs sont ajustées au moyen de fentes amovibles entre 0,25 et 5 mm. La fluorescence est collectée perpendiculairement à l'excitation par un photomultiplicateur refroidi par un étage Peltier. Afin d'éviter les effets de réabsorption de la fluorescence, les échantillons étudiés ont toujours une densité optique inférieure à 0,1 à la longueur d'onde d'excitation de la fluorescence. Les spectres sont, de plus, corrigés de la variation spectrale de la sensibilité de détection. Pour les mesures en polarisation, deux polariseurs pivotants sont adaptés, à l'excitation et à la collection, et sont orientés verticalement ou horizontalement.

Les cinétiques d'anisotropie stationnaire sont mesurées sur un Beacon 2000 de chez PanVera (Madison, WI, USA) qui mesure successivement, après une excitation sélectionnée à 490 nm, l'émission à 520 nm selon les deux polarisations. Les échantillons de volume très faible (200 – 500 μ L) sont placés dans des petits tubes cylindriques en verre.

Spectroscopie résolue en temps en cuve

Le montage de comptage à photon unique utilisé pour la mesure des déclins de fluorescence des espèces (chromophore ou actine) en solution est présenté sur la figure 30 suivante :

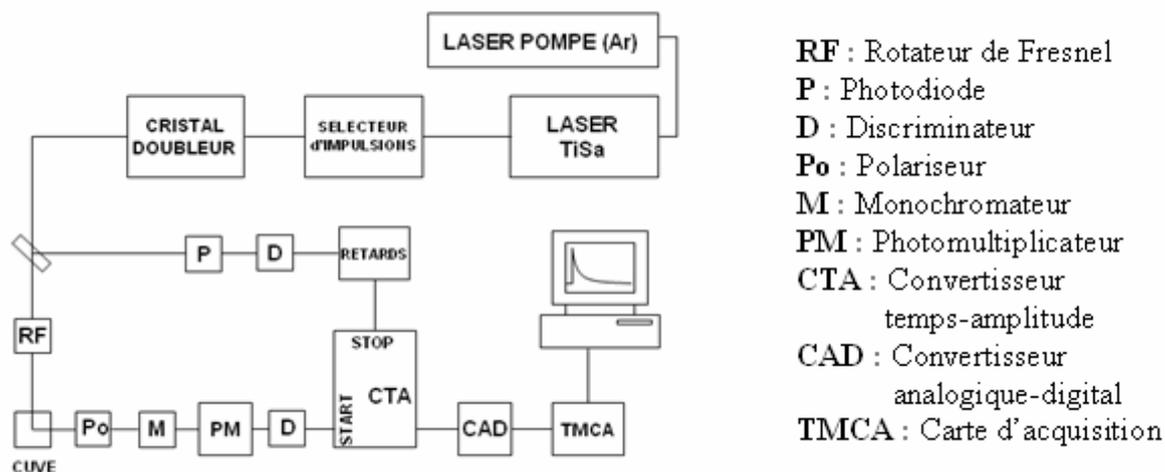


Figure 30 : Montage expérimental

La source impulsionnelle utilisée est un laser Tsunami (Spectra Physics, Mountain View, CA, USA) à modes bloqués constitué d'un cœur de saphir dopé par des ions titane. Il est pompé par un laser à argon ionisé BeamLock. Les impulsions délivrées, avec un taux de répétition de 82 MHz et une polarisation verticale, ont une largeur à mi-hauteur de 1,3 ps et ont une longueur d'onde de 990 nm (ce laser est accordable entre 700 et 1000 nm).

Le taux de répétition est ensuite abaissé à 4 MHz par un sélecteur d'impulsions acousto-optique. On a ainsi une impulsion toutes les 250 ns ce qui permet l'étude de molécules ayant des durées de vie de fluorescence assez longues sans risquer que les molécules ne soient réexcitées avant de s'être complètement relaxées.

Le faisceau traverse alors un module comportant un cristal de lithium triborate (LiB_3O_5) qui possède un excellent rendement de génération de second harmonique. La fréquence est ainsi doublée pour obtenir une longueur d'onde moitié dans le visible de 495 nm (dans la bande 350 – 500 nm) qui correspond au maximum de la bande d'absorption de l'Alexa488. La polarisation en sortie du cristal est alors horizontale.

Le faisceau laser traverse alors un rotateur de Fresnel (RF) qui permet de faire tourner le plan de polarisation. On peut ainsi exciter l'échantillon suivant une polarisation verticale ou

horizontale. On peut également se placer à la position dite de l'angle magique, angle pour lequel la polarisation n'a pas d'effet sur le déclin. Cette position permet de mesurer les durées de vie en s'affranchissant de la polarisation.

La fluorescence émise par l'échantillon ainsi excité est alors détectée perpendiculairement après passage par un polariseur qui choisit la polarisation mesurée (horizontale, verticale ou angle magique) puis un monochromateur à réseau holographique (Jobin-Yvon/Horiba, H10) ou par un filtre passe-haut ayant une fréquence de coupure légèrement au-delà de la longueur d'onde du laser afin d'éliminer les réflexions du laser tout en laissant passer la fluorescence émise. Les photons de fluorescence sont détectés par un photomultiplicateur (PM) à galette de microcanaux (Hamamatsu Multi Chanel Plate R3809U) qui les convertit en électrons par effet photoélectrique. L'électron ainsi décroché de la cathode est converti en une avalanche de quelques 10^7 électrons par un système de dynodes. Les avalanches ayant une amplitude suffisante sont sélectionnées par un discriminateur (D) à fraction constante qui permet de négliger une partie du bruit et des impulsions parasites. La dénomination « à fraction constante » signifiant que le discriminateur déclenche sur le maximum de l'impulsion. A la sortie du discriminateur, le signal électrique est envoyé au convertisseur temps-amplitude (CTA, Tennelec TC864) en déclenchant le signal START.

Dans le même temps, une partie du faisceau laser est envoyée sur la photodiode (P). L'impulsion issue de la photodiode, sélectionnée par un autre discriminateur (D) et retardée (par une série de retards connus et réglables) est également envoyée sur le CTA et constitue le signal STOP. Pour que l'impulsion de la photodiode arrive sur le chronomètre après le START celle-ci est retardée dans une série de câbles jusqu'à un retard de 160 ns. L'amplitude du signal de sortie du CTA est d'ailleurs proportionnelle à ce retard. Il est alors numérisé par un convertisseur analogique digital (CAD) puis acquis par l'ordinateur au moyen d'une carte d'acquisition (TMCA). Au niveau de la numérisation, on définit également le nombre de canaux (temporels) sur lequel est ensuite reconstruit le déclin. Les photons ayant un retard compris entre $n\delta t$ et $(n+1)\delta t$ sont comptés dans le $n^{\text{ième}}$ canal. L'histogramme du nombre de photons comptés par chacun des canaux reconstruit le déclin de la fluorescence.

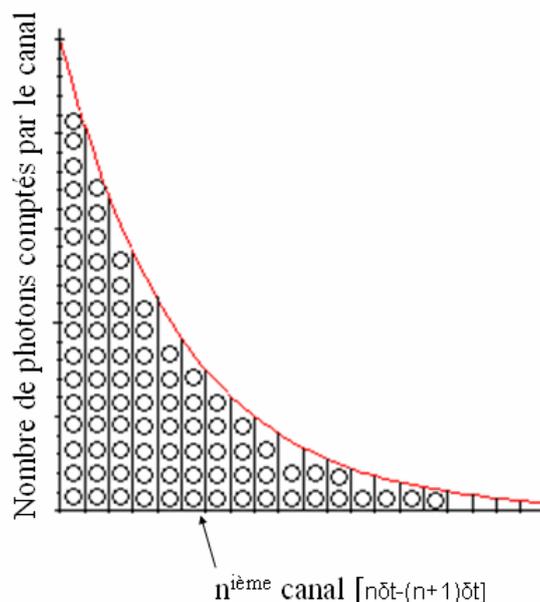


Figure 31 : Reconstruction du déclin de fluorescence par comptage monophotonique

Tampons

Les compositions des tampons utilisés dans les expériences et les préparations des échantillons sont les suivantes :

Tampon G	
Tris, HCl	5 mM
CaCl ₂	0,2 mM
DTT	0,2 mM
ATP	0,2 mM
pH	8,1

Ce tampon G est le tampon classiquement utilisé pour travailler sur l'actine G (Pollard et Cooper 1986). La force ionique de ce tampon est fixée par la molécule Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane). Le pH est ajusté à 8,1 par ajout d'acide chlorhydrique (HCl). Le DTT (dithiothréitol) est un réducteur qui permet de conserver les protéines en prévenant la formation de ponts disulfures (Cleland 1964).

Tampon de polymérisation (50X)	
KCl	2,5 M
MgCl ₂	50 mM
ATP	25 mM

Ce tampon, dit de polymérisation, comporte les constituants nécessaires à la polymérisation de l'actine *in vitro*, en particulier les cations divalents (Mg²⁺) (Pollard 1976). Il est ici 50 fois plus concentré que les concentrations finales attendues des différents constituants afin de pouvoir faire des petits ajouts dans les échantillons étudiés.

Tampon de lavage	
NaCl	135 mM
KCl	2,7 mM
NaHCO ₃	11,9 mM
NaH ₂ PO ₄	0,2 mM
MgCl ₂	2 mM
EGTA	0,2 mM
Glucose	5,5 mM
Albumine	0,3 %
pH	6,5

Tampon de sonication	
Tris, HCl	10 mM
EGTA	10 mM
MgCl ₂	2 mM
pH	7,5

Ces deux derniers tampons sont utilisés dans les différentes étapes de préparation des extraits cellulaires.

Méthodes

Détermination du rendement quantique de fluorescence

La détermination du rendement quantique de fluorescence se fait par comparaison des spectres d'émission de la molécule d'intérêt avec une référence dont le rendement quantique est connu. On choisit comme fluorophore de référence une molécule dont l'émission est proche de celle dont on cherche à déterminer le rendement quantique. On choisit ici naturellement la fluorescéine en milieu basique dont le rendement de fluorescence est de 0,92 dans l'eau (Magde *et al.* 2002). On ajuste ensuite les concentrations des deux chromophores afin d'avoir des absorptions maximales semblables et inférieures à 0,1 afin d'éviter les effets de filtre interne. On calcule alors le rendement quantique de fluorescence inconnu par la formule 36 :

$$\Phi_{Alexa} = \Phi_{Fluorescéine} \frac{S_{Alexa}}{S_{Fluorescéine}} \frac{A_{fluorescéine}}{A_{Alexa}} \left(\frac{n_{Alexa}}{n_{fluorescéine}} \right)^2 \quad (36)$$

où Φ est le rendement quantique, S est l'intégrale sous la courbe des spectres d'émission de fluorescence et n l'indice de réfraction du solvant (ici, l'eau).

Culture cellulaire

La lignée NIH 3T3 de fibroblastes murins immortalisés est une lignée commerciale distribuée par ATCC (CRL1658). La lignée tumorale 3T3-EF a été fournie au laboratoire par Jacques Ghysdael du Laboratoire d'Oncologie Virale et Cellulaire d'Orsay. Ces cellules ont été obtenues par transfection stable de l'ADN codant pour la protéine de fusion EWS-Fli1 dans les fibroblastes 3T3. Ces deux lignées cellulaires sont cultivées dans du milieu de Eagle modifié par Dubelco (DMEM : Dubelco's Modification of Eagle Medium) supplémenté par 10 % de sérum de veau nouveau-né ainsi que deux antibiotiques (la pénicilline et la streptomycine) dans un incubateur à 37 °C et une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. La construction du plasmide de transfection des 3T3-EF comporte de plus un gène de résistance à la puromycine qui permet de sélectionner, par ajout de cet antibiotique, les cellules ayant intégré l'oncogène dans leur génome.

Préparation des extraits cellulaires

Les cellules en culture sont tout d'abord lavées au PBS (Phosphate Buffered Saline), décollées de la boîte par trypsination puis reprises dans du DMEM contenant 10% de sérum de veau. Elles sont alors collectées par centrifugation puis lavées deux fois par du tampon de lavage. On les compte alors sur cellule de Malassez et on les reprend dans du tampon de sonication à raison de 50 millions de cellules par millilitre de tampon. On ajoute alors un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche) afin de prévenir la détérioration de la protéine par des protéases présentes dans l'extrait.

On sonique alors les cellules sur la glace au cours de dix séquences de 10 secondes entrecoupées par 30 secondes d'arrêt du sonicateur (Vibracell, Novodirect). Cette sonication a pour effet de casser les membranes cellulaires qui sont alors collectées par une centrifugation d'une demi-heure à 6900 g. Le surnageant, qui contient les protéines solubles dont l'actine, est filtré à 0,45 µm (Millipore). La quantité totale de protéine est déterminée par la méthode de Bradford (cf. ci-dessous) et on supplémente le lysat cellulaire obtenu par 1mM d'ATP et de DTT pour 5 mg.mL⁻¹ de protéines.

Dosage des protéines par la méthode de Bradford

La concentration totale en protéine du lysat cellulaire est déterminée par la technique mise au point par Bradford (Bradford 1976). Cette technique utilise du bleu de Coomassie qui a la propriété de s'adsorber sur les protéines de manière non spécifique et indépendamment de leur séquence. Cette adsorption s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption de la molécule qui est décalé vers le bleu.

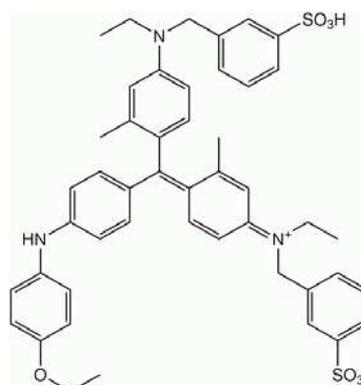


Figure 32 : Bleu de Coomassie.

On réalise une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA) dont on mesure l'absorption à 590 nm. La courbe de référence est une droite qui présente une rupture de pente. La mesure de l'absorption du lysat cellulaire permet de déterminer la concentration en protéine totale de chaque préparation d'échantillon.

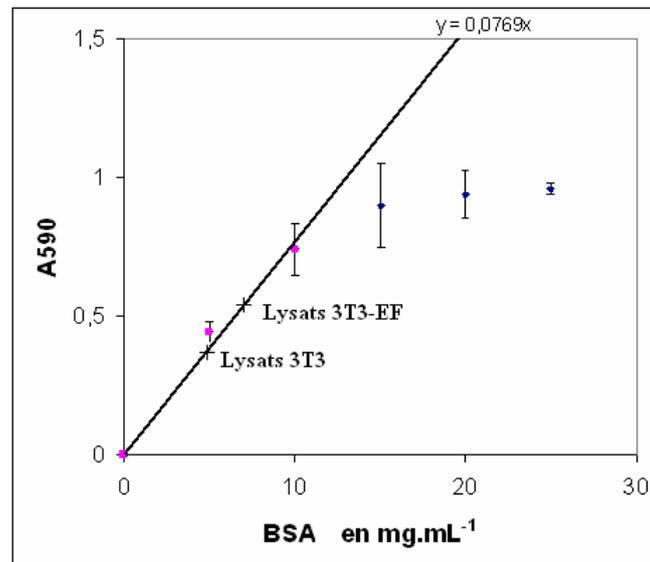


Figure 33 : Courbe d'étalonnage du dosage de Bradford

Mise en œuvre du test de polymérisation

Les conditions de routine déterminées pour la mise en œuvre de ce test sont particulièrement favorables à la polymérisation de l'actine *in vitro*. Ainsi, la concentration en actine purifiée (ou en protéines totales dans le cas des extraits cellulaires) est largement supérieure aux concentrations critiques de polymérisation de l'actine.

Les échantillons étudiés au Beacon ont généralement un volume de 200 μ L. On présente ici le protocole d'un échantillon standard, les concentrations étant susceptibles d'être modifiées en fonction des paramètres soumis à l'étude.

Dans un premier temps, on prépare une solution d'actine (ou d'extraits cellulaires) à une concentration de 0,2 mg.mL⁻¹ dans du tampon G. Cette concentration correspond pour l'échantillon d'actine purifiée à 24 μ M. On rajoute 5 % d'actine marquée (0,01 mg.mL⁻¹; 1,2 μ M). On mesure l'anisotropie de cet échantillon qui sera par la suite soustraite aux mesures de la cinétique afin d'obtenir la variation de l'anisotropie. Au temps 0 de la cinétique, on ajoute le tampon de polymérisation puis on mesure l'anisotropie toutes les 10 secondes

pendant quelques minutes jusqu'à arriver sur le plateau d'anisotropie qui correspond à l'état stationnaire de la polymérisation.

Polymérisation d'actine purifiée	Volume
Tampon G	184 μL
Actine purifiée (stock à 5 mg.mL ⁻¹)	8 μL
Actine-Alexa488 (stock à 0,1 mg.mL ⁻¹)	4 μL
<i>puis</i>	
Tampon de polymérisation 50X	4 μL

Polymérisation d'extraits cellulaires	Volume
Tampon G	172 μL
Extrait cellulaire (stock à 2 mg.mL ⁻¹)	20 μL
Actine-Alexa488 (stock à 0,1 mg.mL ⁻¹)	4 μL
<i>Puis</i>	
Tampon de polymérisation 50X	4 μL

Imagerie de filaments d'actine polymérisés *in vitro*.

Deux étapes sont nécessaires à l'observation de filaments d'actine polymérisés *in vitro* en microscopie confocale. Dans un premier temps, on réalise un dépôt de polylysine sur les lames afin d'en charger la surface positivement pour fixer les filaments électrostatiquement. Ensuite, on effectue un marquage des filaments par de la phalloïdine-Alexa488 avant de les déposer sur les lames.

On commence par délimiter sur la lame des zones avec un crayon hydrophobe (Dakopen). On dépose alors une solution de poly-L-lysine diluée dix fois dans de l'eau distillée. On laisse alors incuber pendant une demi-heure à 37 °C avant de la rincer à l'eau distillée et de la laisser sécher.

Pour le marquage, on prélève 100 μL de l'échantillon polymérisé qu'on laisse incuber avec 4 μL de phalloïdine-Alexa488 pendant 20 minutes à température ambiante. On dépose ensuite cet échantillon sur la surface recouverte par la polylysine et on laisse sédimenter pendant une heure à 37 °C. On réaspire ensuite délicatement 50 μL avant de déposer la lamelle et de la sertir.

On réalise ensuite l'imagerie de ces lames sur le microscope confocal (SP2 de chez Leica) en excitant la fluorescence de l'Alexa488 par un laser continu à Argon (488 nm) et en observant au moyen d'un objectif X63 à immersion à huile. (figure 34)



Figure 34 : Microscope confocal

Marquage des filaments d'actine de cellules fixées

Les cellules sont mises en culture sur des lames de verre portant des chambres de culture cellulaires amovibles (Labtek) pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite lavées par du tampon PBS puis fixées par une solution de paraformaldéhyde à 3% (15 min, 500 μ L par loges). Au cours de cette étape, la cellule est tuée mais sa morphologie est préservée par formation de ponts méthylène entre différentes protéines (Fox *et al.* 1985).

La seconde étape est une étape de perméabilisation de la membrane cellulaire par un détergent, ici le Triton X100 (Octylphénoxy polyéthoxyéthanol, 0,1% dans du PBS, 200 μ L, 10 min). Cette molécule amphiphile va s'insérer dans la bicouche phospholipidique qui constitue la membrane de la cellule et la déstructurer afin de permettre le passage des marqueurs fluorescents.

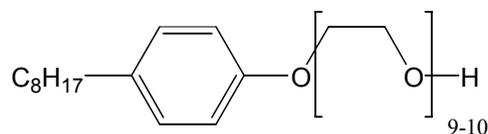


Figure 35 : Triton-X100

L'étape suivante est une étape de saturation à l'albumine de sérum bovin. On utilise une solution à 1% massique de cette protéine dans du PBS. Cette protéine a une bonne affinité pour de nombreux sites cellulaires qu'elle va alors saturer au cours des 15 minutes d'incubation. Le marqueur utilisé par la suite, qui est, quant à lui, spécifique des filaments

d'actine, ne pourra donc pas se fixer n'importe où et ceci afin d'éviter le bruit de fond lié au marquage non spécifique.

On peut alors incuber les cellules avec la phalloïdine-Alexa488 ($C = 0,1 \mu\text{M}$) pendant 45 minutes à l'obscurité. Par la suite, on pratique plusieurs lavages soigneux afin d'éliminer les phalloïdines non fixées aux filaments afin de limiter une nouvelle fois d'avoir un fond de fluorescence non spécifique.

Il ne reste plus alors qu'à fixer la lamelle et à sertir le tout avant de procéder aux observations en microscopie confocale. Un cliché de NIH 3T3 marqué d'après ce protocole est présenté sur la figure suivante.

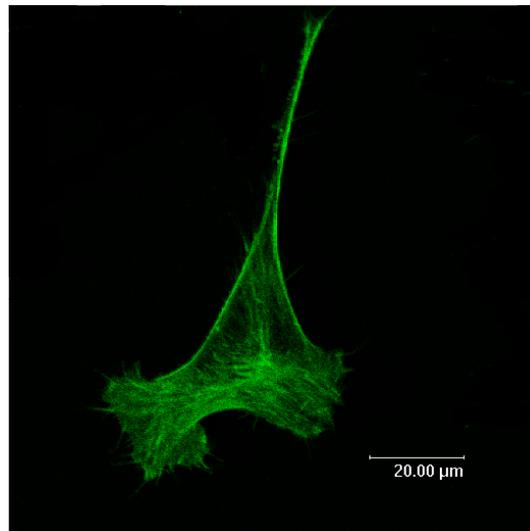


Figure 36 : Cliché en microscopie confocale d'une cellule NIH 3T3 fixée et marquée par la phalloïdine-Alexa488

Références

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.

Cleland, W. W. (1964). "Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups." *Biochemistry* **3**: 480-2.

Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J. et Roller, P. P. (1985). "Formaldehyde fixation." *J Histochem Cytochem* **33**(8): 845-53.

Magde, D., Wong, R. et Seybold, P. G. (2002). "Fluorescence quantum yields and

their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: improved absolute standards for quantum yields." *Photochem Photobiol* **75**(4): 327-34.

Pollard, T. D. (1976). "The role of actin in the temperature-dependent gelation and contraction of extracts of *Acanthamoeba*." *J Cell Biol* **68**(3): 579-601.

Pollard, T. D. et Cooper, J. A. (1986). "Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions." *Annu Rev Biochem* **55**: 987-1035.

Le travail présenté dans le chapitre 1 a fait l'objet d'une communication orale :

Utilisation de l'anisotropie de fluorescence pour le suivi de la polymérisation de l'actine.
Journées d'Automne de Photochimie. Réunion du Groupe Français de Photochimie. Cachan,
France. 18 Novembre 2004.

Il a de plus été soumis pour publication dans la revue *Analytical Biochemistry*. Le manuscrit est présenté ci-après.

Evaluation of cellular actin dynamics by measurement of fluorescence anisotropy

*Valérie Polard^{‡, §, 1}, Jean-Alexis Spitz^{‡, //, 1}, Frédéric Subra[‡], Catherine Baratti-Elbaz[‡], Rachel Méallet-Renault^{//}, Patrick Tauc[‡], Robert B. Pansu^{//}, Andréi Maksimenko^{‡, §}, and Christian Auclair^{‡, *}*

‡ - Laboratoire de Biotechnologie et Pharmacologie génétique Appliquée (LBPA) UMR 8113, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 61 Avenue du Président Wilson, Cachan, France

// - Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (PPSM) UMR 8531, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 61 Avenue du Président Wilson, Cachan, France

§ - BioAlliance Pharma, 59 boulevard du Général Martial Valin, Paris, France

Short title: Fluorescence anisotropy to measure actin polymerization

* To whom correspondence should be addressed: E-mail: auclair@lbpa.ens-cachan.fr. Telephone: 33 (0)1 47 40 76 70. Fax: 33 (0)1 47 40 76 71.

ABSTRACT: Using G-actin-Alexa as a probe, we have developed a simple cell-free system based on fluorescence anisotropy measurement that permits the study of cellular actin dynamics. We have demonstrated that in cytosolic fractions, anisotropy enhancement reflects the F-actin elongation process allowing the measure of apparent polymerization constants and steady state equilibria of F-actin to G-actin ratios. We have shown that anisotropy enhancement is modulated with respect to magnesium and calcium cation concentrations. The assay provides information on the overall status of actin dynamics in cells and allows the characterization of products known to modify actin dynamics such as cyclic peptides including the phalloidin derivatives, Jasplakinolide and Dolastatin 11. This assay is a new powerful tool to screen compounds acting as actin dynamics modulators either through direct interaction with cellular actin or through interaction with actin dynamics regulatory proteins present in the cytosolic fractions.

KEYWORDS: actin cytoskeleton, fluorescence anisotropy, polymerization

In eukaryotic cells, the actin network is essential to cell motility, cell-cell adhesion, cell adhesion to extracellular matrix, phagocytosis, exocytosis and endocytosis [1]. Moreover, the actin cytoskeleton plays a critical role in the regulation of various processes linked to malignant transformation including cell division [2-4], adhesion [5, 6], contact inhibition, and apoptosis [5, 7, 8]. Disruption of actin filaments and decrease in focal adhesions are common features of transformed cells. Actin remodelling, corresponding to shifts in F-actin to G-actin ratio, which can be regulated by actin signalling proteins implicated in oncogenic signal transduction pathways, the most important being the ras-related superfamily of small GTPases [9-11].

With regard to the key roles of actin dynamics in cells, it is of major interest to develop simple tools allowing i) the characterization of actin dynamic status in cells and ii) the identification of molecules which may act as modulators of actin dynamics either by a direct interaction with actin or through interaction with regulatory proteins.

Following this line of thoughts, we propose a new actin polymerization assay based on the measurement of static fluorescence anisotropy of an actin-Alexa conjugate. The assay allows the investigation of cellular actin dynamics in cytosolic fractions and allows definitions of the pseudo first order rate constant of actin filament elongation and the steady state value of F-actin to G-actin ratio.

The use of cytosolic fractions from malignant 3T3 fibroblasts (3T3 expressing the oncogenic fusion protein EWS-Fli1) characterized by a highly disorganized actin cytoskeleton [12] allows the screening of molecules able to enhance the actin polymerization rate constant and/or the F-actin to G-actin ratio.

MATERIAL AND METHODS

Reagents - AlexaFluor488 carboxylic acid succinimidyl ester (A20000), AlexaFluor488-Phalloidin (A12379) and AlexaFluor488-Actin (A12373) were purchased from Molecular Probes, (Eugene, OR USA). Poly-L Lysine and spectrophotometric-grade solvents were from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO USA). Purified rabbit muscle actin (AKL99-A) was purchased from Cytoskeleton (Denver, CO USA).

Apparatus - UV-visible spectra were recorded on a Varian Cary (Palo Alto, CA USA) double beam spectrometer using a 10 mm path quartz cell from Thuet (Bodelsheim, France). Fluorescent spectra (emission and

excitation) were recorded on a Jobin Yvon (Edison, NJ USA) Fluorolog-3 fluorimeter. The static fluorescence anisotropy signal was obtained with a PanVera Beacon 2000 (Madison, WI USA), using a 490 nm excitation and a 520 nm emission wavelengths. The fluorescence decay curves were obtained with a time-correlated single-photon-counting method using a titanium-sapphire laser (82 MHz, repetition rate lowered to 4 MHz using a pulse-peaker, 1 ps pulse width, doubling crystal to reach 495 nm excitation) pumped by an argon ion laser from Spectra Physics (Mountain View, CA USA). Confocal microscopy imaging was carried out on a laser scanning spectral confocal microscope TCS SP2 from Leica Microsystems (Wetzlar, Germany).

Cell culture - The NIH 3T3 murine fibroblast cell line was purchased from ATCC (CRL1658). The EWS-Flt1-transformed NIH 3T3 cell line (NIH 3T3 EF) was a gift from Dr J. Ghysdael (Orsay, France). These cells are NIH 3T3 fibroblasts that have been stably transduced by the cDNA encoding the type1 EWS-Flt1 fusion protein inserted downstream of the Mo-MuLV long terminal repeat in the pBabe-puro retroviral vector. These cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagles' Medium (DMEM) supplemented with 10% heat inactivated newborn calf serum, 100 UI/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (all from Gibco BRL) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. NIH 3T3 EF cells were selected with 2.5 µg/mL puromycin (Sigma).

Preparation of cell extracts - Cells were trypsinised and washed 2 times at room temperature with pH 6.5 washing buffer (135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 11.9 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 5.5 mM glucose and 0.3 % BSA) [13]. $5 \cdot 10^7$ cells were resuspended in sonication buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂)[13] containing a complete protease inhibitors mixture (Roche). Cells were lysed on ice by minimal sonication required to break the cells (Vibracell Novodirect) and centrifuged at 6900g for 30 min at 4°C. The cleared supernatant was carefully removed and passed through a 0.45µm filter. The protein concentration was determined using the Bradford method (Biorad). The supernatant was supplemented with 150 mM sucrose, 0.2 mM ATP, and 0.2 mM DTT were added per mg.mL⁻¹ of total proteins. The cellular extracts were aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C. Extracts can be frozen at -80°C without loss of activity and storing on ice allowed assays to extend over 4-5 h without alterations in anisotropy measurements.

Actin-Alexa488 mediated steady state fluorescence anisotropy measurement assays - All reactions were carried out at 22°C and the fluorescence anisotropy signal was recovered at 520 nm with excitation at 490 nm in a Beacon 2000. Actin-Alexa488 was ultracentrifuged at 150000g for 2 h at 4°C to sediment residual actin polymers. The fluorescence remaining in the supernatant was considered to be most likely due to monomers or small actin filaments (5-10 monomers) that do not pellet under conditions described previously [14]. 80% of the supernatant was recovered, and the concentration was defined using fluorescence measurements (excitation at 490 nm and signal recovery at 520 nm). The ultracentrifuged actin concentration was calculated using the non centrifuged actin-Alexa488 as a standard. The supernatant was aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Before experiment, an aliquot of ultracentrifuged Actin-Alexa488 was diluted to a concentration of 1 mg/mL in G buffer (5 mM Tris pH 8.1, 2 mM CaCl₂, 0.2 mM DTT, and 0.2 mM ATP). 3 µL of diluted actin-Alexa488 was then mixed in 167 µL G buffer and actin monomers anisotropy was measured before the addition of 4 µL of polymerization buffer (2.5 M KCl, 50 mM MgCl₂, 25 mM ATP) and 20 µL of cellular extract with a concentration of 2mg.mL⁻¹ of total protein. Measurements were made every 10 s for a 200 s period. Actin monomers anisotropy value was subtracted, yielding the anisotropy enhancement (Δ AU). The data were fitted with the equation $Y = Y_{max}[1 - \exp(-k.X)]$. The curves start at zero and ascend to Y_{max} that corresponds to the steady state anisotropy value (Δ AU), with a rate constant k. For the studies of depletion in calcium or magnesium ions, other buffers were prepared. To eliminate exogenous sources of magnesium ions, the sonication buffer and the polymerization buffer were prepared without MgCl₂. To eliminate calcium ions in the experiments, G buffer was prepared without CaCl₂.

In vitro microfilament imaging - Purified G actin (0.2 mg.mL⁻¹) was allowed to polymerize for 15 minutes at 37°C, in a polymerizing buffer (KCl, MgCl₂, ATP). Phalloidin-AlexaFluor488 was added at 0.15 µM final concentration and allowed to bind to F actin for 20 minutes at 37°C. Samples were then dropped carefully onto a poly L-lysine coated glass slide and incubated for a further 60 minutes at 37°C to allow adsorption on the poly L-Lysine coated surface. The slide was then mounted with a cover slip and examined by confocal microscopy.

RESULTS

Fluorescence properties of Alexa488 - Alexa488 is a rhodamine derivative which displays a high fluorescence quantum yield of 0.96 in water and a remarkable resistance to photobleaching. The

spectroscopy of this dye is as expected showing a thin absorption band centered on 493 nm in water and a maximum fluorescence emission at 518 nm. The study of Alexa488 in different solvents of different viscosities demonstrated that it could be used as a motion probe because of its anisotropy changes. Indeed, both stationary and time-resolved anisotropy characteristic constants are fairly well correlated to viscosity as shown in Table 1.

The time resolved anisotropy function, $r(t)$, was calculated (without deconvoluting the instrument response function) from the Perrin equation [15, 16]: $r(t) = \frac{I_{vh} - G * I_{hh}}{I_{vh} + 2 * G * I_{hh}}$ where $G = \frac{I_{vv}}{I_{vh}}$ is the apparatus function and I_{xy} are the four geometric components of the fluorescence polarization with the first index standing for excitation and the second for emission. (v=vertical, h=horizontal). This anisotropy decay is then fitted by a monoexponential function whose characteristic time is the rotational diffusion time ($\tau_{\text{rotational diffusion}}$).

Fluorescence anisotropy of Actin-Alexa488 complexes - Using similar experimental conditions and data treatment as described above, we measured first of all the fluorescence anisotropy parameters of G-Actin-Alexa488 dissolved in aqueous medium and then in the presence of increasing concentration of glycerol. In aqueous medium (G buffer), Alexa488 covalently bound to G-Actin displays a rotational diffusion time of 0.36 ns (figure 1) which is a slightly higher value than the one observed with free Alexa488 (0.17 ns). This rather low rotational diffusion time value is consistent with a rapid rotational motion of Alexa488 coming from the flexibility of the chain which links Alexa488 to actin. We performed further time resolved spectroscopy measurements of actin-Alexa488 dissolved in G buffer containing 5, 25 or 50% glycerol (figure 1).

As expected, the rotational diffusion index increases with glycerol concentration which reflects the decrease of the rotational motion due to increased viscosity of the medium. We finally promote G-actin polymerization in a medium containing 5% G-actin-Alexa488/95% unlabeled G-actin. We found that the stationary anisotropy value increased upon actin polymerization up to 165 AU whereas the average characteristic time of the anisotropy decay shows an evolution similar to actin polymerization up to a value of 2.30 ns. The increase in the fluorescence anisotropy signal and rotational diffusion index

clearly show that when inserted in an actin filament, actin-Alexa488 is subjected to more limited motion, compared to the monomeric actin-Alexa488 form. The extent of increase of the anisotropy signal was assessed to be sufficient for measuring actin dynamics parameters under various conditions.

Fluorescence anisotropy enhancement reflects actin dynamics in NIH-3T3 fibroblast cytosolic fractions. - Using the standard operating conditions as described in methods, we have measured the kinetics of the static fluorescence anisotropy signal upon actin polymerization in cytosol of NIH-3T3 fibroblasts. The typical curve obtained is shown in Figure 2a and fits to a single exponential which is consistent with pseudo first order kinetics. This kinetic is expected from the measurement of an elongation process, the concentration of actin growing filaments remaining constant during the reaction. Fluorescence microscopy imaging confirms the formation of actin filaments formation under the assay conditions used. The actin filaments which formed were stained with Phalloidin-Alexa488 that binds specifically and with a high affinity to F, but not to G-actin [17]. After 10 min at room temperature under polymerization conditions, we observed long and non branched filaments arranged in a parallel manner (figure 2b(ii)). Moreover, no actin filaments are observed in the absence of polymerization buffer in the reaction mixture (figure 2b(i)).

Steady state fluorescence anisotropy experiments were performed in the presence of various protein concentrations of NIH 3T3 cytosolic fraction ranging from $25\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 0.5mg.mL^{-1} (final protein concentration in reaction mixtures). Increasing the amount of proteins increased the steady state value and k values up to 0.2mg.mL^{-1} and 0.3mg.mL^{-1} respectively. Above these values, we observed a stabilization of Δ AU and k values (table 2).

The plateaus of steady state values at concentration up to 0.2mg.mL^{-1} suggests that under these conditions and at the steady state, most of the actin-Alexa488 is incorporated in the actin filaments indicating in turn that the polymerization process is highly favoured. The plateau observed with the rate constant values up to 0.5 mg.mL^{-1} of proteins suggests that at high actin concentration, a rate limiting

factor controls the elongation process. For concentrations inferior to this saturating limit, we can evaluate a second order kinetics constant of approximately $0.36\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{mL}$ (Table 2-b).

The effect of divalent cations depletion on actin dynamics in NIH 3T3 cytosolic fraction - The actin polymerization is well known to be highly dependent of the presence of divalent cations such as magnesium and calcium ones [18-20]. In the standard assay, calcium and magnesium ions were provided by the polymerization buffer as well as being present in cytosolic fractions of the cells. In a test assay, the decrease in the concentration of these cations should significantly impair the actin polymerization process. As shown in figure 3, polymerization buffer without magnesium ions results in a slight decrease in the F-actin steady state value and in the rate constant. Polymerization buffer without calcium ions induced a more important effect on both steady state and rate constant: both steady state value and k were decreased respectively to 40 AU and 0.035s^{-1} .

We have further investigated the requirement of divalent cations for F-actin elongation process by measuring the fluorescence anisotropy kinetics in the presence of increasing concentration of the chelating agent EDTA.

Figure 4 shows that 1 mM EDTA has only a slight effect on anisotropy kinetics and that in contrast addition of 5 mM EDTA markedly decreases rate constant and steady state values and addition of 10 mM EDTA completely suppresses the anisotropy signal. F-actin microscopy imaging shows as expected that in the presence of 10 mM EDTA, F-actin fibers were no longer detected (data not shown). All these experiments demonstrate that the increase in anisotropy signal is a reflection of the F-actin elongation process.

Actin dynamics in malignant NIH 3T3-EF fibroblasts - NIH 3T3-EF cells are immortal murine NIH 3T3 fibroblasts which have been transfected by the oncoprotein EWS-Fli1 (EF) responsible for Ewing sarcoma [21]. NIH 3T3-EF which display a malignant phenotype, are characterized by a major

breakdown of the actin network organization, resulting in a polarized spindle cell shape, disappearance of stress fibers, loss of cell-cell adhesion and increased motility. In NIH 3T3-EF, actin network alterations are mainly due to zyxin downregulation [12]. Actin dynamics of cytosolic fractions analyzed in NIH 3T3 and NIH 3T3-EF have been compared using fluorescence anisotropy measurement. Experimental data shown in figure 5 indicate that in the NIH 3T3-EF cytosolic fraction, the F-actin elongation process is markedly impaired as indicated by a lower rate constant (0.039 s^{-1} instead of 0.078 with NIH 3T3) and a lower F-actin steady state value (42 AU instead of 63 AU in NIH 3T3).

This experiment clearly demonstrates that the assay allows discrimination of the actin dynamics status of cells. In the present case, the impairment of zyxin gene expression - a protein directly involved in actin dynamics - is observed by the decrease of both F-actin elongation rate constant and F-actin steady state values. These changes are consistent with the known role of zyxin which promotes actin polymerization and stabilizes F-actin. It is of interest to notice that the transfection of the zyxin gene in NIH 3T3-EF results in the recovery of dynamics parameters values close to those measured in NIH 3T3 cells[12].

Effect of Jasplakinolide and Dolastatin 11 on actin dynamics measured using NIH 3T3-EF cytosolic fraction - As stated above, NIH 3T3-EF display, compared to native NIH 3T3 cells, lower pseudo first order rate constant of actin elongation as well as a lower amount of F-actin at the steady state. We therefore assumed that cytosolic fractions prepared from NIH 3T3-EF cells are highly suitable for screening molecules which may modulate actin dynamics, including those which could preferentially bind to actin filaments such as Jasplakinolide and Dolastatin 11. Previous studies have shown that these compounds enhance the actin polymerization rate and stabilise actin fibres, both for purified actin and in cells [22, 23].

Accordingly, when added to assay medium, both Jasplakinolide and Dolastatin 11 increase the actin-F elongation rate constant and the actin-F steady state value.

Figure 6 shows typical kinetics observed following the addition of increasing concentrations of Jasplakinolide.

In the presence of 10 μM of either Jasplakinolide or Dolastatin 11, the actin dynamics of NIH 3T3-EF cytosolic fractions is very similar to those observed using NIH 3T3 cytosolic fractions. Thus, the enhancement of the anisotropy signal is in agreement with the expected effect of those two actin polymerization promoting agents.

DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated by a variety of experiments, that the anisotropy signal enhancement of G-actin-Alexa488 used as marker, is correlated with endogenous cell actin polymerization measured in cytosolic fractions.

Analyses of anisotropy parameters are seen to be particularly interesting because they can provide information on the rotational relaxation of the molecule and on the local environment of the chromophore. The rather fast characteristic time of the anisotropy decay of actin-Alexa488 (0.36 ns in G Buffer) indicates that we are not measuring the rotation of the whole labeled actin but the libration of the Alexa488 chromophore around its linking moiety. Indeed, the rotational correlation time (τ) of the actin-Alexa488 can be calculated with the Debye expression. [24]

$$\tau = \frac{4\pi R^3 \eta}{3kT}$$

where R is the radius of the spherical object, η is the viscosity, k is the Boltzman constant

and T the temperature. Considering that the globular labelled actin monomer is a spherical object of 5 nm in diameter [25], its correlation time is about 145 ns which is two orders of magnitude higher than the correlation time we are measuring and studying in this test. After incorporation of the labelled monomer in the actin polymer, the rotational time increases. Again, it is not directly linked to the rotation of the actin polymer which indeed is slowed down but with a much longer characteristic time. Anisotropy is probing the local environment of Alexa488 which becomes more constrained in the polymer as it is subjected to more limited motion with the increase in viscosity due to glycerol addition.

It should be noted that the time course of the polymerization process occurs according to pseudo first order kinetics which is in agreement with the occurrence of a simple elongation of a linear F-actin helix.

Despite the complexity of the cellular extracts, i.e. the presence of actin dynamics regulatory proteins, we observe neither generation of new helices nor ramification of the helices which would lead to a higher order of kinetics. Accordingly, the assay does not allow the investigation of the nucleation process. This is due to the fact that in cytosolic fractions, short F-actin helices are already preexisting.

We have further observed that lowering the concentration of essential cofactors for actin polymerization (*i.e.* divalent cations) induced a decrease of anisotropy value at equilibrium. The impossibility to obtain a total inhibition of the anisotropy enhancement can be explained by the residual quantities of magnesium or calcium cations present in the cytosolic fractions. However, the total depletion of calcium and magnesium ions by the addition of 10 mM EDTA inhibits 100 % of anisotropy enhancement. We have also observed that up to $0.2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, both the pseudo first order rate constant and the steady state anisotropy value were directly correlated to the protein concentrations. This is in agreement with the well known second order kinetics which characterizes actin polymerization.

In order to investigate the potential interest of the proposed test, we attempted first of all to characterize the actin polymerization status of cytosolic fractions prepared from malignant fibroblasts (NIH-3T3-EF) as compared to non-malignant native fibroblasts (NIH-3T3). It is generally accepted that malignant cells have lower F-actin to G-actin ratio than normal cells [8, 26-28]. The actin remodelling plays an important role in regulating tumor phenotypes. These changes are clearly associated to the abnormal growth properties of tumourous cells, alterations in cell shape, motility and adhesion [29]. Recently, it has been demonstrated that the actin network was strongly impaired in the NIH 3T3-EF cells compared to NIH 3T3 cells resulting very likely from the downregulation of zyxin , a protein acting on actin dynamics [30], in tumour fibroblasts.

In our experiments, compared to normal cells (NIH 3T3), tumourous cells (NIH 3T3-EF) exhibit markedly lower pseudo first order rate constant of actin fibers elongation and a lower steady state anisotropy value, corresponding to lower F-actin level at equilibrium. It should be noted that actin fibers elongation parameters measured in cytosolic fraction of NIH 3T3-EF cells in which human zyxin has

been transfected are very close to those observed with normal NIH 3T3 ($\Delta = 53$ AU, $k = 0.034 \text{ s}^{-1}$, data not shown). Interestingly, these transfected fibroblasts were no longer tumorigenic [31].

The main conclusion of this study is that the proposed test is suitable evaluating the global status of actin dynamics in cells and that a possible impairment in proteins regulating actin dynamics can be detected by this method.

The availability of cell lines such as NIH 3T3-EF displaying lowered actin polymerization potency enables us to use the test for identifying molecules which may act on actin dynamics in particular those which promote F-actin formation either through binding and stabilisation of F-actin or through the action on regulatory proteins.

To ensure that the test could be used to screen drugs that modulate actin polymerization, we added well known F-actin stabilizing compounds in the assay. Jasplakinolide and Dolastatin 11 are marine cyclic peptides known to bind actin filaments, to enhance the assembly of purified actin into F-actin [22, 23, 32] and to stabilize F-actin by preventing actin depolymerization [23, 33, 34]. In this study, we have shown that these drugs modify the kinetic of actin polymerization in NIH 3T3-EF tumour cell extract, enhancing the quantity of F-actin to the value obtained with normal NIH 3T3 cell cytosolic fraction. We have also observed that these drugs enhanced the global rate of actin polymerization (k). This is in agreement with studies that demonstrated that Jasplakinolide [35] and Dolastatin 11 [22] enhance the assembly of purified actin. Bai et al. indicated as well that they find Dolastatin 11 to be more potent than Jasplakinolide as an inducer of actin assembly. It can therefore be concluded that the present test is suitable to detect drugs favouring actin polymerization through preferential binding to F-actin. From a theoretical point of view, the test should also detect drugs modifying actin polymerization through interaction with actin dynamics regulatory proteins present in the cytosolic extracts. This is presently under investigation. Finally, the test can be easily adapted for high throughput screening.

However, it should be pointed out that the increase of the anisotropy signal following the addition of exogenous molecules can be due to a direct binding of the tested drug to the actin-alexa probe and artificially increase its anisotropy by locking the chromophore. To prevent such false positive results,

measurements in non polymerizing conditions, such as 10 mM EDTA, should be used as a control where no enhancement should be observed.

In conclusion, the test we have established is simple, accurate, and reproducible and can be easily automated for large scale screening. Among the many applications, it can be beneficially used to identify new classes of drugs which may rescue actin dynamics breakdown usually observed in tumour cells.

ACKNOWLEDGMENT : We thank Jacques Ghysdael (Laboratoire d'Oncologie Virale et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, URA 1443, Institut Curie, Orsay, France) for the gift of the NIH 3T3 EF cell line and Robert B. Bates (Department of Chemistry, University of Arizona, Tucson, USA) for the gift of Dolastatin 11. We are grateful to Eric Deprez for helpful discussions on fluorescence anisotropy and to Leela Daya-Grosjean for proofreading this manuscript.

REFERENCES

- [1] Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D., Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29 (2000) 545-76.
- [2] Bohmer, R. M., Scharf, E., and Assoian, R. K., Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1, *Mol Biol Cell* 7 (1996) 101-111.
- [3] Iwig, M., Czeslick, E., Muller, A., Gruner, M., Spindler, M., and Glaesser, D., Growth regulation by cell shape alteration and organization of the cytoskeleton, *Eur J Cell Biol* 67 (1995) 145-57.
- [4] Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M., and Waterman-Storer, C. M., Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis, *Nat Cell Biol* 5 (2003) 599-609.
- [5] Pawlak, G., and Helfman, D. M., Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis, *Curr Opin Genet Dev* 11 (2001) 41-7.
- [6] DeMali, K. A., Wennerberg, K., and Burridge, K., Integrin signaling to the actin cytoskeleton, *Curr Opin Cell Biol* 15 (2003) 572-82.
- [7] Rao, J. Y., Jin, Y. S., Zheng, Q., Cheng, J., Tai, J., and Hemstreet, G. P., 3rd, Alterations of the actin polymerization status as an apoptotic morphological effector in HL-60 cells, *J Cell Biochem* 75 (1999) 686-97.
- [8] Rao, J., and Li, N., Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development, *Curr Cancer Drug Targets* 4 (2004) 345-54.
- [9] Nobes, C. D., and Hall, A., Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell* 81 (1995) 53-62.
- [10] Hunter, T., Oncoprotein networks, *Cell* 88 (1997) 333-46.
- [11] Malliri, A., and Collard, J. G., Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer, *Curr Opin Cell Biol* 15 (2003) 583-9.
- [12] Amsellem, V., Kryszke, M. H., Hervy, M., Subra, F., Athman, R., Leh, H., Brachet-Ducos, C., and Auclair, C., The actin cytoskeleton-associated protein zyxin acts as a tumor suppressor in Ewing tumor cells, *Exp Cell Res* 304 (2005) 443-56.
- [13] Laurent, V., and Carlier, M. F., Use of platelet extracts for actin-based motility of *Listeria monocytogenes*, J.E. Celis, editor, San Diego, 1998.
- [14] Cooper, J. A., and Pollard, T. D., Methods to measure actin polymerization, *Methods Enzymol* 85 Pt B (1982) 182-210.
- [15] Perrin, F., Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules à l'état excité, *J. Phys. Radium Ser. 6* (1926) 390-401.
- [16] Perrin, F., La fluorescence des solutions. Induction moléculaire. Polarisation et durée d'émission. *Photochimie, Ann. Phys.* 10 (1929) 169-275.
- [17] Cooper, J. A., Effects of cytochalasin and phalloidin on actin, *J Cell Biol* 105 (1987) 1473-8.
- [18] dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., and Nosworthy, N. J., Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments, *Physiol Rev* 83 (2003) 433-73.
- [19] Gershman, L. C., Selden, L. A., Kinosian, H. J., and Estes, J. E., Actin-bound nucleotide/divalent cation interactions, *Adv Exp Med Biol* 358 (1994) 35-49.
- [20] Cooke, R., The bound nucleotide of actin, *J Supramol Struct* 3 (1975) 146-53.
- [21] Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., de Jong, P., Rouleau, G., and et al., Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours, *Nature* 359 (1992) 162-5.

- [22] Bai, R., Verdier-Pinard, P., Gangwar, S., Stessman, C. C., McClure, K. J., Sausville, E. A., Pettit, G. R., Bates, R. B., and Hamel, E., Dolastatin 11, a marine depsipeptide, arrests cells at cytokinesis and induces hyperpolymerization of purified actin, *Mol Pharmacol* 59 (2001) 462-9.
- [23] Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B., and Fosen, K. M., Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations, *J Biol Chem* 275 (2000) 5163-70.
- [24] Atkins, P. W., *Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 1990.
- [25] Norman, A. I., Ivkov, R., Forbes, J. G., and Greer, S. C., The polymerization of actin: structural changes from small-angle neutron scattering, *J Chem Phys* 123 (2005) 154904.
- [26] Stournaras, C., Stiakaki, E., Koukouritaki, S. B., Theodoropoulos, P. A., Kalmanti, M., Fostinis, Y., and Gravanis, A., Altered actin polymerization dynamics in various malignant cell types: evidence for differential sensitivity to cytochalasin B, *Biochem Pharmacol* 52 (1996) 1339-46.
- [27] Hemstreet, G. P., 3rd, Rao, J., Hurst, R. E., Bonner, R. B., Waliszewski, P., Grossman, H. B., Liebert, M., and Bane, B. L., G-actin as a risk factor and modulatable endpoint for cancer chemoprevention trials, *J Cell Biochem Suppl* 25 (1996) 197-204.
- [28] Katsantonis, J., Tosca, A., Koukouritaki, S. B., Theodoropoulos, P. A., Gravanis, A., and Stournaras, C., Differences in the G/total actin ratio and microfilament stability between normal and malignant human keratinocytes, *Cell Biochem Funct* 12 (1994) 267-74.
- [29] Weber, K., Lazarides, E., Goldman, R. D., Vogel, A., and Pollack, R., Localization and distribution of actin fibers in normal transformed and revertant cells, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 39 Pt 1 (1975) 363-9.
- [30] Amsellem, S., Pflumio, F., Bardinet, D., Izac, B., Charneau, P., Romeo, P. H., Dubart-Kupperschmitt, A., and Fichelson, S., Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein, *Nat Med* 9 (2003) 1423-7.
- [31] Amsellem, S., and Fichelson, S., [HOXB4 and primitive human hematopoietic cell expansion], *Med Sci (Paris)* 20 (2004) 959-61.
- [32] Bai, R., Covell, D. G., Liu, C., Ghosh, A. K., and Hamel, E., (-)-Doliculide, a new macrocyclic depsipeptide enhancer of actin assembly, *J Biol Chem* 277 (2002) 32165-71.
- [33] Oda, T., Crane, Z. D., Dicus, C. W., Sufi, B. A., and Bates, R. B., Dolastatin 11 connects two long-pitch strands in F-actin to stabilize microfilaments, *J Mol Biol* 328 (2003) 319-24.
- [34] Visegrady, B., Lorinczy, D., Hild, G., Somogyi, B., and Nyitrai, M., The effect of phalloidin and jasplakinolide on the flexibility and thermal stability of actin filaments, *FEBS Lett* 565 (2004) 163-6.
- [35] Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L., and Korn, E. D., Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin, *J Biol Chem* 269 (1994) 14869-71.

FOOTNOTES

¹ Those authors contributed equally to this work.

NB: Anisotropy is a dimension less physical quantity. The values of fluorescence anisotropy are between 0.4 and -0.2. We shall call AU the factor 10^{-3} when used to multiply anisotropy values.

TABLES CAPTIONS

Table 1. Variations of anisotropy of Alexa488 in different solvents with various viscosity.

Stationary anisotropy and characteristic time of the anisotropy decay of Alexa488 (1.55 μM) were determined in water, cyclohexanol and a mix of 10% glycerol and water (respectively 30%, 50% and 70%). η represents viscosity of the considered solvent and η_0 viscosity of water.

Table 2. a - Effect of protein concentration on anisotropy enhancement in NIH 3T3 cell extract.

Anisotropy enhancement was followed at 22°C for 200 s, which is the time required to reach equilibrium, after addition of polymerization buffer and cellular extract. Data are expressed as mean of ΔAU and constant k calculated from at least 3 sets of data. The ΔAU , or steady state anisotropy value, corresponds to the equilibrium value and k to the global rate of anisotropy enhancement. Standard deviation was inferior to 3%. **b – Estimation of the second order rate constant. $R^2 = 0.92$**

TABLES

Table 1.

Solvent	Water	Glycerol 10%	Glycerol 30%	Glycerol 50%	Cyclo-hexanol	Glycerol 70%
η/η_0	1.0	1.3	3.2	15.4	41	480
Stationary anisotropy	0.018	0.020	0.054	0.164	0.201	0.308
$\tau_{\text{rotational diffusion}}$ (ns)	0.17	0.24	0.70	2.07	4.70	7.70

Table 2.

a - Protein concentration in reaction mixture (mg.mL^{-1})	0.025	0.050	0.100	0.200	0.300	0.400	0.500
ΔAU	45	54	58	63	61	61	57
k (s^{-1})	0.023	0.032	0.074	0.078	0.131	0.081	0.126

b -

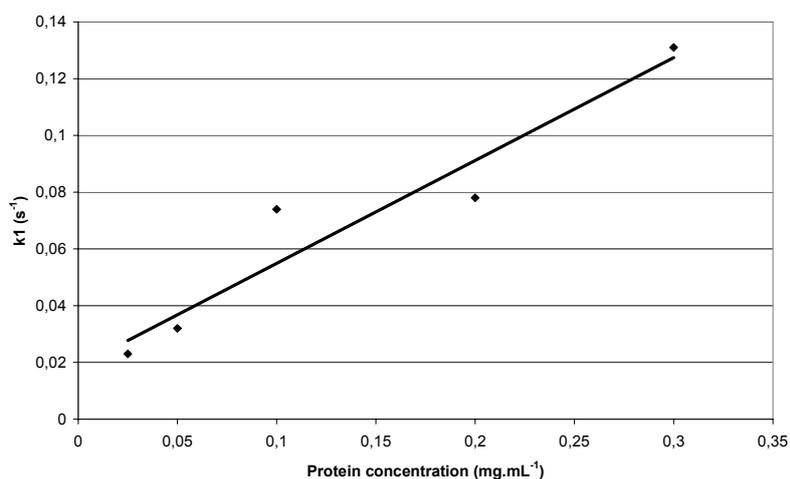


FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Effect of viscosity on time resolved anisotropy of G-actin-Alexa. Characteristic time of the anisotropy decay of G-actin-Alexa was determined as described in materials and methods. G-actin-Alexa488 ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) was dissolved in : G Buffer (\blacktriangle), $\tau = 0.36 \text{ ns}$; G Buffer + 5% glycerol (\blacksquare), $\tau = 0.54 \text{ ns}$; G Buffer + 25 % glycerol (\bullet), $\tau = 1.14 \text{ ns}$; G Buffer + 50 % glycerol (+), $\tau = 2.38 \text{ ns}$.

Figure 2. a) Fluorescence anisotropy enhancement in NIH 3T3 cell extract. Polymerization buffer and cellular extract were added at time zero and anisotropy enhancement was followed at 22°C by Actin-Alexa. Measurements were made every 10 seconds. Final protein concentration in reaction mixture was 0.2 mg.mL^{-1} . The curve was fitted according to the equation $Y = Y_{\text{max}}.[1 - \exp(-k.x)]$. Data represent mean \pm standard deviation; $n = 4$. **b) Confocal microscopy of actin filaments.** Purified G actin (0.2 mg.mL^{-1}) was allowed to polymerize for 15 minutes at 37°C , according to standard procedure. Phalloidin-Alexa488 was added at $0.15 \mu\text{M}$ final concentration and allowed to bind to F actin for 20 minutes at 37°C .

Figure 3. Effects of depletion in magnesium and calcium cations on anisotropy enhancement in NIH 3T3 cell extract. The effect of depletion in MgCl_2 (\bullet), and CaCl_2 (\blacklozenge) was first analysed individually. For Mg^{2+} depletion, the sonication buffer and the polymerization buffer were prepared without MgCl_2 . To test the effects of depletion in calcium cations, no CaCl_2 was added to G buffer. The effect of depletion of both of these compounds was also studied (∇). Anisotropy enhancement curve with complete buffer is also shown for control (\blacksquare). Data represent mean \pm standard deviation; $n = 4$.

Figure 4. Effect of divalent cations chelation by EDTA on anisotropy enhancement in NIH 3T3 cell extracts. Experiments were performed using standard procedure. EDTA was added at time zero

with polymerization buffer and NIH 3T3 cell extracts. Reaction mixtures contained EDTA at various concentrations symbolized as follows: 1mM EDTA (●), 5 mM EDTA (▲), and 10 mM EDTA (◆), control buffer without EDTA (■). Data represent mean ± standard deviation; n= 3.

Figure 5. F-Actin elongation kinetics measured using cytosolic fractions of either NIH 3T3 (■) or NIH 3T3-EF(▲). Experiments were performed according to standard procedures. Polymerization buffer and cellular extract were added at time zero. Final protein concentration in reaction mixtures was 0.2 mg.mL⁻¹.

Figure 6. Effect of Jasplakinolide on actin dynamics as measured using NIH 3T3-EF cytosolic fractions. Experiments were performed according to standard procedures. Various concentrations of Jasplakinolide were added at zero time with polymerization buffer and NIH 3T3-EF cytosolic fraction. Reaction mixtures contained Jasplakinolide at concentrations symbolised as follows: NIH 3T3-EF (▲); NIH 3T3-EF + 1 μM Jasplakinolide (●), 5 μM Jasplakinolide (◆), 10 μM Jasplakinolide (▼); NIH 3T3 (■). Data represent the mean of four experiments ± SD.

Figure 7. Comparaison of actin dynamics in NIH 3T3-EF in the presence of Jasplakinolide (a) and Dolastatin 11 (b) with NIH 3T3 cell extracts. Experiments were performed according to standard procedures. Drugs (10 μM) were added at zero time with polymerization buffer and NIH 3T3 EF cytosolic fraction. A: NIH 3T3-EF (▲), NIH 3T3-EF + 10 μM Jasplakinolide (▼); B: NIH 3T3-EF (▲), NIH 3T3-EF + 10 μM Dolastatin 11(∇). In A and B, control NIH 3T3 (■). Data represent the mean of four experiments ± SD.

Figure 1

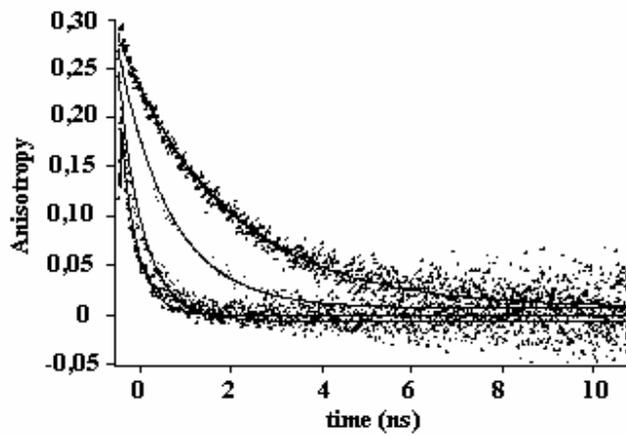
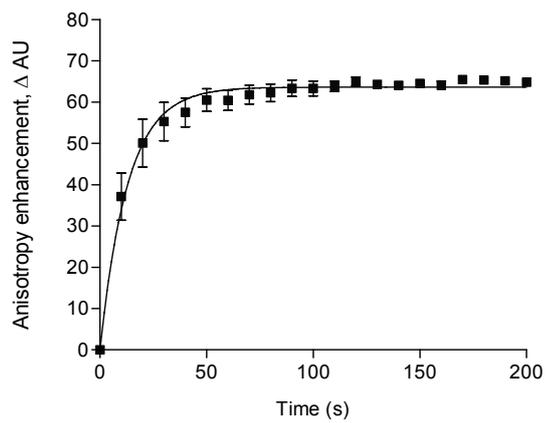


Figure 2 - a



b (i)

b (ii)

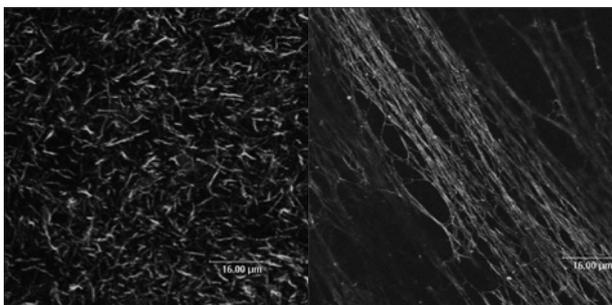


Figure 3

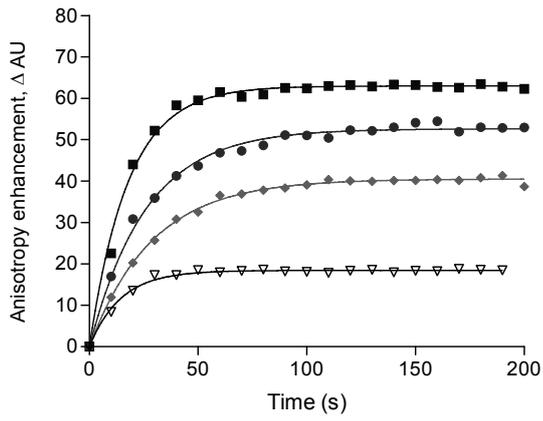


Figure 4

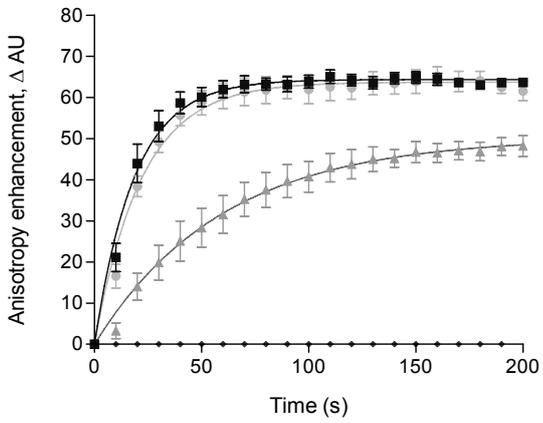


Figure 5

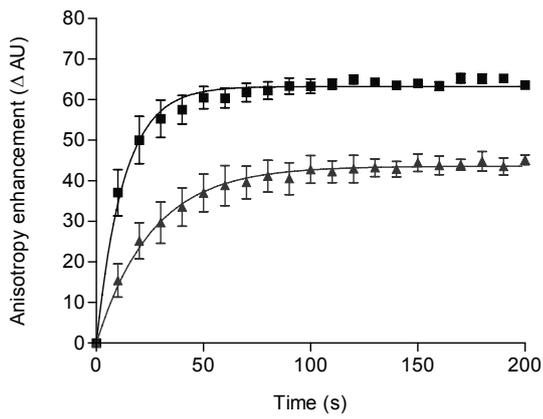


Figure 6

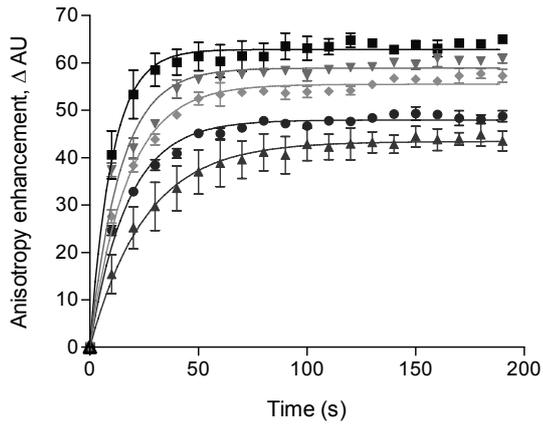
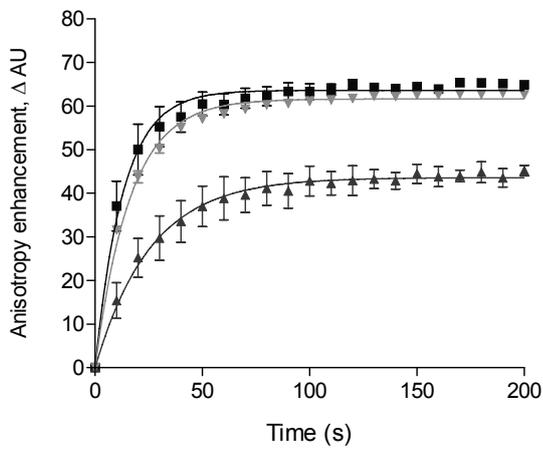
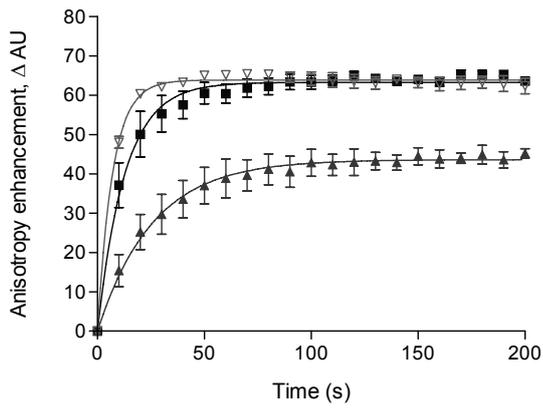


Figure 7 - a



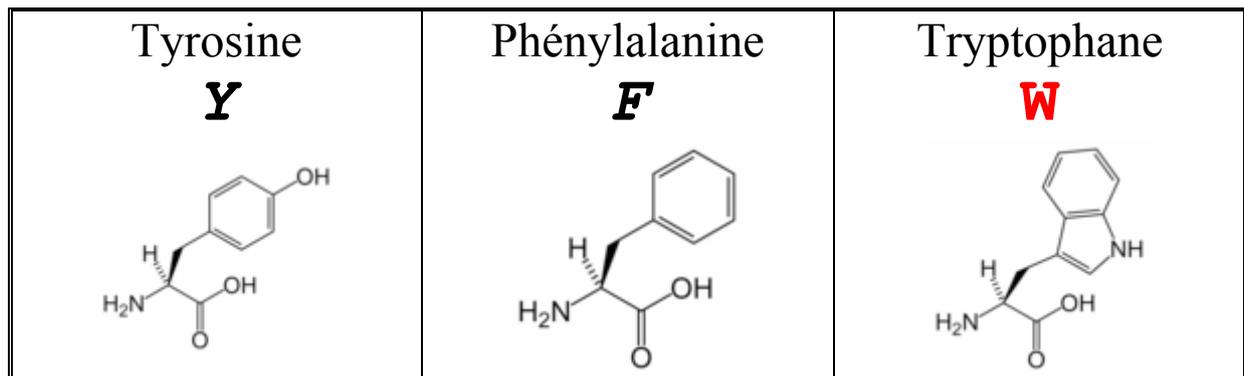
b



Annexe I : Séquence peptidique de l'actine

La séquence présentée ci-dessous est la séquence de l'actine musculaire de lapin qui a été cristallisée et dont la structure a été résolue avec une précision de 1,85Å par Graceffa et Dominguez (Graceffa et Dominguez 2003).

XDEDETTALVCDNGSGLVKAG**F**AGDDAPRAV**F**PSIVG
RPRHQGVVMGMGQKDS**Y**VGDEAQS~~K~~RGI~~L~~TLK**Y**PIEX
GIITN**W**DDMEKI**W**HHT**F**YNELRVAPEEHPTLLTEAPL
NPKANREKMTQIM**F**ET**F**NVPAMYVAIQAVLSL**Y**ASGR
TTGIVLDSGDGVTHNVPI**Y**EG**Y**ALPHAIMRLDLAGR
LTD**Y**LMKILTERG**Y**S**F**VTTAEREIVRDIKEKLC**Y**VAL
D**F**ENEMATAASSSSLEKS**Y**ELPDGQVITIGNER**F**RCP
ETL**F**QPS**F**IGMESAGIHETT**Y**NSIMKCDIDIRKDL**Y**A
NNVMSGGTTM**Y**PGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAP
PERK**Y**SV**W**IGGSILASLST**F**QQM**W**ITKQE**Y**DEAGPSI
VHRKC**F**



Référence :

Graceffa, P. et Dominguez, R. (2003).
"Crystal structure of monomeric actin in
the ATP state. Structural basis of

nucleotide-dependent actin dynamics." J
Biol Chem **278**(36): 34172-80.

Chapitre 2 : Imagerie de polymères d'actine par anisotropie de fluorescence

PARTIE I – LE FLIM	- 70 -
I - Les différentes techniques de FLIM	- 70 -
1 - Les sources	- 70 -
a- Les lasers titane-saphir	- 70 -
b- Autres sources pulsées	- 71 -
c- Sources modulables	- 71 -
2 – L'éclairage	- 71 -
a- Imagerie confocale	- 71 -
b- Imagerie plein-champ	- 72 -
3 – La détection	- 73 -
a- Le FLIM impulsionnel	- 73 -
b- Le FLIM de phase	- 75 -
II – Nos choix techniques	- 77 -
1- Présentation et justification du système	- 77 -
2- Le Q_A	- 78 -
III - Caractérisation du système	- 80 -
1- La mesure de la durée de vie	- 80 -
a- Correction de la mesure de durée de vie	- 80 -
b- Dispersion de la durée de vie	- 81 -
c- Résolution temporelle	- 83 -
d- Utilisation des différents objectifs	- 84 -
2- La mesure de l'intensité	- 85 -
a- Correction du gain	- 85 -
b- Saturation du détecteur	- 86 -
c- Temps mort	- 87 -
3- La résolution spatiale	- 88 -
a- Détermination de la résolution	- 88 -
b- Echelle	- 90 -
PARTIE II – Le trFAIM	- 92 -
I – Les différentes techniques	- 92 -
II – Nos choix techniques	- 93 -
1- Le système	- 93 -
2- Caractérisation	- 96 -
3- Imagerie de l'anisotropie stationnaire	- 99 -
III – Résultats	- 100 -
1- Images et calculs de la relaxation de l'anisotropie de fluorescence de polymères d'actine <i>in vitro</i>	- 100 -
2- Imagerie de l'anisotropie stationnaire pixel par pixel	- 104 -
IV – Perspectives	- 106 -
Références	- 108 -

Table des illustrations

Figure 1: Microscope de Hooke	- 68 -
Figure 2 : Microscopie confocale.....	- 72 -
Figure 3: Imagerie plein champ	- 73 -
Figure 4: Détermination de la durée de vie de fluorescence par un système à portes temporelles	- 75 -
Figure 5 : Fluorimétrie de phase	- 76 -
Figure 6 : Représentation schématique du Q_A	- 78 -
Figure 7 : Position des 5 anodes.....	- 79 -
Figure 8 : Image en intensité de fluorescence d'un fibroblaste NIH 3T3 fixé et dont le cytosquelette a été marqué à la phalloïdine-Alexa488.....	- 80 -
Figure 9 : Correction du temps de transit dans les microcanaux.	- 81 -
Figure 10 : Dispersion de la durée de vie de fluorescence.....	- 82 -
Figure 11: Dispersion de la durée de vie de fluorescence en fonction de l'illumination des pixels.	- 83 -
Figure 12 : Impulsion laser corrigée de la différence de temps de transit	- 84 -
Figure 13 : Décalages temporels dus aux différents objectifs.....	- 85 -
Figure 14 : Correction du gain.	- 86 -
Figure 15 : Détermination du temps mort du détecteur.	- 87 -
Figure 16 : Images de billes fluorescentes de 20 nm prises dans une matrice polymère de PVA	- 88 -
Figure 17 : Ajustement d'une tache par une gaussienne à deux dimensions.	- 89 -
Figure 18 : Evolution de la taille de la tache de diffraction de billes fluorescentes avec l'altitude de focalisation.	- 89 -
Figure 19 : Correspondance entre largeur de gaussienne et rayon d'Airy.....	- 90 -
Figure 20 : Image d'une mire pour la détermination de l'échelle.....	- 90 -
Figure 21 : Prisme de Glan-Taylor.....	- 93 -
Figure 22 : Cube polarisant.....	- 94 -
Figure 23 : Séparation des faisceaux et réorientation vers le détecteur	- 95 -
Figure 24 : Images d'une mire pour vérifier l'alignement des deux polarisations	- 95 -
Figure 25 : Décalage dû au passage dans le dispositif de séparation des polarisations	- 96 -
Figure 26 : Structures du rubrène et du squalane.....	- 97 -
Figure 27 : Image en FLIM d'un échantillon de rubrène dans le squalane.....	- 97 -
Figure 28 : Déclins de fluorescence parallèle et perpendiculaire construits à partir de l'image de la figure 27.....	- 98 -
Figure 29 : Déclins d'anisotropie du rubrène dans le squalane enregistrés avec 4 objectifs d'ouverture numérique différente.....	- 99 -
Figure 30 : Photographie en transmission d'un faisceau de filaments d'actine.....	- 100 -
Figure 31 : Image en intensité de fluorescence du faisceau filament d'actine.....	- 101 -
Figure 32 : Image en FLIM d'un faisceau de filaments d'actine.....	- 102 -
Figure 33 : Déclins de fluorescence parallèle et perpendiculaire des filaments d'actine polymérisée.	- 103 -
Figure 34 : Déclin de l'anisotropie de fluorescence des filaments d'actine polymérisée. -	104 -
Figure 35 : Image en intensité de filaments d'actine purifiée polymérisée	- 105 -
Figure 36 : Image en anisotropie stationnaire de filaments d'actine purifiée polymérisée-	105 -

Les grandes avancées dans le domaine de l'imagerie ont souvent précédé et permis des avancées non moins grandes dans les différents domaines de la biologie. Ainsi, le premier microscope du hollandais Zacharias Janssen à la fin du XVIème siècle, développé par la suite par Robert Hooke, lui a permis de décrire les premières cellules végétales (Hooke 1665). A l'heure actuelle, les développements les plus récents des techniques d'imagerie telles que l'IRM ou la tomographie sont de plus en plus utilisées tant pour le diagnostique que pour le traitement de nombreuses maladies (Lang *et al.* 2006).

Voir les objets d'études et les phénomènes permet de mieux les comprendre et les appréhender.

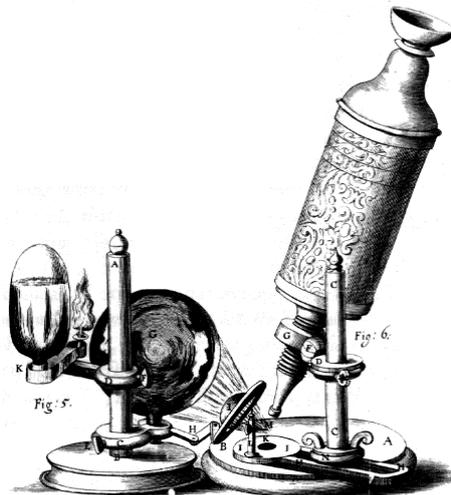


Figure 1: Microscope de Hooke

Parmi ces techniques d'imagerie, la microscopie de fluorescence tient naturellement une place de choix. En excitant des molécules naturellement fluorescentes ou bien en marquant de façon spécifique des protéines ou des organites cellulaires, on obtient au moyen de microscopes à épifluorescence ou de plateformes d'imagerie confocale des images avec une résolution (ϵ) limitée par la relation d'Abbe :

$$\epsilon = \frac{0,61\lambda}{n \sin u} \quad (1)$$

où λ est la longueur d'onde de la lumière incidente, n est l'indice de réfraction du milieu situé entre l'objet et l'objectif et u est l'angle de demi-ouverture de l'objectif sur l'objet (le produit $n \sin u$ définissant l'ouverture numérique de l'objectif).

Cependant, comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, la fluorescence n'est pas seulement caractérisée par son spectre d'émission. D'autres paramètres tels que la durée de vie et l'anisotropie peuvent permettre d'étudier des interactions ou des paramètres locaux. C'est pourquoi il nous est apparu intéressant de développer au laboratoire un instrument qui permette de mesurer les paramètres de fluorescence sous microscope avec une résolution à la fois spatiale et temporelle.

Dans ce chapitre, nous nous attacherons à présenter les différentes techniques qui permettent de faire de l'imagerie de durée de vie de fluorescence (FLIM) et de l'imagerie de l'anisotropie de fluorescence résolue dans le temps (trFAIM) afin d'expliquer les choix retenus au laboratoire. Nous présenterons également la caractérisation de l'instrument développé ainsi que quelques images de polymères d'actine.

PARTIE I – LE FLIM

I - Les différentes techniques de FLIM

L'imagerie de la durée de vie de fluorescence nécessite l'emploi d'une source d'excitation pulsée ou modulée ainsi qu'un détecteur et une électronique suffisamment rapides pour mesurer des phénomènes qui s'étendent sur une gamme de temps allant de la picoseconde à la centaine de nanosecondes.

1 - Les sources.

Selon les techniques utilisées pour faire du FLIM, l'excitation de la fluorescence doit être faite soit par une source pulsée (fs – ps) plus courte que la durée de vie de la fluorescence (ns) avec un taux de répétition de l'ordre du MHz soit par une source modulable entre 50 MHz et 1 GHz, on travaille alors dans le domaine dit des fréquences sur lequel nous reviendrons plus tard.

a- Les lasers titane-saphir.

Les lasers constitués d'un barreau de saphir dopé par des ions titane sont des sources de choix pour ce type d'applications. Parmi eux, les lasers titane/saphir femtosecondes délivrent des impulsions de 80 à 200 fs, d'une puissance de plusieurs watts et sur une gamme de longueurs d'onde couvrant le proche infra rouge (680 – 950 nm) ce qui les rend particulièrement efficaces pour l'excitation à deux photons des photochromes classiquement utilisés.

Il est aussi possible d'exciter la fluorescence par l'absorption classique d'un photon après avoir doublé la fréquence du laser par un cristal non linéaire. On utilise souvent ce type de montage doubleur dans le cas de lasers ayant des impulsions plus longues, tels que les lasers picosecondes qui sont moins favorables à l'excitation multiphotonique.

b- Autres sources pulsées

D'autres sources pulsées peuvent être utilisées parmi lesquelles les lasers à fibres. On trouve dans le commerce des lasers à fibres délivrant des impulsions d'une centaine de femtosecondes dans le proche infrarouge. La puissance, de l'ordre de 10 à 20 mW, est suffisante pour l'excitation biphotonique mais les longueurs d'onde de ces sources ne sont pas accordables.

Il existe également des diodes laser capables de délivrer des impulsions entre 40 et 400 ps avec un taux de répétition de 80 MHz mais leur puissance reste relativement faible. De plus, plus l'impulsion est courte, plus la puissance s'amenuise. Il est cependant possible de pulser ces diodes afin de les utiliser pour faire de l'imagerie de fluorescence résolue en temps (Kress *et al.* 2003).

c- Sources modulables

Pour travailler dans le domaine des fréquences, l'excitation doit se faire périodiquement à une fréquence qui est l'inverse de la durée de vie de fluorescence attendue. Les sources les plus classiquement utilisées sont des lasers continus à argon ionisé ou à hélium-néon dont la fréquence est contrôlée par un modulateur acousto-optique dans lequel une onde ultrasonore modifie les paramètres de l'onde lumineuse.

2 – L'éclairage

Une fois le type de source lumineuse choisi, différents éclairages de l'échantillon sont possibles. On peut focaliser la lumière sur l'échantillon et faire de l'imagerie confocale ou alors éclairer toute la surface de l'échantillon selon une technique dite plein-champ.

a- Imagerie confocale

Le principe général d'un microscope confocal est présenté sur la figure 2 (Pawley 1995).

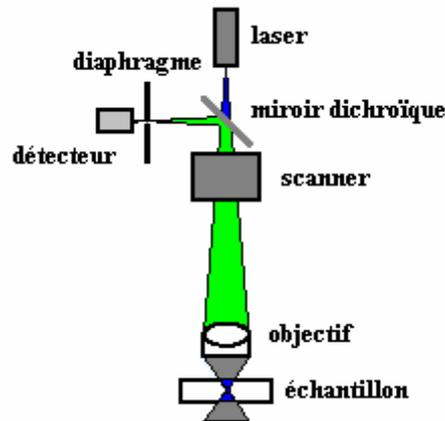


Figure 2 : Microscopie confocale

Le laser est focalisé sur l'échantillon au travers de l'objectif du microscope. La fluorescence qui est émise dans toutes les directions est détectée à travers le même objectif puis orientée vers le détecteur par un miroir dichroïque. Dans le cas d'une excitation monophotonique, la fluorescence émise par des fluorophores situés hors du plan focal est coupée par un diaphragme situé juste avant le détecteur. Dans le cas d'une excitation pluriphotonique, ce dernier diaphragme est inutile puisque seules les molécules situées dans la zone de focalisation du laser sont excitées.

L'image dans le plan x-y est alors obtenue en déplaçant le point de focalisation du laser sur la surface de l'échantillon. Il est également possible de faire des coupes optiques à différentes hauteurs et faire ainsi de la reconstruction d'images en trois dimensions à l'aide de logiciels.

Ce type d'imagerie confocale est en plein essor à l'heure actuelle en raison de l'excellente définition des images obtenues (White *et al.* 1987) cependant, deux inconvénients majeurs sont à souligner. Tout d'abord, la focalisation du laser est à l'origine d'un phénomène bien connu de photoblanchiment des échantillons observés (Laurent *et al.* 1994; Tauer 2002). Ensuite, l'acquisition d'une image prend du temps puisqu'il faut déplacer le laser. La fin de l'image n'est donc pas enregistrée au même instant que le début de l'image.

b- Imagerie plein-champ

Pour pallier ces inconvénients de l'imagerie confocale, l'imagerie de plein-champ peut être une solution. Pour cette technique, l'échantillon est illuminé uniformément par le laser de la même façon que dans un microscope traditionnel.

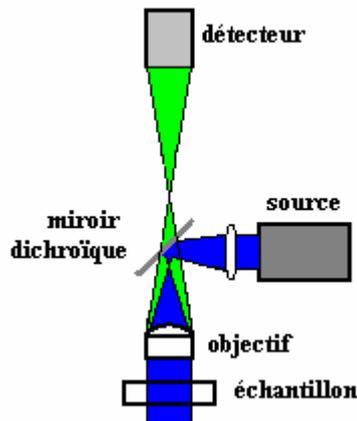


Figure 3: Imagerie plein champ

Cette technique est plus respectueuse pour l'échantillon. En effet, puisque le laser n'est pas focalisé directement, le photoblanchiment est moindre. En particulier, la photoionisation multiphotonique est une voie de blanchiment spécifique de la microscopie confocale. Pour la même raison, l'excitation à deux photons n'est pas possible avec cette technique. L'emploi d'un détecteur plein champ permet de faire de l'imagerie plus rapidement que par les techniques requérant de scanner l'échantillon et la contraste des images, *a priori* moins bonne qu'en microscopie confocale, peut être améliorée par un sectionnement optique obtenu en projetant une grille sur l'échantillon (Neil *et al.* 2000) ou par la déconvolution d'une série d'images prises au travers de l'épaisseur de l'échantillon (Sibarita 2005).

3 – La détection

Les différentes techniques qui servent à mesurer la durée de vie de la fluorescence peuvent être envisagée pour faire de l'imagerie à l'aide de détecteurs bidimensionnels ou en association avec des techniques de balayage soit de l'échantillon soit du faisceau laser (Herman *et al.* 1999).

a- Le FLIM impulsif

On pourrait envisager d'utiliser la technique de comptage de photon unique présentée dans le chapitre précédent en combinaison avec une technique de balayage confocal du laser cependant, le temps d'acquisition d'une image serait considérable puisque la durée de vie de

chacun des pixels serait déterminée successivement. Il serait alors impossible de faire des images d'échantillons qui évoluent.

Les techniques impulsionnelles sont donc préférablement associées à des détecteurs à champ large. Un premier détecteur de ce type a été décrit par Wang et ses collaborateurs en 1992 (Wang *et al.* 1992). Les images sont obtenues en couplant un détecteur à portes temporelles constitué par une galette de microcanaux (cf. Annexe II) avec une caméra CCD (cf. Annexe III). L'illumination se fait par des impulsions picosecondes issus d'un laser à azote conduits dans le microscope au moyen d'une fibre optique et d'une lentille de large ouverture numérique.

La mesure de la durée de vie se fait sur chaque pixel de la façon suivante. A un temps t_n après l'excitation de l'impulsion laser, un créneau de tension d'une durée ΔT est appliqué à la photocathode du détecteur ce qui ouvre une porte temporelle de mesure de la fluorescence. On répète ce processus sur plusieurs portes temporelles à différents t_n ce qui permet de faire un échantillonnage de la détection. Dans le cas d'une population de fluorophores ayant une seule durée de vie τ , deux fenêtres de détections sont suffisantes pour le calcul de la durée de vie. En effet, si on note D_n la fluorescence enregistrée entre les instants t_n et $(t_n + \Delta T)$, on a :

$$D_n = \int_{t_n}^{t_n + \Delta T} I(t) dt = \int_{t_n}^{t_n + \Delta T} I_0 \exp(-t / \tau) dt \quad (2)$$

ce qui permet de calculer τ par la formule suivante :

$$\tau = \frac{t_2 - t_1}{\ln(D_1 / D_2)} \quad (3)$$

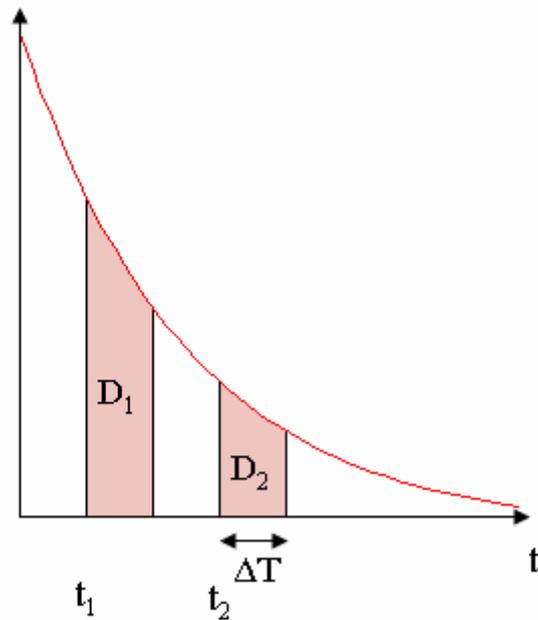


Figure 4: Détermination de la durée de vie de fluorescence par un système à portes temporelles

L'obtention d'une image en durée de vie moyenne par cette technique ne nécessite donc que la détermination de ces quatre paramètres sur chacun des pixels; c'est donc une technique assez rapide. Cependant, la résolution temporelle est limitée par l'ouverture temporelle des portes qui est souvent assez médiocre (quelques ns).

b- Le FLIM de phase

La fluorimétrie de phase est une technique qu'on peut également envisager d'utiliser pour faire de l'imagerie. Dans cette technique, l'échantillon est excité par une lumière excitatrice $E(t)$ sinusoïdale à haute fréquence (ω) de la forme :

$$E(t) = A + B \cos(\omega t) \quad (4)$$

La fluorescence $F(t)$ qu'il émet se présente alors également sous la forme d'une sinusoïde mais celle-ci est retardée d'une phase Φ et partiellement démodulée :

$$F(t) = a + b \cos(\omega t - \Phi) \quad (5)$$

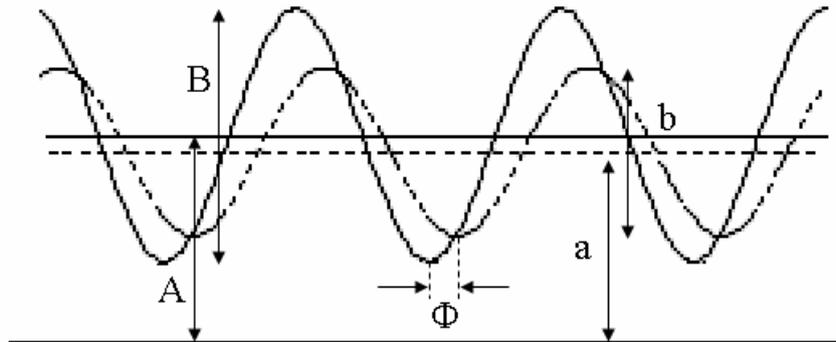


Figure 5 : Fluorimétrie de phase

Le rapport de modulation M est défini de la façon suivante :

$$M = \frac{B/A}{b/a} \quad (6)$$

A partir de ces deux paramètres, deux durées de vie peuvent être calculées :

$$\tau_{\Phi} = \frac{\tan \Phi}{\omega} \quad (7)$$

$$\text{et } \tau_M = \frac{\sqrt{M^{-2} - 1}}{\omega} \quad (8)$$

Dans le cas d'un échantillon présentant une seule durée de vie de fluorescence, ces deux durées de vie sont égales. En revanche, si plusieurs durées de vie de fluorescence coexistent, il est nécessaire de réaliser cette expérience à différentes fréquences de travail ω . On obtient alors plusieurs couples de points qu'il est possible d'ajuster numériquement en fonction d'un certain nombre choisi de paramètres.

Deux modes de détections sont possibles (Gadella *et al.* 1993). Pour une détection dite hétérodyne, la haute tension du détecteur est modulée à une fréquence $\omega + \Delta\omega$ ce qui permet de convertir le signal haute fréquence en un signal à une fréquence $\Delta\omega$ (quelques dizaines de hertz) tout en conservant les informations sur la phase et la démodulation qui sont alors mesurées par les pixels d'une caméra CCD. Une détection homodyne, directement à la fréquence ω , est également possible. Elle est cependant plus difficile à mettre en œuvre car les détecteurs sont moins stables à très haute fréquence.

A nouveau, si l'échantillon observé ne comporte qu'un seul fluorophore caractérisé par une seule durée de vie de fluorescence, les deux durées de vies calculées à partir de la phase et de la modulation sont identiques et correspondent à la durée de vie de fluorescence.

Si celles-ci diffèrent, il faut acquérir des images à différentes fréquences puis procéder à l'ajustement numérique pixel par pixel ce qui devient une difficulté technique importante.

Cette technique de fluorimétrie de phase peut également être utilisée pour faire du FLIM confocal avec excitation à deux photons (So *et al.* 1995; So *et al.* 1998). Dans l'exemple décrit par So et ses collaborateurs, la source lumineuse utilisée est un laser titane:saphir femtoseconde avec un taux de répétition de 80 Mhz. La gamme de fréquences du kilo au gigahertz est obtenue en mélangeant cette fréquence et ses harmoniques supérieures avec des fréquences plus faibles (30 à 120 MHz) obtenues par un modulateur acousto-optique placé sur le trajet du faisceau. Une détection hétérodyne est alors employée. Les images obtenues ont alors un meilleur contraste que dans du FLIM de phase non confocal mais l'acquisition d'une image est plus longue.

II – Nos choix techniques

Nous l'avons évoqué depuis le début de ce chapitre, un bon compromis entre résolution temporelle, spatiale et vitesse d'acquisition des images est difficile à trouver.

1- Présentation et justification du système

Dans l'optique de faire par la suite de l'imagerie dynamique, l'utilisation d'une imagerie plein champ nous est apparue intéressante. En effet, dans ce type d'imagerie, il n'y a de balayage ni de la surface de l'échantillon par le faisceau excitateur, ni au niveau de la détection ; la totalité de l'image étant acquise simultanément.

Pour les mêmes raisons de vitesse d'acquisition des images, la fluorimétrie de phase n'a pas été retenue. En effet, dans la grande variété d'échantillons que nous nous proposons d'étudier, rares sont ceux qui ne présentent qu'une population unique de fluorophores ayant tous la même durée de vie. Plusieurs mesures à différentes fréquences seraient donc nécessaires et ralentiraient d'autant le processus de construction d'une image.

Parmi les autres techniques de fluorimétrie, la technique du comptage de photon unique nous semblait plus respectueuse de l'échantillon. En effet, contrairement aux techniques à portes temporelles, chaque photon de fluorescence émis est pris en compte par la détection. La puissance excitatrice sur l'échantillon peut donc être minimisée ce qui a pour

conséquence une diminution importante des phénomènes de photoblanchiment (qui augmentent de façon non linéaire avec l'excitation).

Contrairement aux techniques à portes, la résolution n'est pas limitée par la durée d'ouverture de ces portes temporelles mais par le traitement électronique des photons reçus par le détecteur qui peut être meilleur.

Il restait donc à coupler à l'excellente résolution temporelle des détecteurs monophotonique une résolution spatiale nécessaire à l'imagerie.

2- Le Q_A

Un type nouveau de détecteur est développé par la société allemande Europhoton de Klaus Kemnitz (Kemnitz *et al.* 1997). Il s'agit d'un détecteur de photon unique constitué par deux galettes de microcanaux dont l'anode est divisée en quatre quadrants, d'où l'abréviation usuelle de Q_A pour « Quadrant Anode ».

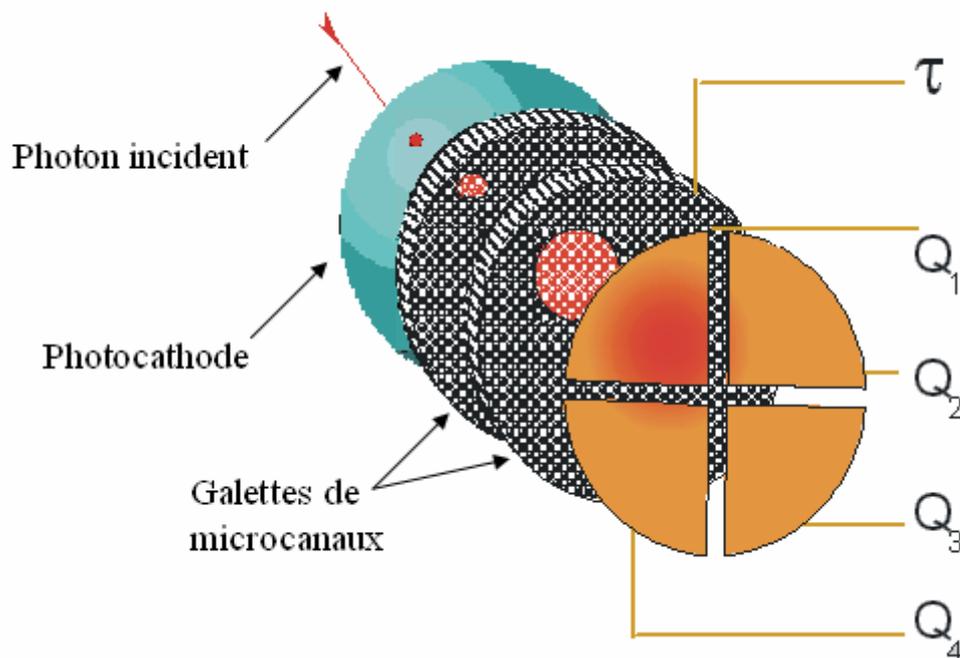


Figure 6 : Représentation schématique du Q_A

Les faisceaux d'électrons générés au cours du passage dans les microcanaux sont récoltés par les différentes anodes qui mesurent la répartition spatiale des charges. Par calcul du barycentre des charges enregistrées, la position d'arrivée sur la photocathode du photon qui a initié la cascade d'électrons est déterminée. Dans le cas où la position du photon serait

particulièrement décentrée par rapport au détecteur, une cinquième anode circulaire entourant les quatre autres (Figure 7) permet d'améliorer la précision de la mesure.

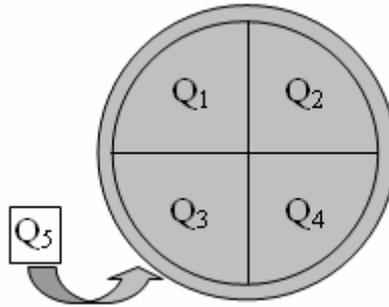


Figure 7 : Position des 5 anodes

Le détecteur est par ailleurs associé à la chaîne de comptage de photons uniques décrite dans le chapitre précédent. Ainsi, chaque photon détecté est étiqueté par sa position sur la photocathode, sa date d'arrivée et son retard par rapport à l'impulsion laser qui sont sauvegardés informatiquement.

A partir de ces données, un certain nombre d'images peuvent être construites. La simple représentation du nombre de photons enregistrés sur chacun des pixels de l'image nous donne une image de l'intensité de fluorescence de l'échantillon. Cette image peut, par exemple, être représentée avec une échelle de gris où les pixels ayant été les plus illuminés seront plus clairs que les pixels ayant vu peu de lumière qui resteront noirs. La figure 8 présente une telle image en intensité de fluorescence d'une cellule dont le cytosquelette d'actine a été marqué comme décrit précédemment (Matériels et méthodes 1).

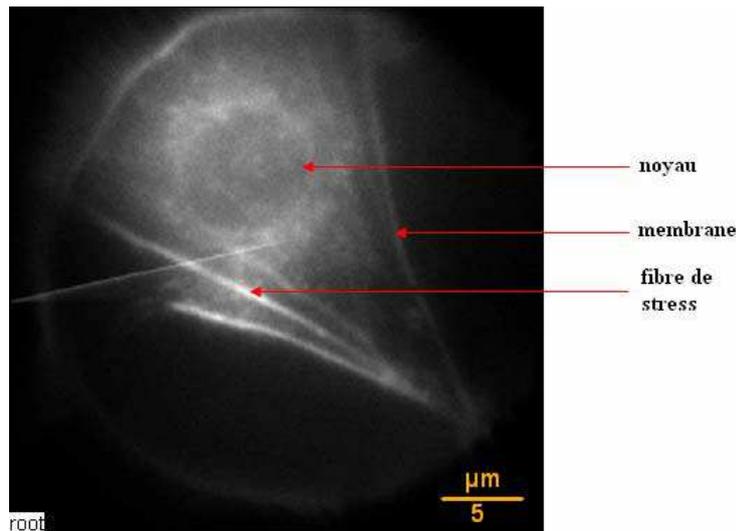


Figure 8 : Image en intensité de fluorescence d'un fibroblaste NIH 3T3 fixé et dont le cytosquelette a été marqué à la phalloïdine-Alexa488

Une autre représentation possible consiste à calculer pour chaque pixel la durée de vie moyenne des photons qui l'ont illuminé. Pour ce faire, il suffit de sommer les retards à la fluorescence des photons mesurés sur chacun des pixels et de diviser cette valeur par le nombre de photons comptés par le pixel. On obtient ainsi une image de FLIM en durée de vie moyenne de fluorescence pour laquelle la teinte du pixel correspond à la durée de vie.

En sus de ces images, les données sauvegardées nous permettent également de reconstruire le déclin la fluorescence sur des zones d'intérêts qui peuvent aller d'un pixel unique à la surface entière de l'image.

III - Caractérisation du système

Ces détecteurs, d'un type nouveau, sont peu répandus et n'ont que peu été caractérisés jusqu'à présent (Emiliani *et al.* 2003), il nous est donc apparu intéressant de chercher à en déterminer précisément les différentes caractéristiques spatiales et temporelles.

1- La mesure de la durée de vie

a- Correction de la mesure de durée de vie

L'image en durée de vie de fluorescence d'un échantillon homogène (tel qu'une rhodamine, par exemple) devrait présenter un profil de durée de vie fin et centré sur la durée

de vie de l'échantillon. Or il apparaît que cette distribution est assez large (figure 9a) puisqu'elle s'étend entre 3 (pixels noirs) et 3,6 ns (pixels blancs) et que les pixels situés au centre de l'image semblent avoir une durée de vie plus longue que les autres. Cet effet est artificiel et est dû à l'électronique de mesure. En effet, le temps de propagation des impulsions électriques associées aux cascades d'électrons dépend de leurs positions dans les galettes de microcanaux. Il faut donc procéder à une correction qui permette d'annuler ces retards systématiques.

Pour ce faire, une carte de correction du temps de transit dans les microcanaux est établie en enregistrant pendant longtemps (pour avoir une bonne statistique) la fluorescence d'un échantillon de rhodamine qui sert de référence. On calcule ensuite pour chaque pixel la différence entre la durée de vie mesurée par le détecteur et la durée de vie moyenne de l'échantillon qui est la durée de vie de fluorescence de la rhodamine. La carte de correction du temps de transit (figure 9b) ainsi obtenue est ensuite automatiquement soustraite de l'image en FLIM pour donner lieu à l'image de FLIM corrigée de la différence de temps de transit dans les microcanaux (figure 9c)

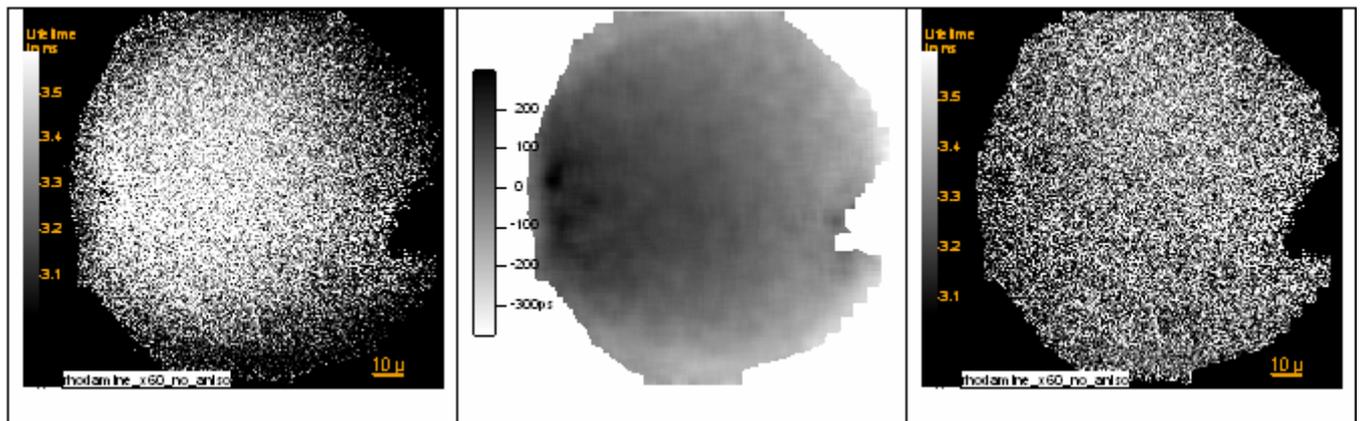


Figure 9 : Correction du temps de transit dans les microcanaux.

a) Image FLIM non corrigée d'une rhodamine 6G. b) Carte de correction du temps de transit dans les microcanaux. c) Image FLIM corrigée d'une rhodamine 6G

b- Dispersion de la durée de vie

Après la correction du temps de transit dans les microcanaux, la distribution des durées de vie d'un échantillon homogène est plus étroite.

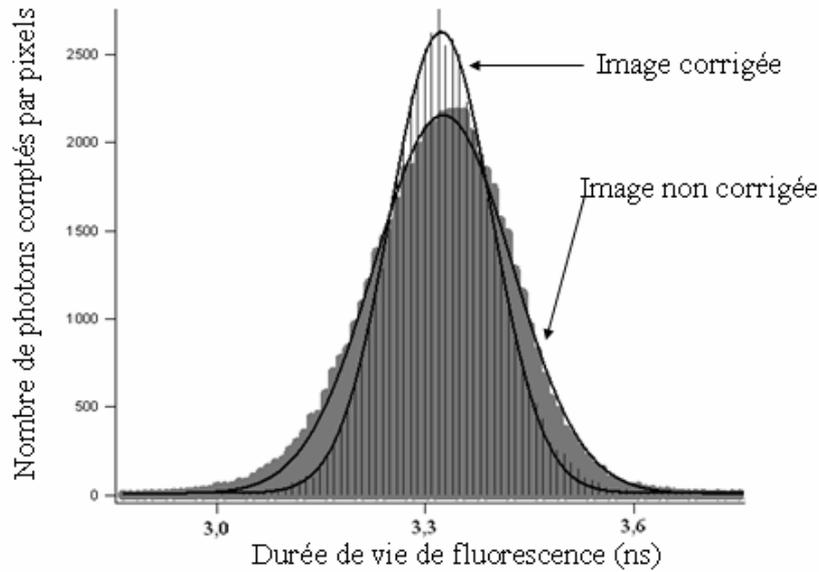


Figure 10 : Dispersion de la durée de vie de fluorescence

Nous pouvons montrer que cette dispersion est maintenant uniquement due à la statistique et qu'elle dépend donc du nombre de photons qui ont été comptés pour construire l'image. Nous avons ainsi trié les pixels de l'image en fonction du nombre de photons qui ont été comptés et représenté la dispersion de la durée de vie de fluorescence en fonction du nombre de photon comptés par pixel. On obtient une famille de gaussiennes d'autant plus fines que le nombre de photons est important.

Si on se place dans le cas d'un échantillon ne comportant qu'un seul type de fluorophore caractérisé par une seule durée de vie (τ), la fonction de distribution des temps d'arrivée d'un photon sur le détecteur $P(t)$ s'exprime de la façon suivante :

$$P(t) = \frac{\exp(-t/\tau)}{\tau} \quad (9)$$

On peut alors calculer la moyenne $\langle t \rangle$ de ce temps d'arrivée :

$$\langle t \rangle = \int_0^{\infty} P(t)t dt = \tau \quad (10)$$

ainsi que la variance V sur ce temps d'arrivée :

$$V = \int_0^{\infty} P(t)(t - \langle t \rangle)^2 dt = \tau^2 \quad (11)$$

La variance par rapport à la moyenne V_{\diamond} est quant à elle inversement proportionnelle au nombre N de photons qui ont été moyennés. On a donc :

$$V_{\diamond} = \frac{V}{N} = \frac{\tau^2}{N} \quad (12)$$

Dans le cas qui nous intéresse, l'écart type (qui est la racine carrée de la variance) est donné par la largeur de la gaussienne et doit donc être proportionnel à l'inverse de la racine carrée du nombre de photon, ce qui est bien le cas (figure 11). La précision sur la mesure de la durée de vie est donc limitée par la statistique sur le comptage des photons. Plus grand sera ce nombre, plus l'image sera précise. A noter que si l'on extrapole la régression linéaire, on s'attendrait à arriver à l'origine, or à nombre de photons comptés infini, on arrive à une valeur de 39 ps qui signe la qualité relative de notre carte de correction de la mesure en durée de vie. Nous verrons cependant que cette valeur est en dessous de la résolution temporelle de notre montage.

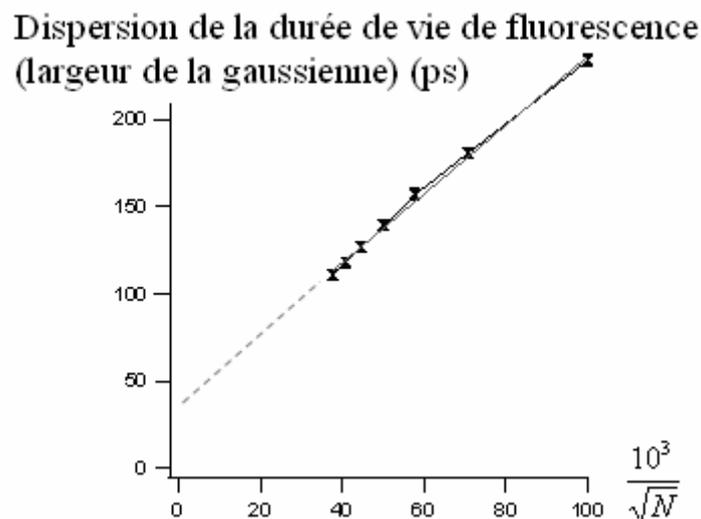


Figure 11: Dispersion de la durée de vie de fluorescence en fonction de l'illumination des pixels.

c- Résolution temporelle

La résolution temporelle de ce montage imageur est limitée par celle du détecteur. Afin de la déterminer, nous enregistrons une impulsion de 1,2 ps du laser après avoir enlevé les différents filtres jaunes qui coupent habituellement les longueurs d'ondes en dessous de 500 nm et qui nous affranchissent d'éventuelles réflexions du laser en direction du détecteur. Le déclin est présenté sur la figure 12. Sa largeur à mi-hauteur est de 310 ps. La correction sur la différence de temps de transit détaillée plus haut peut être également appliquée aux photons qui servent à la construction de ce déclin. La largeur à mi-hauteur est alors de 150 ps. La résolution temporelle des détecteurs à comptage de photon résolu dans le temps est limitée par la dispersion des temps de transit des avalanches à l'intérieur des photomultiplicateurs. Il

apparaît que cette dispersion dépend du diamètre des canaux de la galette. 150 ps est bien l'ordre de grandeur attendu pour des galettes de 12 μm de diamètre (Wiza 1979).

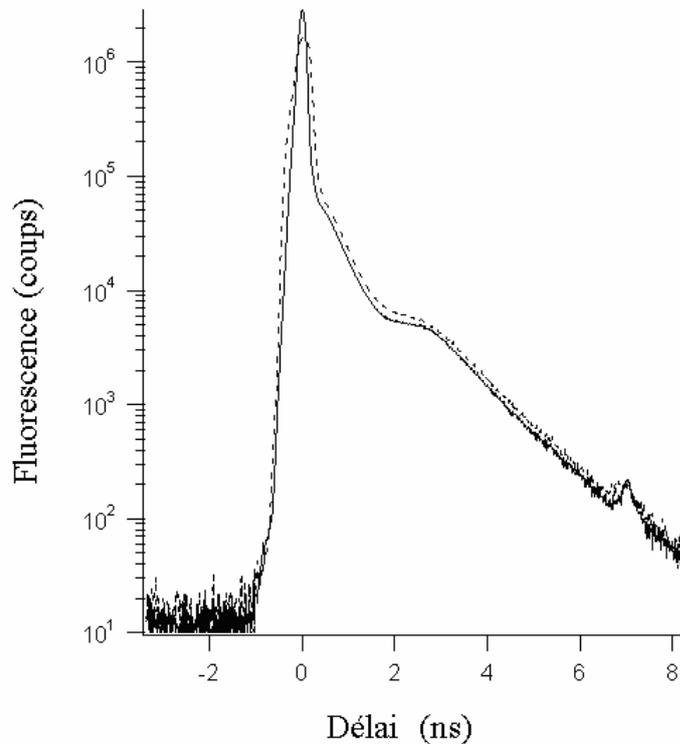


Figure 12 : Impulsion laser (en pointillés) et impulsion laser corrigée de la différence de temps de transit (en trait plein)

d- Utilisation des différents objectifs

Au cours des différentes expériences, nous sommes amenés à utiliser quatre objectifs de différents grossissements. Bien que ceux-ci soient conçus et montés pour travailler avec les mêmes distances de travail, un léger décalage temporel est cependant constaté. En effet, le trajet par l'objectif X 40 est plus court de 75 ps par rapport aux objectifs X 10 et X 60 alors que l'objectif X 100 induit un retard supplémentaire de 65 ps. Afin de pouvoir comparer les déclins obtenus aux différents grossissements, ces décalages sont automatiquement corrigés lors du traitement informatique des données.

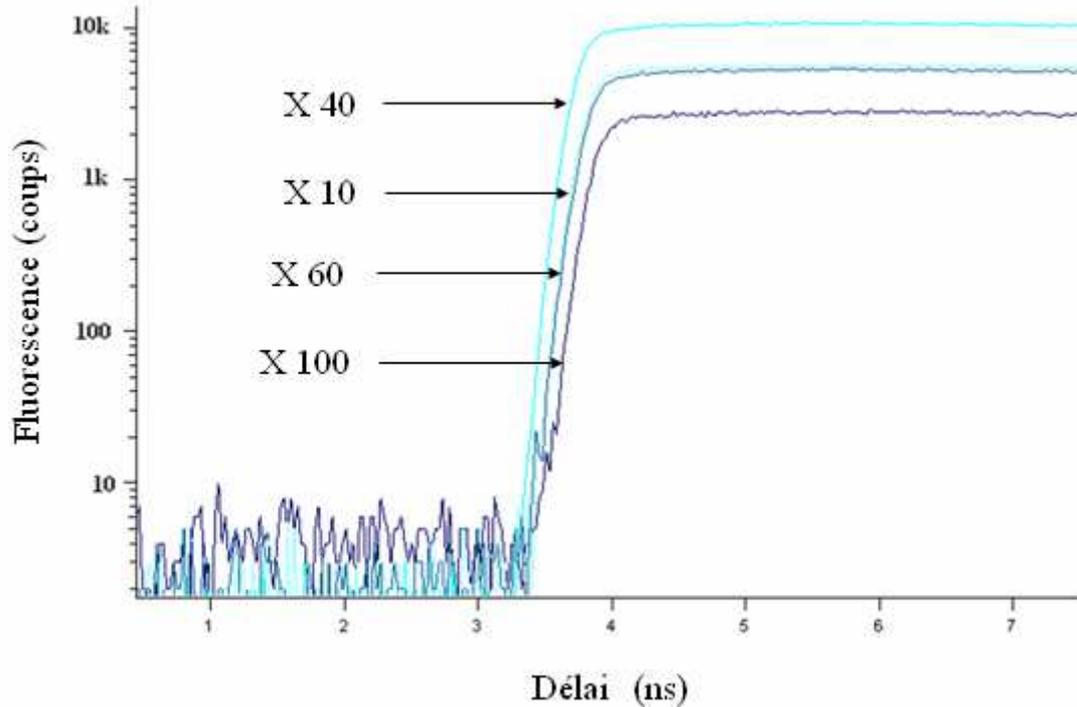


Figure 13 : Décalages temporels dus aux différents objectifs. Avant d'être recalés automatiquement, le faisceau traversant l'objectif X40 est en avance de 75 ps alors que celui traversant le X100 est en retard de 65 ps par rapport aux objectifs X60 et X10.

2- La mesure de l'intensité

a- Correction du gain

La mesure de l'imagerie en intensité nécessite aussi un certain nombre de corrections afin d'obtenir des images correctes. En effet, si notre instrument n'est pas dédié à la mesure unique et absolue de l'intensité de fluorescence, il peut être intéressant d'avoir en parallèle de l'image en FLIM une image en intensité. L'homogénéité de la détection en intensité de fluorescence dépend d'un certain nombre de paramètres internes ou externes à l'expérience.

Ainsi, la sensibilité de la surface du détecteur n'est pas uniforme, il se peut que certaines zones soient plus sensibles ou que certains canaux provoquent un nombre plus ou moins important d'électrons secondaires. Il faut donc d'une part s'affranchir de cette sensibilité interne de notre détecteur. D'autre part, la qualité de l'éclairage de l'échantillon est également primordiale. Il faut éviter que certaines zones soient plus irradiées et émettent de ce fait plus de photons de fluorescence que d'autres. Si l'on s'efforce de régler au mieux l'alignement de Köhler du laser avant chacune des campagnes d'expérience, une précaution

importante consiste à faire l'image d'un échantillon homogène de la même nature que celui utilisé pour la correction du temps de transit.

L'image en intensité d'un tel échantillon devrait être uniforme. L'image brute dessine cependant les imperfections intrinsèques du détecteur (telles que, par exemple, les petits points noirs insensibles sur la droite de l'image non corrigée) ainsi qu'éventuellement de l'éclairage. Cette image sert alors au calcul d'un facteur de correction qu'on appellera par la suite carte de gain qui va permettre de lisser ces différentes variations afin d'obtenir une image plus uniforme. Cette carte de gain sera par la suite utilisée pour corriger toutes les images de la campagne d'expérience.

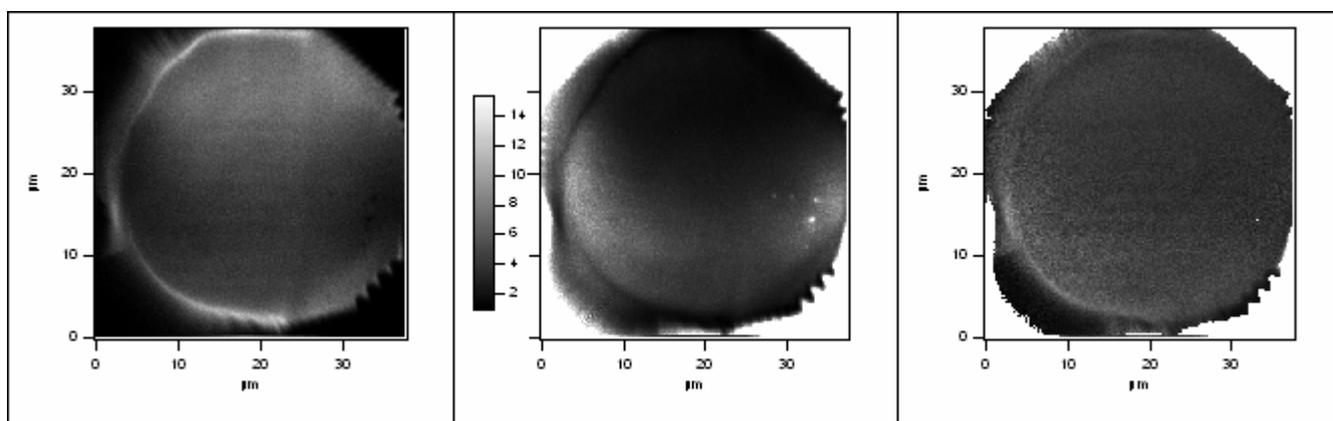


Figure 14 : Correction du gain. a) Image en intensité non corrigée de l'échantillon de rhodamine 6G de référence. b) Carte de correction du gain c) Image en intensité corrigée de l'échantillon de rhodamine 6G de référence

b- Saturation du détecteur

Pour l'imagerie en intensité de fluorescence par comptage monophotonique, il est nécessaire de réaliser un nouveau compromis entre la puissance excitatrice, le photoblanchiment de l'échantillon, la vitesse d'acquisition d'une image et la saturation du détecteur. Pour déterminer le seuil de comptage optimal du détecteur, nous avons réalisé des images avec différentes intensités laser et nous avons comparé le nombre de photons qui étaient envoyés sur l'échantillon, le nombre de photons de fluorescence qui étaient envoyés sur le détecteur et le nombre de photons qui étaient effectivement traités par l'électronique du Q_A. Il apparaît qu'au-delà d'un taux de comptage de 30 000 coups par seconde, l'électronique n'est pas suffisamment rapide pour traiter tous les photons et qu'il y a saturation du nombre de photons effectivement comptés. Il n'est donc pas nécessaire d'utiliser un taux de comptage

supérieur à cette limite de 30 000 coups par secondes, c'est pourquoi le flux du laser est limité par l'utilisation de filtres neutres afin d'obtenir une fluorescence qui ne dépasse pas ce seuil. A noter qu'au niveau de ce seuil, la fluorescence n'est pas visible à l'œil nu directement dans l'objectif du microscope. Elle est néanmoins suffisante en raison de l'excellente sensibilité de notre détecteur. Cela nous permet donc de travailler à un très faible taux d'irradiation et donc de ne pas trop détériorer l'échantillon par photoblanchiment.

c- Temps mort

A partir de ces images, il est aussi possible de déterminer le temps de traitement d'un photon par l'électronique, c'est-à-dire l'intervalle minimal entre deux photons successifs qui peuvent être pris en compte. Pour ce faire, on s'intéresse à l'intervalle de temps qui sépare deux photons successifs enregistrés par le détecteur. Cet intervalle est présenté sur la figure 15. L'agrandissement à l'origine montre que deux photons sont toujours séparés d'au moins 2,1 μs qui représente le temps mort pendant lequel le détecteur ne peut pas enregistrer un nouveau photon.

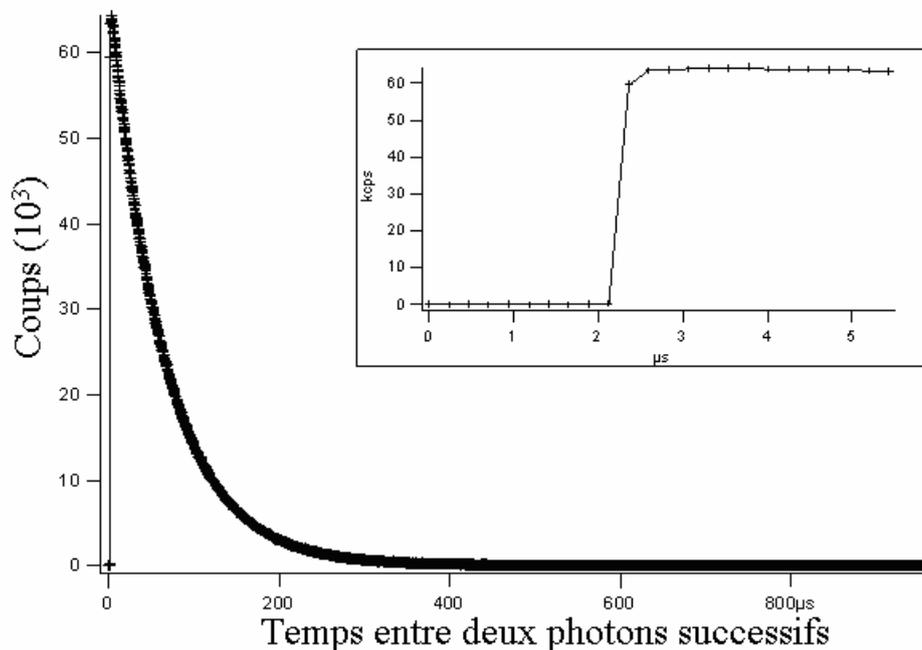


Figure 15 : Détermination du temps mort du détecteur.

Deux considérations sont à prendre en compte vis-à-vis de cette valeur du temps mort de notre détecteur. Tout d'abord, ce temps est largement inférieur au temps moyen qui sépare deux photons sous le taux de comptage retenu ($\sim 33 \mu\text{s}$). Ensuite, ce temps est à

comparer avantageusement avec les temps mort d'autres dispositifs tels que les caméras CCD qui sont de l'ordre de la milliseconde.

3- La résolution spatiale

a- Détermination de la résolution

La détermination de la résolution spatiale de notre instrument se fait en utilisant des billes fluorescentes commerciales emprisonnées dans une matrice polymère de polyvinyle alcool (PVA). Ces billes sont choisies avec un diamètre de 20 nm qui est en dessous de la résolution attendue. La taille des objets lumineux enregistrés sera la résolution de l'instrument. Des images de ces billes fluorescentes sont enregistrées à différentes altitudes à l'aide d'une platine à déplacements contrôlés piezoélectriquement afin d'être sûr de trouver la taille minimum de l'image de ces objets. Lorsque l'on s'éloigne de cette position de netteté, on peut observer les anneaux de diffraction de la lumière par ces objets.

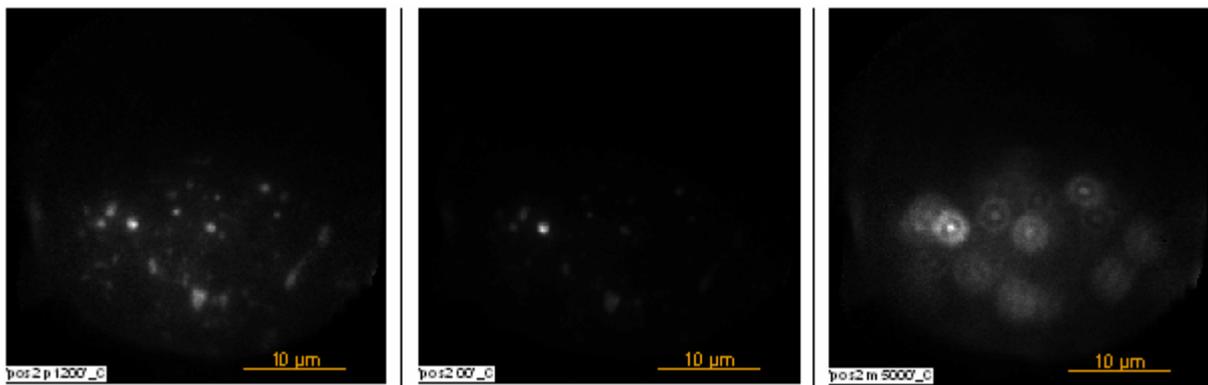


Figure 16 : Images de billes fluorescentes de 20 nm prises dans une matrice polymère de PVA (objectif X60). L'image centrale est prise dans le plan focal alors que celle de gauche (resp. droite) est prise 1,2 μm en dessous (resp. 5 μm au dessus) du plan focal.

On choisit alors sur cette image les plus petits objets fluorescents qui sont des billes isolées. Il est possible de modéliser les taches lumineuses par des gaussiennes à deux dimensions. (Figure 17). A noter que la taille de ces objets fluorescents est supérieure à la taille d'un pixel de l'image. Il n'y a donc pas de limitation supplémentaire de la résolution spatiale due à la taille des pixels.

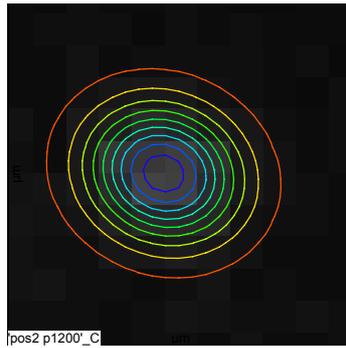


Figure 17 : Ajustement d'une tache par une gaussienne à deux dimensions.

La largeur de la gaussienne est alors portée en fonction de l'altitude du cliché (figure 18). On obtient une série de variations de type parabolique dont le minimum correspond à une gaussienne de 200 nm de largeur.

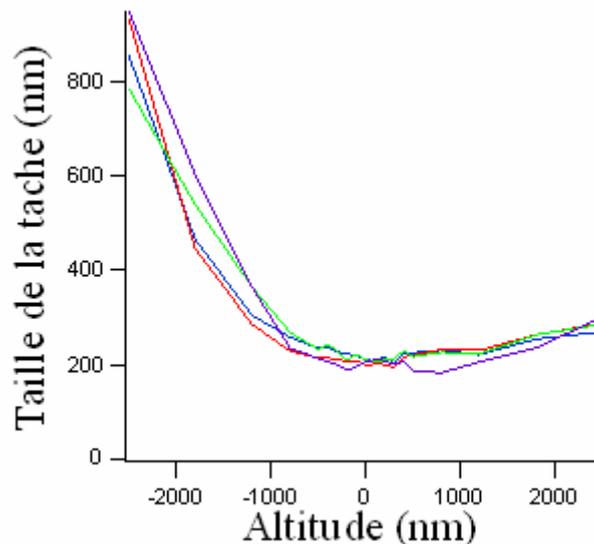


Figure 18 : Evolution de la taille de la tache de diffraction de billes fluorescentes avec l'altitude de focalisation. (Objectif X60)

La figure de diffraction d'une source ponctuelle par le microscope au niveau du détecteur est donnée par

$$I(r) = \left(\frac{J_1(r)}{r} \right)^2 \quad (13)$$

où J_1 est la première fonction de Bessel.

A partir de cette expression, il est possible de calculer qu'une gaussienne de 200 nm de largeur correspond à une tache d'Airy de 410 nm de rayon. Cette valeur est à comparer avec la valeur obtenue par la relation d'Abbe à 550 nm (émission des billes) qui est de 353

nm pour l'objectif X60 (ouverture numérique 0,95). Cette valeur pourrait être améliorée en corrigeant des aberrations sphériques de l'objectif.

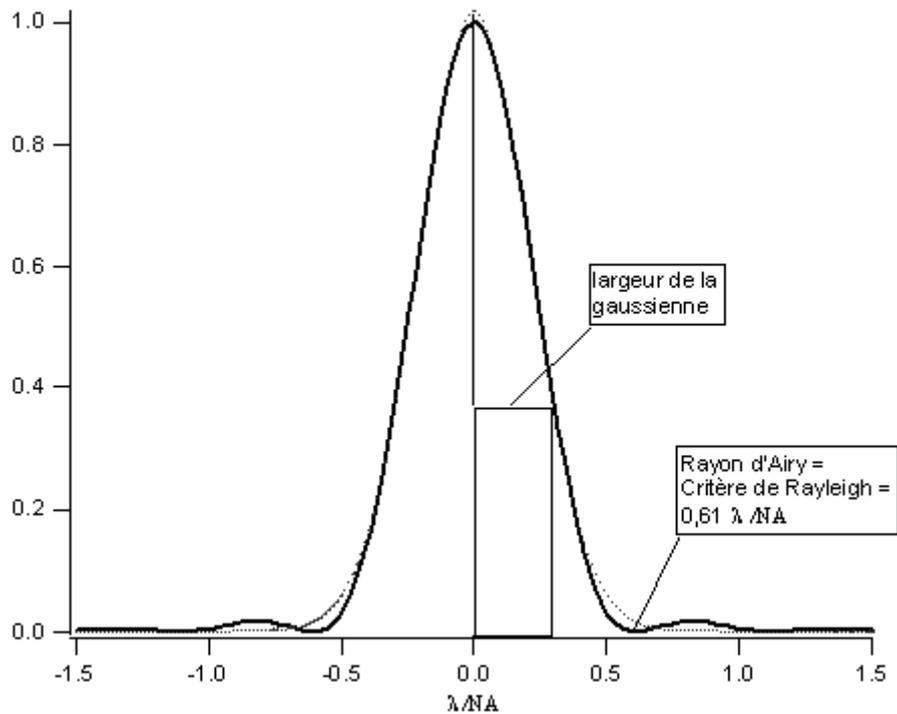


Figure 19 : Correspondance entre largeur de gaussienne et rayon d'Airy.

b- Echelle

La détermination de l'échelle attachée à chacune des images obtenues sur le microscope a été faite en mesurant l'image en transmission de mires de précision gravées sur un miroir.

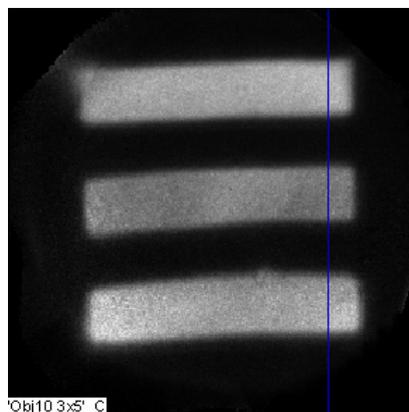


Figure 20 : Image d'une mire pour la détermination de l'échelle.

Les résultats chiffrés de cette détermination de l'échelle sont présentés dans le tableau 1 et une barre d'échelle est par la suite automatiquement insérée sur les images.

Objectif	Dimension d'un pixel de l'image (nm)	Taille du champ d'observation (μm)
10	1253	320
40	285	70
60	203	50
100	119	30

Tableau 1 : Détermination de l'échelle des images

Ainsi, nous avons développé au laboratoire un instrument qui nous permet de faire sous microscope l'imagerie plein champ de l'intensité et de la durée de vie de fluorescence par comptage monophotonique. Cet appareil, dont les résolutions spatiales et temporelles ont été caractérisées, offre la possibilité, en plus de l'imagerie de reconstruire les déclins de la fluorescence résolue dans le temps sur des zones d'intérêt qui peuvent aller jusqu'à l'un des 256x256 pixels de l'image.

A partir des données enregistrées par ce nouvel instrument et dans l'optique générale de ce travail qui s'attache à la mesure des paramètres d'anisotropie de fluorescence stationnaire et résolue de le temps, il nous est apparu intéressant de pouvoir également l'utiliser pour faire l'imagerie de l'anisotropie de fluorescence résolue dans le temps, connue sous l'acronyme trFAIM (*time resolved Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy*).

PARTIE II – Le trFAIM

I – Les différentes techniques

Les différentes techniques développées pour faire l'imagerie de la durée de vie peuvent être utilisées pour faire de l'imagerie de l'anisotropie de fluorescence. Il faut simplement parvenir à contrôler la polarisation de la fluorescence des images enregistrées.

L'obtention des images parallèles et perpendiculaires peut être successive comme c'est le cas dans l'exemple présenté par Jovin et ses collaborateurs. Ils utilisent un montage de fluorimétrie de phase et mesurent les composantes parallèles et perpendiculaires sélectionnées par des polariseurs situés sur le trajet optique (Clayton *et al.* 2002). Cependant, cette technique a pour principal défaut d'enregistrer les deux polarisations de la fluorescence du même échantillon à deux instants différents et ne permet donc pas d'étudier des échantillons qui évoluent dans une échelle de temps comparable à celle de la mesure.

Il est donc plus intéressant de faire l'acquisition simultanée des deux polarisations qu'il faut donc séparer. Pour ce faire, on utilise un dispositif de polarisation qui fonctionne selon le principe d'un prisme de Glan-Taylor (figure 21). Ce prisme est constitué de deux prismes triangulaires comportant un angle droit taillés parallèlement à l'axe optique d'un matériau biréfringent, généralement la calcite. La calcite est un minéral naturel de carbonate de calcium (CaCO_3). La propriété fondamentale d'un matériau biréfringent est qu'il peut partager un faisceau incident en deux faisceaux orthogonalement polarisés. Un des deux faisceaux, dont la polarisation est orthogonale à l'axe principal du prisme, est alors dit ordinaire, suit les lois de Snell-Descartes et est totalement réfléchi. L'autre polarisation est transmise parallèlement au faisceau incident à l'intérieur du second prisme, on parle de faisceau extraordinaire.

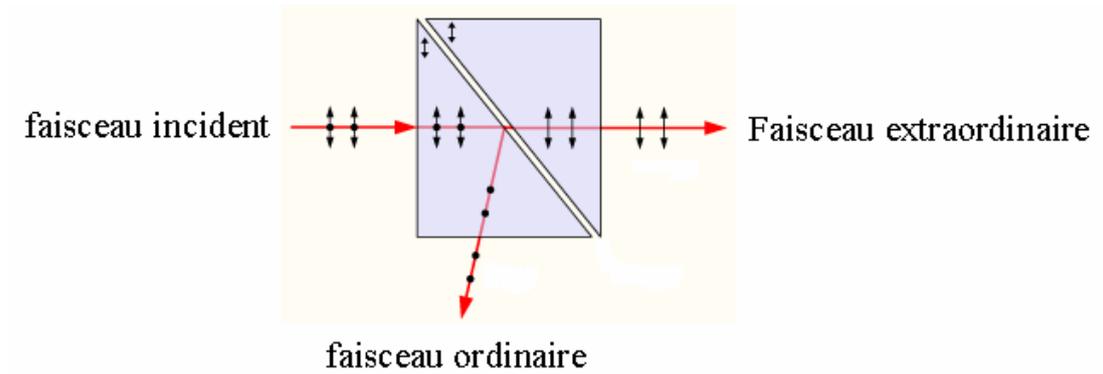


Figure 21 : Prisme de Glan-Taylor

Ce type de dispositif a été utilisé par French et ses collaborateurs dans le système de trFAIM à portes temporelles qu'ils décrivent (Siegel *et al.* 2003).

II – Nos choix techniques

1- Le système

Pour les raisons déjà plusieurs fois énoncées ici, nous avons fait le choix d'une acquisition simultanée des deux polarisations de la fluorescence afin de pouvoir faire de l'imagerie dynamique. Dans notre montage, la séparation des deux polarisations orthogonales de la fluorescence est obtenue grâce à un cube polarisant qui fonctionne selon le même principe qu'un prisme de Glan-Taylor (figure 22). Les deux polarisations sont donc envoyées dans deux directions orthogonales.

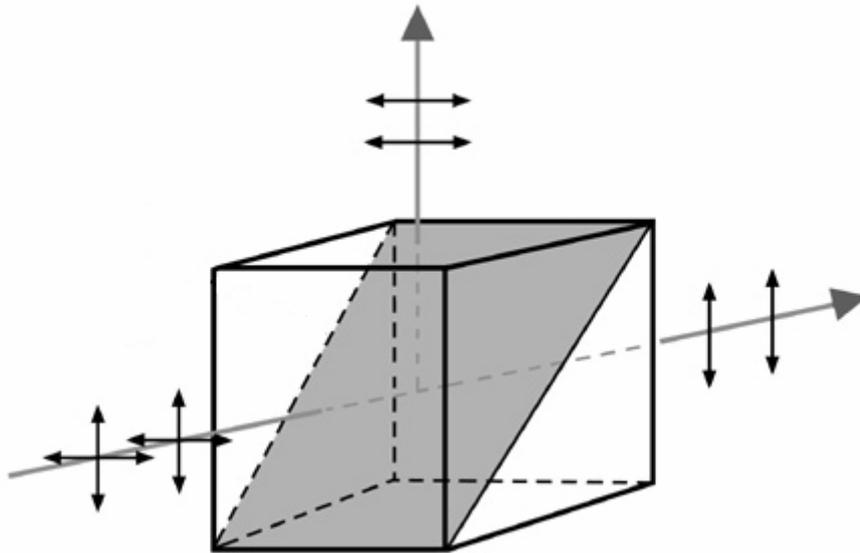


Figure 22 : Cube polarisant

Puisque nous ne disposons que d'un seul détecteur, il faut réorienter l'un des deux faisceaux pour qu'ils soient à nouveau colinéaires. Compte tenu de la forme circulaire de la surface sensible de notre détecteur et afin de maximiser la surface utilisable, il nous est apparu intéressant d'ajouter à ce changement de direction un retournement de l'image afin d'avoir côte à côte deux images symétriques qui ne diffèrent que par leur polarisation. Un pentaprisme est donc utilisé pour effectuer cette réorientation et ce retournement. (Figure 23). Ainsi, la polarisation horizontale est transmise alors que la polarisation verticale est réfléchie puis retournée et orientée vers le détecteur.

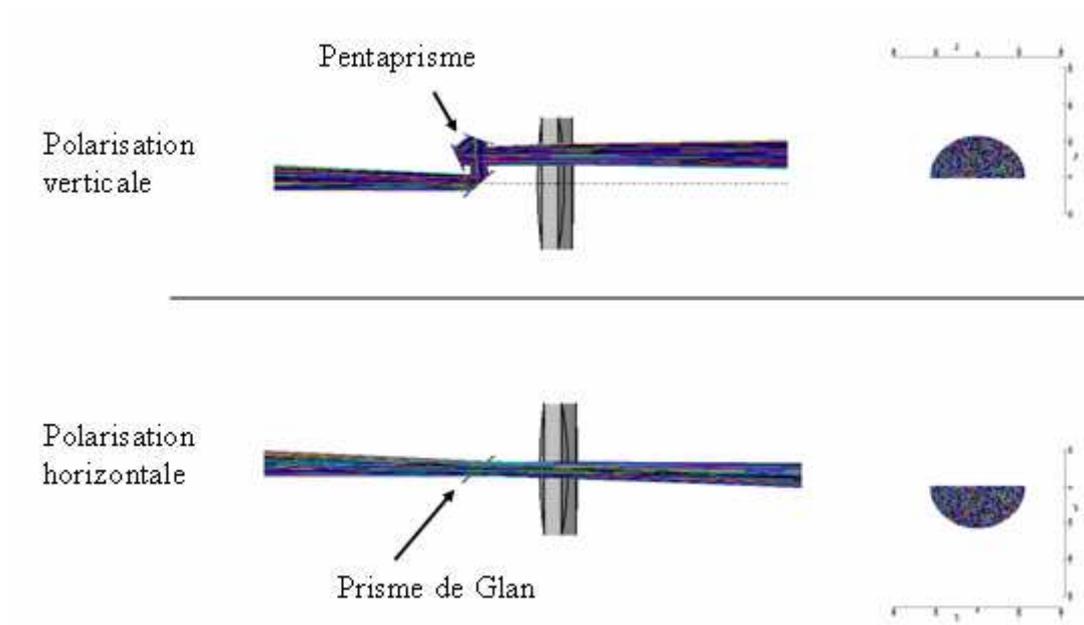


Figure 23 : Séparation des faisceaux et réorientation vers le détecteur

Dans notre système, le dispositif d'anisotropie constitué par le cube polarisant et le pentaprisme est un dispositif amovible monté sur un chariot, ce qui nous permet de faire soit du FLIM classique soit du trFAIM. Il arrive que ces manipulations déplacent un peu les optiques, un réglage est parfois nécessaire afin d'aligner les deux images qui doivent être symétriques comme sur l'exemple de la figure 24.

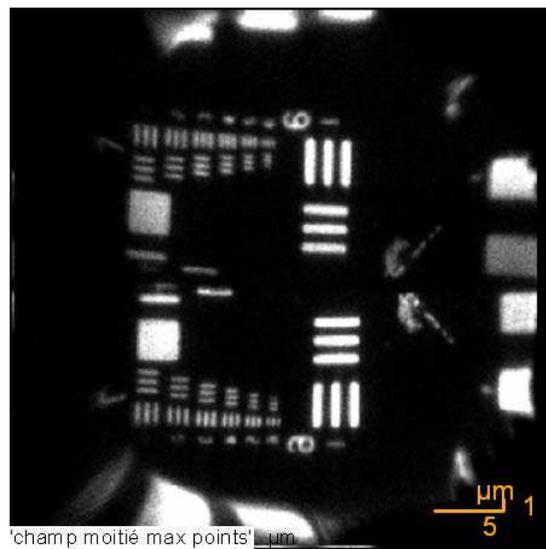


Figure 24 : Images d'une mire pour vérifier l'alignement des deux polarisations

Le trajet des deux polarisations au sein du dispositif n'est pas le même. Au-delà du parcours dans le cristal biréfringent qui ne se fait pas à la même vitesse puisque les indices de

réfractions sont différents pour les deux polarisations, la polarisation verticale suit un chemin plus long, ce qui se traduit à l'arrivée sur le détecteur par un décalage constant de 160 ps, ce qui correspond bien à une différence de marche de quelques centimètres (Figure 25). Ce décalage est bien évidemment corrigé avant tout calcul d'anisotropie.

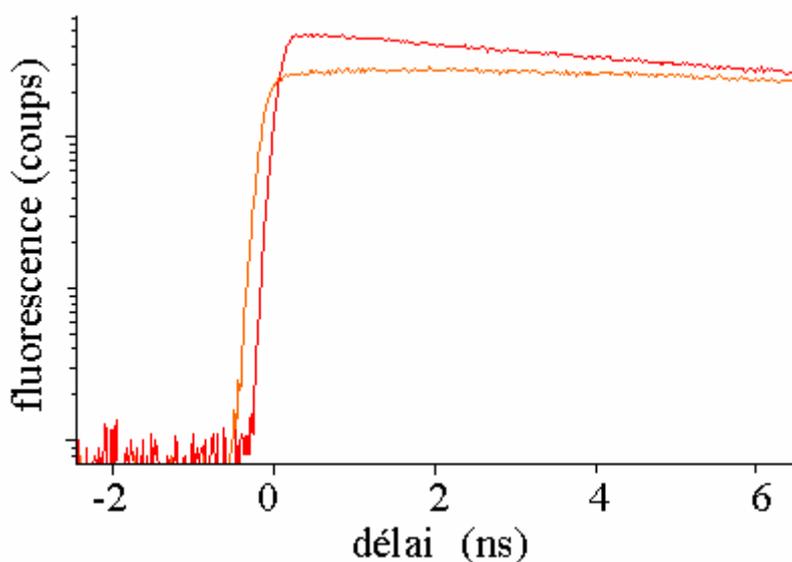


Figure 25 : Décalage dû au passage dans le dispositif de séparation des polarisations

2- Caractérisation

Après toutes les mises au point du système optique, nous nous sommes assurés que les mesures réalisées sur ce nouvel instrument correspondaient bien aux mesures qui pouvaient être faites auparavant ou par d'autres équipes. Pour ce faire, nous nous sommes tout d'abord attachés à un échantillon de référence constitué d'un fluorophore bien caractérisé dans l'équipe, le rubrène, dans un solvant particulièrement visqueux, le squalane ($\eta=37$ cP à 25°C), afin que son anisotropie soit importante et qu'elle relaxe lentement. (Figure 26)

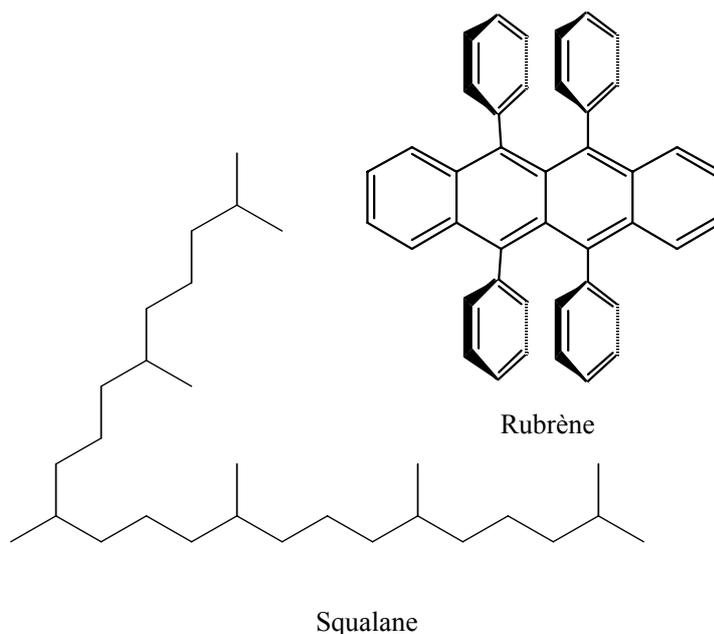


Figure 26 : Structures du rubrène et du squalane

L'image en FLIM (Figure 27) de cet échantillon peut apparaître surprenante. En effet, elle présente deux durées de vie différentes pour les deux polarisations et ce même après toutes les corrections de décalages décrites plus haut.

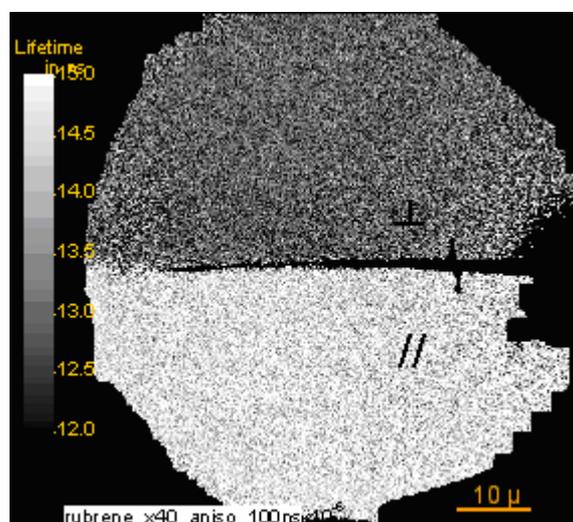


Figure 27 : Image en FLIM d'un échantillon de rubrène dans le squalane

Ces deux durées de vie apparentes sont en fait la manifestation de l'anisotropie de l'échantillon. En effet, il s'agit de durée de vie moyenne et non pas la durée de vie de fluorescence de l'échantillon qui devait être la même après relaxation de l'anisotropie. On a vu dans la définition de l'anisotropie au chapitre précédent que les déclin étaient différents selon les polarisations. Le déclin parallèle présente une composante courte due à la relaxation

de l'anisotropie alors que le déclin perpendiculaire présente quant à lui un méplat ce qui lui confère une durée de vie moyenne apparente légèrement plus longue. D'ailleurs, les déclins reconstruits sur les deux parties de l'image présentent ces profils. (Figure 28)

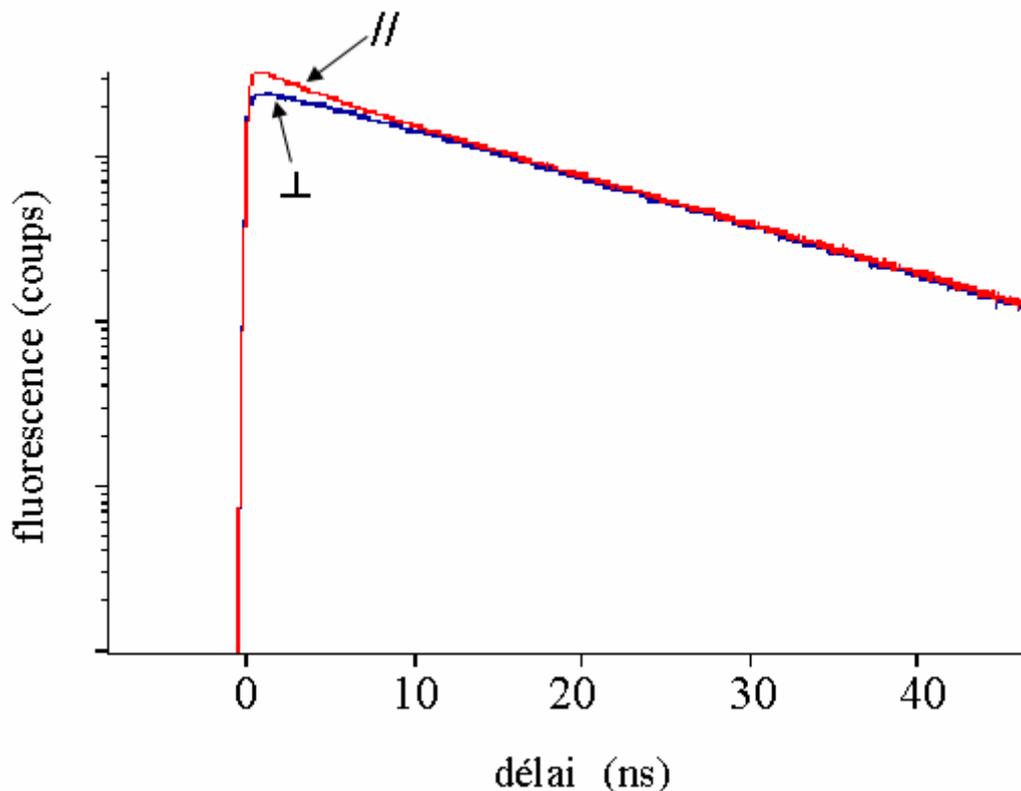


Figure 28 : Déclins de fluorescence parallèle et perpendiculaire construits à partir de l'image de la figure 27.

A partir de ces déclins, il est possible de calculer l'anisotropie de fluorescence résolue dans le temps. L'ajustement donne une valeur de temps de corrélation rotationnelle (θ) similaire à celle obtenue pour le même échantillon en cuve (3,9 ns) mais une valeur de d'anisotropie à l'origine (A_0) sensiblement plus faible à celle obtenue en cuve. Cette légère dépolarisation a été prévue par les calculs d'Axelrod (Axelrod 1979). Elle est liée à l'ouverture numérique des objectifs de microscope. Elle a notamment été mesurée sur différents systèmes comme précédemment au laboratoire (Schoutteten *et al.* 1997). Nous avons donc cherché à la caractériser en étudiant le même échantillon avec les différents objectifs dont nous disposons et en les comparant avec la mesure en cuve pour laquelle nous prenons une ouverture numérique de 0. Les déclins d'anisotropie sont présentés sur la figure 29 et les résultats des ajustements sont rassemblés dans le tableau 2.

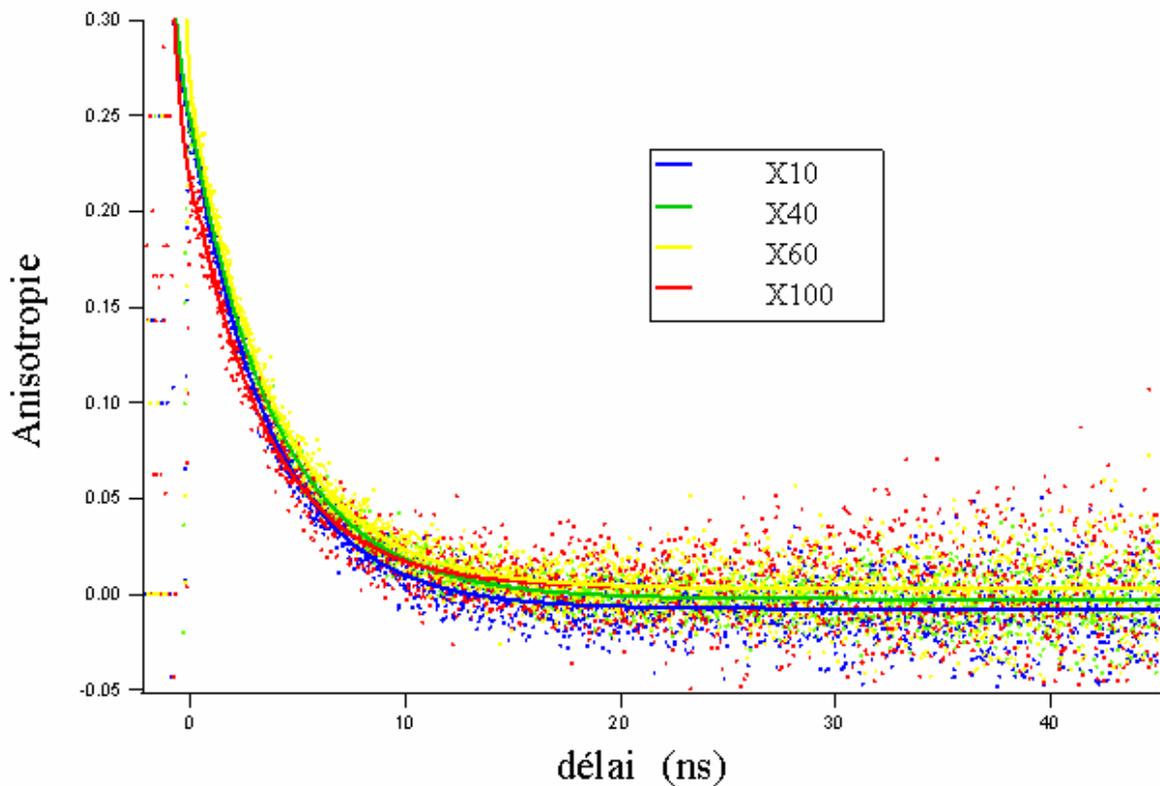


Figure 29 : Déclins d'anisotropie du rubrène dans le squalane enregistrés avec 4 objectifs d'ouverture numérique différente.

Objectif	Ouverture numérique	A_0
0	0	0.307
10	0.3	0.281
40	0.6	0.272
60	0.95	0.283
100	1.45	0.234

Tableau 2 : Dépolarisation en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif

A l'exception du dernier objectif qui a l'ouverture numérique la plus grande quand il est utilisé avec de l'huile, la variation est assez faible et nous pourrions par la suite la négliger comme le font, par exemple, French et ses collaborateurs (Siegel, Suhling *et al.* 2003).

3- Imagerie de l'anisotropie stationnaire

Notre système peut également nous permettre de faire l'imagerie de l'anisotropie stationnaire de la fluorescence en combinant judicieusement les images en intensité des différentes polarisations après avoir établi une bonne correspondance entre les pixels des deux

parties de l'image et en s'affranchissant des différences d'intensités entre les polarisations horizontales et verticales (fonction d'appareil).

A la suite de cette caractérisation et de cette validation de notre nouvel instrument, nous avons pu l'utiliser pour imager des polymères d'actine polymérisés *in vitro*.

III – Résultats

Nous présenterons dans cette section quelques résultats caractéristiques et représentatifs obtenus avec cet instrument d'une part en anisotropie résolue dans le temps puis d'autre part en imagerie de l'anisotropie stationnaire de fluorescence.

1- Images et calculs de la relaxation de l'anisotropie de fluorescence de polymères d'actine *in vitro*

Un échantillon d'actine purifié est polymérisé dans les mêmes conditions que celles du test décrit dans le premier chapitre de ce manuscrit (5% d'actine-Alexa). Il est disposé sur la platine du microscope décrit dans ce chapitre. Une photographie en transmission de cet échantillon est donnée sur la figure 30.

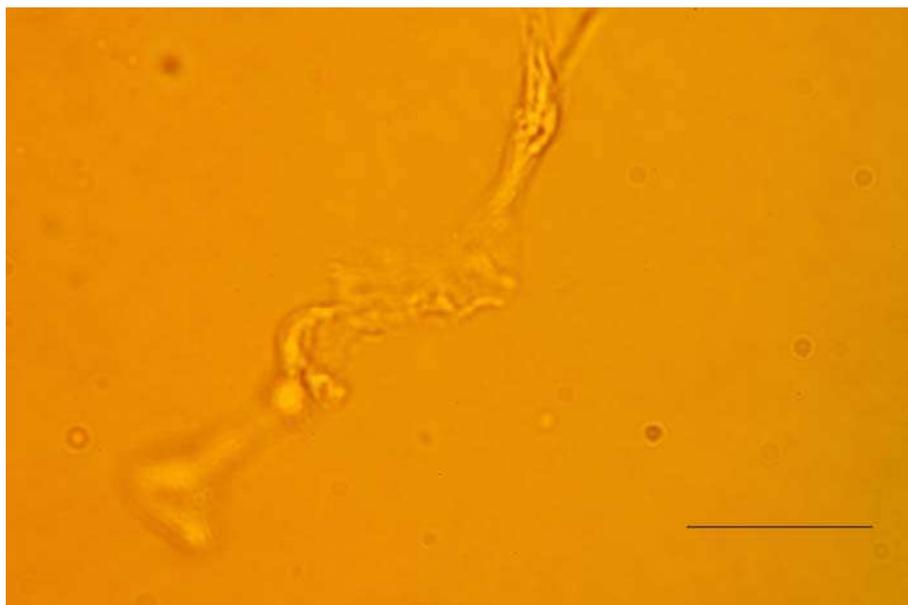


Figure 30 : Photographie en transmission d'un faisceau de filaments d'actine
La barre d'échelle correspond à 10 μm

L'image en intensité de fluorescence est présentée sur la figure 31. A noter que contrairement aux précédentes images de filaments polymérisés en microscopie confocale (Chapitre 1), le filament ici présenté n'a pas subi de marquage fluorescent supplémentaire à la phalloïdine. Contrairement au capteur CCD conventionnel du microscope Leica, notre détecteur est suffisamment sensible pour faire l'imagerie d'un polymère dont seulement une faible proportion (5%) des monomères est marquée.

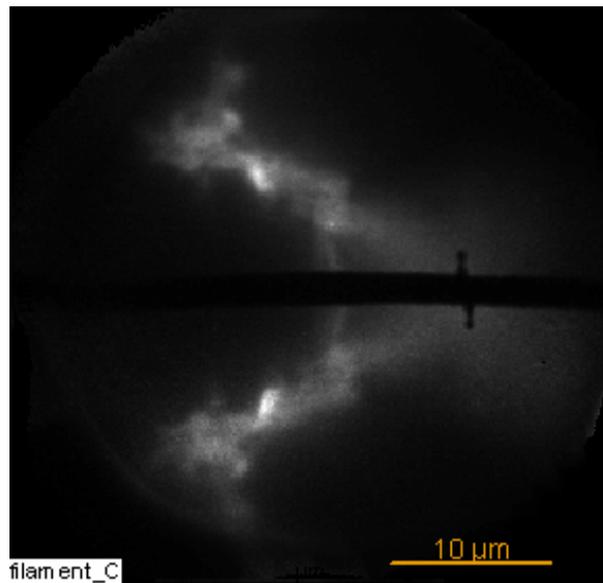


Figure 31 : Image en intensité de fluorescence du faisceau filament d'actine

L'ensemble des photons qui a servi à construire cette image en intensité peuvent également servir à construire l'image de FLIM (Figure 32). Sur cette image, les pixels qui ont une durée de vie moyenne de l'ordre de 4 ns (soit la durée de vie de fluorescence de l'Alexa) apparaissent en blanc. On peut reconnaître la forme du filament qui apparaît sur l'image en intensité.

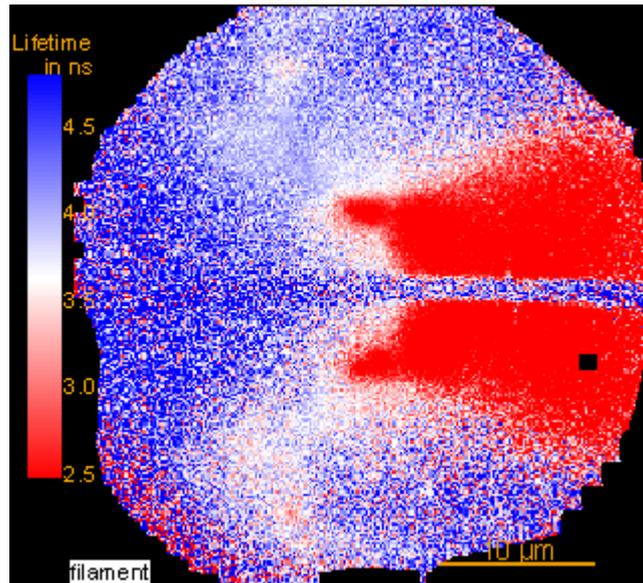


Figure 32 : Image en FLIM d'un faisceau de filaments d'actine

En ce qui concerne le fond de l'image, on constate d'une part une majorité de pixels présentant une durée de vie plus longue (> 5 ns), il s'agit du bruit de fond de l'instrumentation. Peu de photons sont comptés dans cette zone, et donc la statistique est faible et la durée de vie n'est pas vraiment significative. D'autre part, la partie sur la droite de l'image présente une zone avec des pixels ayant une durée de vie plus courte (< 2 ns). Il s'agit vraisemblablement d'une diffraction parasite due au laser. Pour la suite des acquisitions, des filtres jaunes ont été ajoutés juste avant le cube polarisant afin de couper ces parasites. Cela n'est cependant pas trop grave puisque la zone concernée ne recouvre pas les filaments étudiés.

Ainsi, on peut sélectionner sur l'image la zone qui correspond aux filaments et reconstruire le déclin de la fluorescence selon les deux polarisations. Ces déclins sont donnés sur la figure 33.

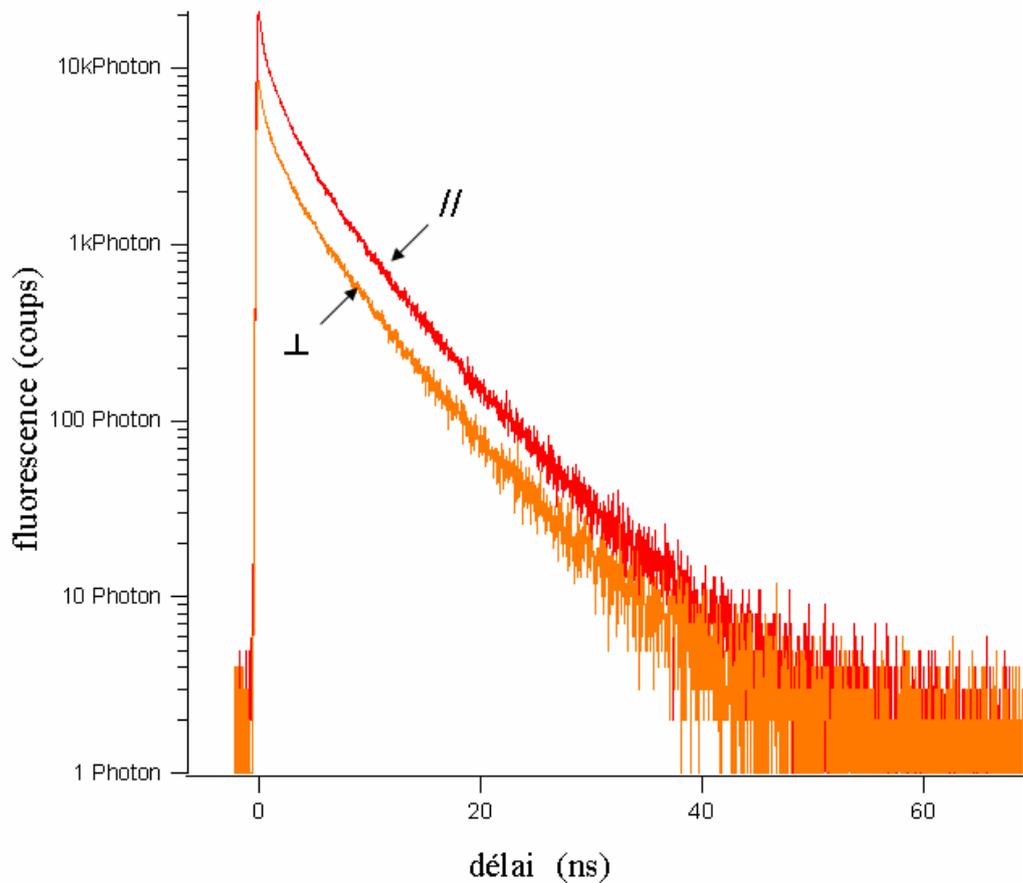


Figure 33 : Déclins de fluorescence parallèle et perpendiculaire des filaments d'actine polymérisée.

A partir de ces déclins, il est possible de calculer le déclin de l'anisotropie de fluorescence qui est donné sur la figure 34. Un ajustement de ce déclin d'anisotropie par une monoexponentielle décroissante peut être réalisé et le temps caractéristique τ_C associé à ce déclin est de 2,4 ns, ce qui est tout à fait cohérent avec les valeurs déterminées en cuves et présentées dans le chapitre précédent (figure 1-25).

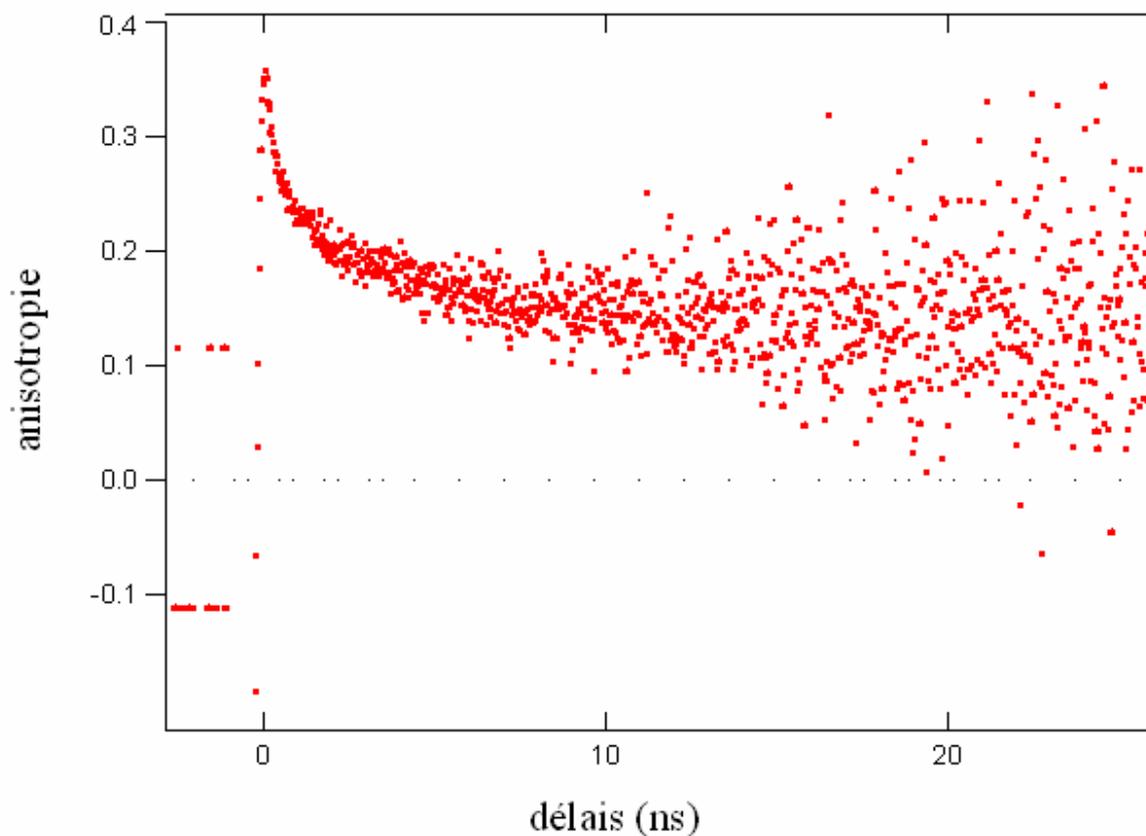


Figure 34 : Déclin de l'anisotropie de fluorescence des filaments d'actine polymérisée

2- Imagerie de l'anisotropie stationnaire pixel par pixel

Comme annoncé plus haut, un autre développement possible de notre instrument consiste en l'utilisation de l'image en intensité pour faire l'image de l'anisotropie stationnaire par simple calcul du rapport

$$Im(aniso) = \frac{Im(//) - G.Im(\perp)}{Im(//) + 2G.Im(\perp)} \quad (14)$$

après avoir établi la correspondance entre les pixels des images parallèle et perpendiculaire et déterminé la fonction d'appareil (G). Un exemple d'une telle image est donné ci-dessous.

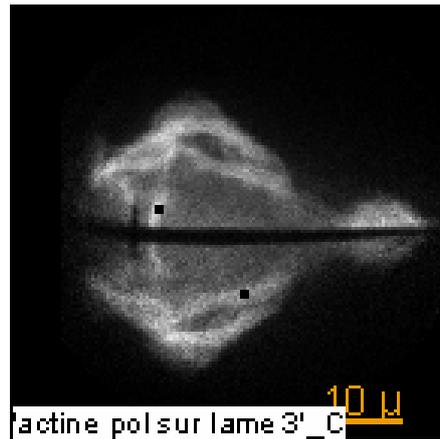


Figure 35: Image en intensité de fluorescence de filaments d'actine purifiée polymérisée

Sur l'image d'anisotropie stationnaire calculée (figure 36), les pixels correspondant aux filaments polymérisés ressortent avec une couleur caractéristique d'une anisotropie relativement élevée de l'ordre de 0,2 qui est bien l'ordre de grandeur mesuré pour l'anisotropie stationnaire d'un filament par des techniques classiques en cuve présentées dans le chapitre précédent.

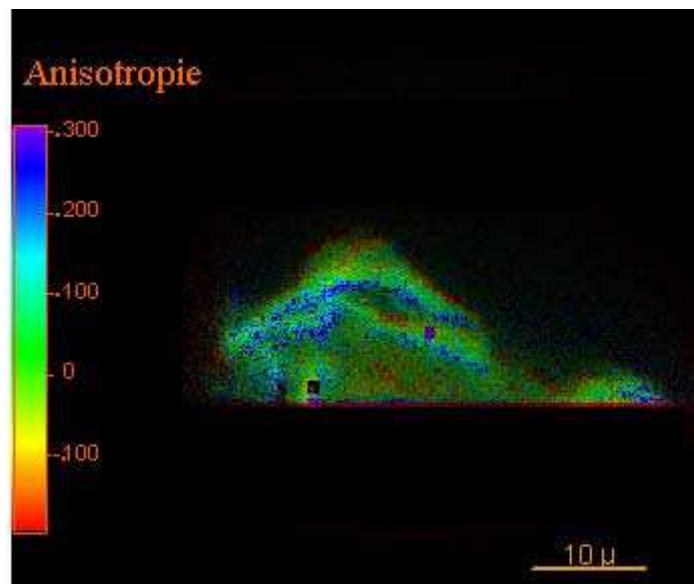


Figure 36 : Image en anisotropie stationnaire de filaments d'actine purifiée polymérisée

IV – Perspectives

Deux voies restent maintenant intéressantes à explorer afin de prolonger cette étude et de profiter au maximum des possibilités de notre instrument. La première consisterait à étudier la dynamique de la polymérisation de l'actine et la seconde consisterait à étudier cette polymérisation *in vivo*.

La principale difficulté de l'étude de la dynamique de polymérisation de l'actine est la maîtrise de l'échantillon. En effet, les images étudiées jusqu'à maintenant sont des images de filaments déjà formés qu'il est relativement facile de trouver sur la lamelle d'un microscope ; un échantillon en cours de polymérisation est en revanche plus difficile à trouver. Il pourrait être avantageux d'initier la polymérisation en un endroit donné de l'échantillon afin de savoir *a priori* où sera la zone d'intérêt. Pour ce faire, il pourrait s'avérer intéressant d'utiliser le système développé à l'Institut Curie par l'équipe de Cécile Sykes (Plastino *et al.* 2004; Bernheim-Groswasser *et al.* 2005 ; van der Gucht *et al.* 2005). Dans ce système, l'étude de la polymérisation *in vitro* de l'actine se fait sur des microbilles de polystyrène recouvertes de protéines (Arp2/3, VASP). Ces protéines permettent l'organisation des polymères d'actine qui forment alors des « comètes » et propulsent la bille. La polymérisation de l'actine est évaluée par le halo de fluorescence de la comète et le déplacement de la bille. Dans notre cas, on pourrait fixer la bille afin d'initier la polymérisation de l'actine exactement sous l'objectif du microscope et suivre ainsi la polymérisation en direct.

A partir de là, une image peut être enregistrée pendant le temps de la polymérisation. Le fichier d'acquisition peut alors être sectionné afin de reconstruire le film de la polymérisation sous ses différents aspects : intensité, FLIM, anisotropie stationnaire, trFAIM. Des programmes IGOR sont d'ores et déjà développés dans cette perspective.

Un second aspect qui semblerait être intéressant à envisager serait l'aspect *in vivo* des mesures de l'anisotropie de fluorescence de polymères d'actine marqués par l'Alexa488. Pour ce faire, il faut un moyen d'internaliser dans les cellules de l'actine-Alexa488 que, contrairement aux protéines GFP, la cellule ne peut pas exprimer. Différentes techniques existent pour réaliser le passage de protéines marquées à l'intérieur de la membrane (Small *et al.* 1999). La technique la plus utilisée est la microinjection (Wang et Sanders 1990; Wang 1994) qui utilise des microseringues pour amener directement les protéines fluorescentes dans

les cellules. On peut également gratter directement la surface des cellules, on parle alors de « scrape loading » (Fechheimer *et al.* 1986). La technique dite d'électroporation utilise des microélectrodes afin d'ouvrir des pores dans la membrane cellulaire sous l'effet d'un champ électrique (Neumann *et al.* 1999). Une fois les protéines fluorescentes introduites dans les cellules par l'une de ces techniques, on pourrait observer leur incorporation dans le cytosquelette dynamique et faire l'imagerie des polymères ainsi formés.

Références

- Axelrod, D. (1979). "Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization." *Biophys J* **26**(3): 557-73.
- Bernheim-Groswasser, A., Prost, J. et Sykes, C. (2005). "Mechanism of actin-based motility: a dynamic state diagram." *Biophys J* **89**(2): 1411-9.
- Clayton, A. H., Hanley, Q. S., Arndt-Jovin, D. J., Subramaniam, V. et Jovin, T. M. (2002). "Dynamic fluorescence anisotropy imaging microscopy in the frequency domain (rFLIM)." *Biophys J* **83**(3): 1631-49.
- Emiliani, V., Sanvitto, D., Tramier, M., Pilot, T., Petrasek, Z., Kemnitz, K., Durieux, C. et Coppey-Moisan, M. (2003). "Low-intensity two-dimensional imaging of fluorescence lifetimes in living cells." *Applied Physics Letters* **83**(12): 2471-2473.
- Fechheimer, M., Denny, C., Murphy, R. F. et Taylor, D. L. (1986). "Measurement of cytoplasmic pH in *Dictyostelium discoideum* by using a new method for introducing macromolecules into living cells." *Eur J Cell Biol* **40**(2): 242-7.
- Gadella, T. W. J., Jovin, T. M. et Clegg, R. M. (1993). "Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): Spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale." *Biophys. Chem.* **48**(1): 221-239.
- Herman, B., Wang, X. F., Wodnicki, P., Perisamy, A., Mahajan, N., Berry, G. et Gordon, G. (1999). *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine.* W. Rettig, B. Strehmel, S. Schrader and H. Seifert. Berlin, Springer.
- Hooke, R. (1665). "Micrographia."
- Kemnitz, K., Pfeifer, L. et Ainhund, M. R. (1997). "Detector for multichannel spectroscopy and fluorescence lifetime imaging on the picosecond timescale." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* **387**: 86-87.
- Kress, M., Meier, T., Steiner, R., Dolp, F., Erdmann, R., Ortmann, U. et Ruck, A. (2003). "Time-resolved microspectrofluorometry and fluorescence lifetime imaging of photosensitizers using picosecond pulsed diode lasers in laser scanning microscopes." *J Biomed Opt* **8**(1): 26-32.
- Lang, P., Yeow, K., Nichols, A. et Scheer, A. (2006). "Cellular imaging in drug discovery." **5**(4): 343-356.
- Laurent, M., Johannin, G., Gilbert, N., Lucas, L., Cassio, D., Petit, P. X. et Fleury, A. (1994). "Power and limits of laser scanning confocal microscopy." *Biol Cell* **80**(2-3): 229-40.
- Neil, M. A., Squire, A., Juskaitis, R., Bastiaens, P. I. et Wilson, T. (2000). "Wide-field optically sectioning fluorescence microscopy with laser illumination." *J Microsc* **197** (Pt 1): 1-4.
- Neumann, E., Kakorin, S. et Toensing, K. (1999). "Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes." *Bioelectrochem Bioenerg* **48**(1): 3-16.
- Pawley, J. B. (1995). *Handbook of Biological Confocal Microscopy.* New York, Plenum Publishing Corporation.
- Plastino, J., Olivier, S. et Sykes, C. (2004). "Actin filaments align into hollow comets for rapid VASP-mediated propulsion." *Curr Biol* **14**(19): 1766-71.

- Schoutteten, L., Denjean, P. et Pansu, R. B. (1997). "Characterisation of a Time resolved Photon Counting Confocal Fluorescence Microscope." *Journal of Fluorescence* **7**(2): 155-165.
- Sibarita, J. B. (2005). *Deconvolution microscopy*. Berlin, Springer.
- Siegel, J., Suhling, K., Leveque-Fort, S., Webb, S. E. D., Davis, D. M., Phillips, D., Sabharwal, Y. et French, P. M. W. (2003). "Wide-field time-resolved fluorescence anisotropy imaging (TR-FAIM): Imaging the rotational mobility of a fluorophore." *Review of Scientific Instruments* **74**(1): 182-192.
- Small, J., Rottner, K., Hahne, P. et Anderson, K. I. (1999). "Visualising the actin cytoskeleton." *Microsc Res Tech* **47**(1): 3-17.
- So, P. T., French, T., Yu, W., Berland, K., Dong, C. Y. et Gratton, E. (1995). "Time-Resolved Fluorescence Microscopy Using Two-photon Excitation." *Bioimaging* **3**: 49-63.
- So, P. T., Konig, K., Berland, K., Dong, C. Y., French, T., Buhler, C., Ragan, T. et Gratton, E. (1998). "New time-resolved techniques in two-photon microscopy." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **44**(5): 771-93.
- Tauer, U. (2002). "Advantages and risks of multiphoton microscopy in physiology." *Exp Physiol* **87**(6): 709-14.
- van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J. et Sykes, C. (2005). "Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(22): 7847-52.
- Wang, X. F., Perisamy, A. et Herman, B. (1992). "Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) : Instrumentation and Applications." *Crit. Rev. Anal. Chem.* **23**: 369-395.
- Wang, Y. L. (1994). *Microinjection of protein into stomatic cells : needle microinjection and scrape loading*. New York, Academic press.
- Wang, Y. L. et Sanders, M. C. (1990). *An analysis of cytoskeletal structures by the microinjection and scrape loading*. New York, Wiley.
- White, J. G., Amos, W. B. et Fordham, M. (1987). "An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy." *J Cell Biol* **105**(1): 41-8.
- Wiza, J. L. (1979). "Microchannel Plate Detectors." *Nuclear Instruments and methods* **162**: 587-601.

Matériel et méthodes – Chapitre 2

Sommaire

Echantillons références.....	- 111 -
Immobilisation de nano billes fluorescentes dans des films de PVA.....	- 111 -
Polymères d'actine purifiée.....	- 112 -
Montage d'imagerie de l'anisotropie sous microscope au Q_A	- 113 -
Traitement des données.....	- 115 -
Superposition des images.....	- 115 -
Détermination de la fonction d'appareil.....	- 115 -
Références.....	- 117 -

Table des illustrations

Figure 37 : Dispositif de mesure de l'anisotropie au Q_A	- 113 -
Figure 38 : Photographie du détecteur Q_A	- 113 -
Figure 39 : Dispositif de séparation des polarisations.....	- 114 -

Echantillons références.

La caractérisation et la calibration de l'instrumentation développée nécessitent l'utilisation d'échantillons standards qui servent par la suite de référence pour les différentes cartes de corrections. Ces échantillons sont les suivants :

- Echantillon de rhodamine B à 1,4 μM dans l'eau.
- Echantillon de rubrène à 1 μM dans le squalane.

Ces deux échantillons sont ensuite observés sur lamelle de microscope de 0,17 mm d'épaisseur à l'intérieur d'une chambre dite de perfusion qui délimite un volume de 100 μL avec une épaisseur de 0,5 mm tout en limitant la perte par évaporation.

Immobilisation de nano billes fluorescentes dans des films de PVA.

Pour la détermination de la résolution spatiale de notre instrument, nous utilisons des billes fluorescentes jaunes de chez Molecular Probes TM de 20 nm de diamètre. Ces billes sont immobilisées dans des films de PolyVinylAlcool (PVA) (Méallet-Renault *et al.* 2000). Les billes sont tout d'abord passées quelques minutes dans une cuve à ultrasons afin de séparer d'éventuels agrégats puis sont diluées à 0,2 % en masse dans une solution à 1 % massique de PVA hydrolysé à 80 %. Cette solution est alors déposée sur des lamelles de microscope à la tournette pendant 5 secondes à 300 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ puis une minute à 1600 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$.

Polymères d'actine purifiée.

Les échantillons d'actine purifiée polymérisée sont obtenus selon le protocole décrit précédemment après 20 minutes de polymérisation à température ambiante.

Polymérisation d'actine purifiée	Volume
Tampon G	184 μL
Actine purifiée (stock à 5 mg.mL ⁻¹)	8 μL
Actine-Alexa488 (stock à 0,1 mg.mL ⁻¹)	4 μL
Tampon de polymérisation 50X	4 μL

L'échantillon est alors prélevé délicatement et déposé sur une lamelle de microscope dans une chambre de perfusion.

Montage d'imagerie de l'anisotropie sous microscope au Q_A .

Une représentation schématique du montage développé pour l'imagerie de l'anisotropie avec le nouveau détecteur Q_A est donnée sur la figure 37. Le détecteur est présenté sur la photographie de la figure 38.

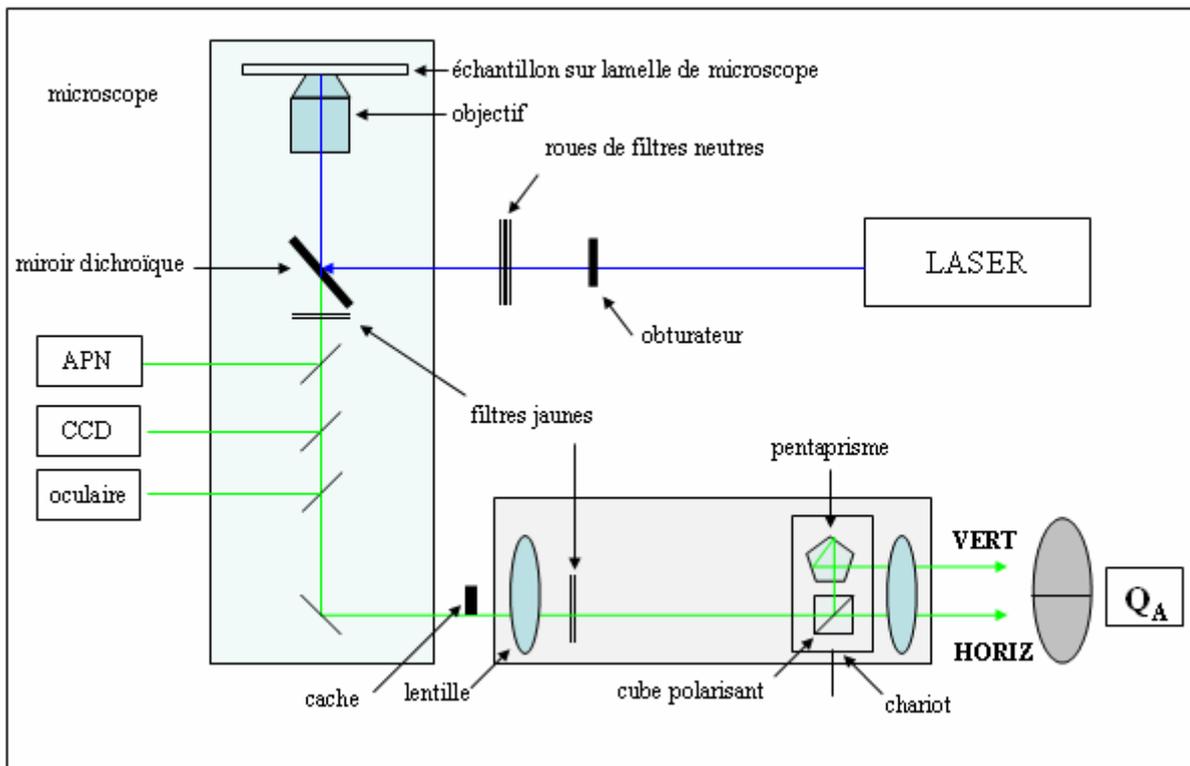


Figure 37 : Dispositif de mesure de l'anisotropie au Q_A

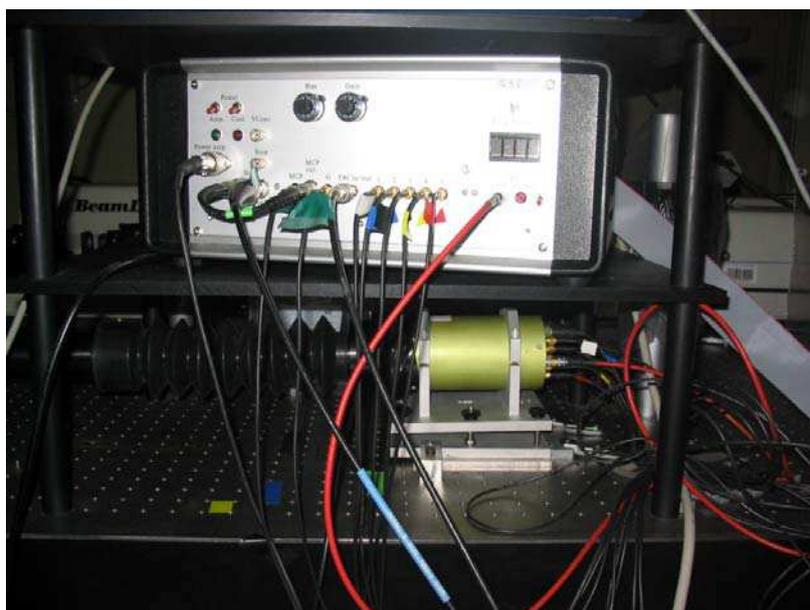


Figure 38 : Photographie du détecteur Q_A

Le faisceau laser (cf. MM1) est introduit par l'arrière du microscope au moyen d'une lentille qui permet d'obtenir un éclairage de tout le champ après avoir traversé un obturateur commandable à distance et une double roue de filtres neutres qui permettent d'assurer une atténuation entre 0,1 et 8 DO. Le faisceau est ensuite orienté en direction de la platine du microscope par une réflexion sur un miroir dichroïque et traverse l'un des objectifs du microscope. Une partie de la fluorescence émise par l'échantillon retransverse le même objectif puis le miroir dichroïque. Un premier filtre jaune de fréquence de coupure 510 nm permet de filtrer des réflexions parasites du laser. Différents trajets sont alors possibles dans le microscope. La fluorescence peut être amenée vers l'oculaire ou encore vers une caméra CCD afin de faire la mise au point. Elle peut aussi être dirigée vers un appareil photo reflex-numérique (APN) ou enfin être envoyée en direction du détecteur Q_A . Sur le trajet, la moitié du faisceau est coupée par un cache de manière à ne garder qu'une moitié de l'image dont on va séparer ensuite les polarisations. Le faisceau traverse alors un système afocal constitué de deux lentilles qui a pour but d'étendre la surface du faisceau pour l'amener à la surface du détecteur dont le diamètre est d'un pouce (2,54 cm). Il traverse alors le dispositif amovible de séparation des polarisations avant d'atteindre la photocathode du détecteur.

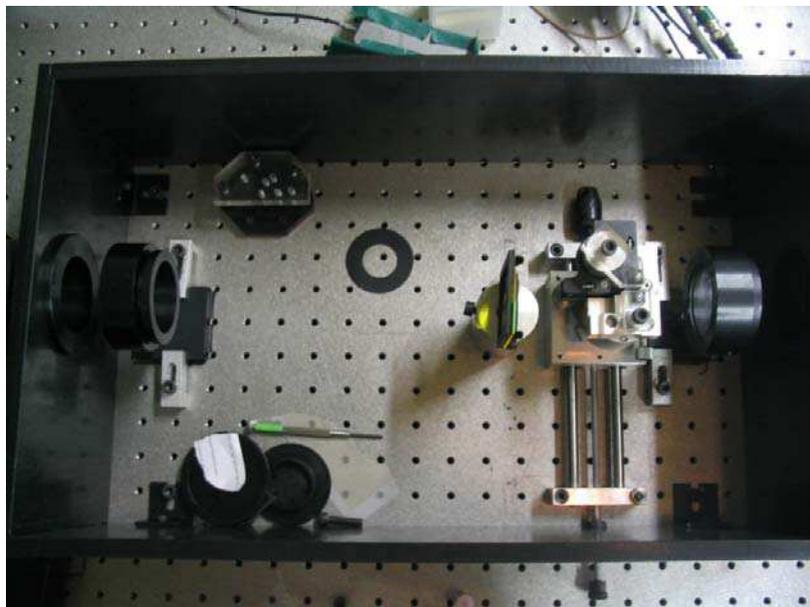


Figure 39 : Dispositif de séparation des polarisations. Le dispositif amovible constitué du prisme de Glan et du pentaprisme est présenté sur la droite. On remarque également la présence des deux lentilles du système afocal ainsi que des filtres jaunes.

Traitement des données

Tout le traitement des images ainsi que les différents calculs qui en découlent sont réalisés sous un environnement IGOR Pro 5 de chez WaveMetrics (Portland, OR, USA) au moyen de sous-programmes développés en permanence dans l'équipe.

Superposition des images

Les deux images correspondant aux deux polarisations devraient être absolument symétriques et ne différer que par la polarisation. Or, il s'avère qu'en raison d'imperfections optiques, il y a parfois un léger décalage ou une légère déformation. Nous utilisons pour superposer les deux images une fonction d'Igor (ImageRegistration) qui détermine l'isométrie géométrique qui permet de faire le lien entre les deux images au moyen d'une modification de l'algorithme de Levenberg-Marquardt (Thévenaz et Unser 1998). Cet algorithme est sensible aux détails marqués de l'image et on utilise ainsi la petite imperfection de la lame qui nous sert à masquer la moitié de l'image comme d'un repère pour initier l'optimisation.

Détermination de la fonction d'appareil

Sous microscope, les faisceaux d'excitation et d'émission sont parallèles. La fonction d'appareil G ne peut donc pas être déterminée facilement par le raisonnement de symétrie employé dans le cas de la mesure en cuve (chap 1). Théoriquement, Marc Tramier et ses collaborateurs ont montré que l'on pouvait s'abstenir de calculer cette fonction d'appareil, mais la détermination de l'anisotropie nécessite alors la mesure des quatre intensités (soit deux images en changeant la polarisation du laser à l'entrée du microscope) (Tramier *et al.* 2000).

Pour éviter cependant d'avoir à faire deux images de chaque échantillon, nous déterminons une carte de la fonction d'appareil G à partir d'un échantillon dont on connaît par ailleurs l'anisotropie stationnaire (A qui peut être nulle ou non). Ainsi, avec la polarisation fondamentale du laser doublé qui est horizontale, on détermine la fonction G par la relation suivante :

$$G = \frac{1 + 2A I_{//}}{1 - A I_{\perp}} \quad (15)$$

où $I_{//}$ et I_{\perp} sont les images des polarisations parallèles et perpendiculaires superposées par la fonction ImageRegistration.

Références :

Méallet-Renault, R., Yoshikawa, H., Tamaki, Y., Asahi, T., Pansu, R. B. et Masuhara, H. (2000). "Confocal microscopic study on fluorescence quenching of single latex beads in poly(vinyl alcohol) film." *Polymer for Advanced Technologies* **11**(8-12): 772-777.

Thévenaz, P. et Unser, M. (1998). "A Pyramid Approach to Subpixel

Registration Based on Intensity." *IEEE Transactions on image processing* **7**: 27-41.

Tramier, M., Kemnitz, K., Durieux, C., Coppey, J., Denjean, P., Pansu, R. B. et Coppey-Moisan, M. (2000). "Restrained torsional dynamics of nuclear DNA in living proliferative mammalian cells." *Biophys J* **78**(5): 2614-27.

Le travail présenté dans le chapitre 2 a fait l'objet de trois communications orales :

Fluorescence lifetime and anisotropy imaging microscopy. Application to actin polymerization study. The 3rd joint seminar of Masuhara laboratory and Yoon laboratory. Osaka, Japon. 24 Février 2006.

Fluorescence lifetime and anisotropy imaging microscopy. Application to actin polymerization study & Overview of research in Pansu-sensei's team. Séminaire invité du laboratoire du Professeur Ushiki. TUAT, Tokyo, Japon. 27 Mars 2006.

Imagerie du calcium intracellulaire par FLIM. Journées de Printemps de Photochimie. Paris, France. 19 mai 2006

et de plusieurs présentations par affiches parmi lesquelles :

Fluorescence life time and anisotropy imaging microscopy. Application to actin polymerisation studies. J.-A. Spitz, R. Yasukuni, M. Takano, C. Baratti-Elbaz, R. Méallet-Renault, J.-J. Vachon, R. Pansu C. Auclair. XXIst IUPAC Symposium on Photochemistry, Kyoto, Japon, Avril 2006.

Fluorescence life time and anisotropy imaging microscopy. Application to actin polymerisation studies. J.-A. Spitz *et al.* 9th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Lisbonne, Portugal, Septembre 2005.

Intensity and fluorescence lifetime imaging of organic crystals, S. Badré, J.-A. Spitz *et al.* 9th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Lisbonne, Portugal, Septembre 2005

Il doit être soumis pour publication dans la revue *Review of Scientific Instrument*. Le manuscrit est présenté ci-après.

NEW FLUORESCENCE INTENSITY, LIFETIME AND ANISOTROPY IMAGING SET-UP.

Jean-Alexis Spitz, Ryohei Yasukuni, Minako Takano, Jean-Jacques Vachon, Rachel Méallet-Renault and Robert B. Pansu

Laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires, CNRS UMR 8531, ENS de Cachan, 61 avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, France.

ABSTRACT

A single photon counting system for FLIM and fluorescence anisotropy imaging is described and characterized in this paper. The two polarizations of the fluorescence are divided by a Glan prism and acquired at the same time by the Q_A detector. Fluorescence decay profile can be reconstructed for any desired area up to each pixel and used to calculate time resolved fluorescence anisotropy decays.

I – INTRODUCTION

Biological and physical sciences have an increasing interest in fluorescence spectroscopy imaging. Fluorescence emission can give access to different parameters such as intensity but also lifetime and anisotropy. Indeed, the spectroscopy of fluorescence is a powerful tool to probe viscosity, structural change, functional information and more generally speaking to probe local environment ¹.

Ions indicators where the fluorescence lifetime depends on the chelation state have been found and are used to measure calcium concentration ². FLIM is also used to measure protein contact and deformation through FRET ³. Indeed, the presence of an absorbing dye within a few nanometers of the fluorescent protein induces a reduction of the fluorescence lifetime.⁴ The early application of the principle has been the building of Cameleon, a

construction that use intramolecular FRET to measure Ca⁵. Anisotropy is a much more general purpose parameter. It measures the randomization of direction of the transition dipole of the emitter. Most of the time this randomization is due to the rotational dynamics of the fluorescent label but it can be also the energy transfer in a FRET process⁶. Quite often a change in the movement of the fluorescent label can be predicted or expected when a biological event occurs. It can be used to measure protein dimerization through FRET between identical labels (Homo FRET).

There are three main FLIM techniques: phase fluorimetry, time gated set-ups and single photon counting systems. The firsts are widely used thanks to the development of CCD cameras. The latter remains more unconventional though it seems more respectful to the sample since it is more sensitive. Indeed, instead of sampling the detection which significantly reduces the sensibility, each emitted photon is taken into account.

Time resolved fluorescence anisotropy imaging has been described. Jovin *et al.* developed a technology in which the phase delay and intensity ratios between the polarized components of the fluorescence signal are recorded, leading to estimations of rotational correlation times and limiting anisotropies. This set-up was successfully applied to rotational dynamics studies in solution and emFRET in bacteria expressing EGFP⁷ but in their experiments, the two different polarizations are acquired successively. French *et al.* are able to image the rotational motility of a fluorophore thanks to a time gated fluorescence lifetime imaging system⁸.

In our set-up, the whole decay profile of the two polarizations is acquired simultaneously with a single photon counting system. Thus, there is no sampling of the fluorescence decay and the two polarizations are acquired at the same time, with the same sample, at the same position, with the same experimental conditions preventing us from artefacts such as instrument drift, evolution of the sample or photobleaching.

II – SET-UP DESIGN

The experimental device is shown on Fig. 1. The excitation source is an argon-ion laser pumped mode-locked Ti/sapphire laser (Tsunami by Spectra-Physics). Its output is repetition-lowered by a pulse-picker and frequency doubled in a BBO crystal to produce a 1.2 ps excitation source operating at a 4 MHz repetition rate, and which can be tuned from 430 to 500 nm. The laser beam enters the Nikon 2000 TE inverted microscope, being reflected toward the sample by the dichroic beamsplitter. The laser is focused on the back focal point of the objective and goes through the sample as a parallel beam, thus providing a wide-field excitation of the sample.

The fluorescence generated in the sample is guided to a time-resolved single-photon-counting photo-multiplier (Q_A) from Europhoton GmbH (Berlin <http://www.europhoton.de/>). On the way, half of the image is cut by a mask. The other half reaches a 45° removable Glan prism which divides the fluorescence into the horizontal (transmitted) and vertical (reflected) polarization components. The vertical polarization is then flipped and redirected by a pentaprism (Fig. 2). At the end of the line, the sensible surface of the detector gets a composite image comprising two spatially identical and symmetrical images of the sample that differ in their polarization content.

Q_A is a multi-channel plate photo-multiplier (PM) working in the single photon counting mode. The anode is composed of five conductive parts. When a photoelectron is produced, an avalanche is created in the two multichannel plates and spread over the five anodes. The position of the photon on the photocathode can be calculated from a weighted mean of the five charges collected on the anodes. For each photon detected, five values are measured and saved on a hard disk: the delay between the laser pulse and the arrival of the photon on the PM, the absolute arrival time (i.e. the time from the beginning of the

measurement), the X and Y position of the photon on the photocathode and the total avalanche amplitude. The histogram of the number of photons collected per pixel gives the intensity image of the sample. The histogram of the number of photons collected as a function of absolute arrival time gives the evolution of the global fluorescence intensity and is a way to monitor photobleaching. The histogram of the total number of photons as a function of the delay between the laser pulse and the fluorescence gives the global fluorescence decay of the sample. Same kind of histograms can also be constructed for selected areas of the image, giving thus the specific fluorescence decay of the selected area. For each pixel we do also calculate the sum of all the delays between the laser pulse and the collected photons. Divided by the number of photons arrived on that pixel this gives the average fluorescence lifetime as a FLIM image. This is a fast and robust way to make FLIM images.

The time resolved anisotropy function, $r(t)$, is then calculated (without deconvolution of the instrument response function) from the Perrin equation :

$$r(t) = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + 2GI_{\perp}} \quad (1)$$

where G is the apparatus function (Cf. supra) and I_{\perp} and $I_{//}$ are the perpendicular and parallel components of the fluorescence polarization.

III- SET-UP CHARACTERIZATION

We present here the different aspects of the set-up characterization. First we shall focus on the fluorescence lifetime and intensity measurements. Then we will characterize the space resolution of this new detector and finally we will discuss the measurement and imaging of fluorescence anisotropy.

A – Time measurement

1) Lifetime measurement correction.

The crude FLIM image of a homogeneous sample (Rhodamine 6G ⁹, 10⁻⁴ M in water) is shown on Fig. 3a. It shows a lifetime between 3 ns (black pixel) and 3.6 ns (white pixel), with more white pixels in the middle of the image. This homogeneous sample should show a sharp distribution in fluorescence lifetime. Thus, when the center of the image seems to have a longer lifetime, the periphery shows a shorter one. The artificial delays, that are observed, are due to electronics. Indeed for each avalanche, the propagation time of the induced current pulse through the multichannel plate to reach the discriminator depends on the location of the avalanche. To correct those constant time transit variations, we use a time transit correction map. To build up this map, we use a rhodamine sample in water which is a sample with a homogeneous life time on the whole sample and can be thus used as a reference. We calculate the difference between the time measured on each pixel and the average value, which is the expected lifetime; this difference will then be automatically subtracted to all future FLIM images.

2) Dispersion of the average fluorescence time.

If we look at Fig. 3c, we see a uniform value for the measure of fluorescence lifetime, but a remaining dispersion (Fig. 4). We shall show that this residual dispersion is due to photon statistics.

The precision of average fluorescence time measurements depends upon the number of photons collected by each pixel of the image. In the case of a monoexponential decay (e.g. rhodamine), the distribution $P(t)$ of the photon arrival time is $k \cdot \exp(-kt)$ where $1/k$ is the fluorescence lifetime. The expected value of the mean arrival time of N photons is $1/k$ and the variance of these arrivals times is $1/k^2$. The variance of the mean arrival time of N photons will be $1/(k^2 N)$. This variance will tend to zero as N tends to infinity. Thus, we have sorted the pixels according to the number of photons they have counted for and we have built the average fluorescence time distribution. We get a family of Gaussians whose widths give the

lifetime dispersion as a function of the number of photons (Fig. 5). The width scales linearly with $1/\sqrt{N}$ and extrapolates to 39 ps. This shows that the dispersion of fluorescence time is due to photon statistics and the extrapolated value to infinite photon count give the quality of the correction by the transit time map.

3) Temporal resolution

The temporal resolution of the set-up is limited by our detector. To determine it, we use a 1.2 ps pulse and measure the time response of our detector (Fig. 6). The middle height width of the recorded pulse is around 310 ps which is the shortest event we can efficiently measure and gives us an idea of our temporal resolution. Global fluorescence decays can also be corrected from the transit time deviation. After this correction, the full width at half maximum of the pulse reaches the value of 150 ps. It can be reduced to 130 ps if only the center of the detector is used. This time resolution agrees with the one expected from the diameter of the holes in the MCPs.

4) Time shift from the microscope objectives

The use of 4 different objectives leads to another little time shift from one objective to another because, though objectives are designed to work with same work distance, the lenses sizes are different. That's why the way through the x40 is shorter than the other (- 75 ps) whereas the x100 induces an extra time of 65 ps. Again, those shifts are automatically corrected to set all pulses at the same point.

B – Intensity measurements

1) Gain correction

Some areas of our detector can present different gains. The lighting of the sample may also affect the intensity image; some areas might be more lighted than others. One more time, a software correction is necessary to supplement these sensibility variations (Fig. 7). The gain factor map is calculated from a rhodamine in aqueous sample.

N.B. : On the right part of the uncorrected image (Fig. 7a), we can notice small dark spots which are areas of the detector less sensible than the average.

N.B. 2: The overload on the periphery of the image is not due to reflections on the inner walls of our set-up neither to accumulation of miscalculated photons thanks to the help of the fifth surrounding anode (Fig. 8).

2) Dead time

Once a photon reaches the anode, it has to be processed by the set-up. During this dead-time, any other photon will not be taken into account. This dead-time is determined by sorting the acquired photons according to their delay relative to the previous photon (Fig. 9). Thus, we measure a dead time of 2.15 μ s.

3) Saturation

The histogram (data not shown) of the amplitude of avalanches is independent of count rate. Thus the saturation of the count rate is not due to a saturation of the MPC channel. The saturation due to the 2.15 μ s dead time of the charge amplifiers should be 465 kHz. The measured saturation rate of 72 kHz (Fig. 10) might be due to the data transfer later in the process.

C - Spatial resolution

The determination of the spatial resolution of the device was carried out by imaging isolated fluorescent nanolatex. These latexes, from Molecular Probes (F-8787), have a diameter of 20 nm, which is below the resolution. The size of the smallest spots gives us the spatial resolution. The latexes are spin-coated on a microscope slide after dissolution (0.2% in mass) in a 1% PolyVinyl Alcohol aqueous solution according to the protocol described by R. Méallet-Renault *et al.*¹⁰. (1) 5 s 300 rpm, 2) 1 min 1600 rpm) Thanks to a piezoelectric plate, a series of images are recorded at different heights above and under the focus plan. (Fig. 11)

The smallest fluorescent marks, corresponding to isolated nanolatex particle, are fitted by a series of 2-dimension Gaussians whose widths are plotted in function of the altitude on Fig. 12. The lowest point of the resultant curve corresponds to the focus plan and the size of the spot (200 nm) is the spatial resolution of the imager. The Gaussian half-width of 200 nm corresponds to an Airy radius of 400 nm. The pixel size is smaller than the resolution limit and does not limit the overall spatial resolution of the set-up.

NB: The dissymmetry of the curve Fig. 12-b is due to the imperfectly corrected spherical aberration of our set-up.

D - Anisotropy

1) Delay due to the set-up

The two different polarizations of the emitted fluorescence have different courses through the set-up. Indeed, the vertical component is reflected by the Glan prism and then by the pentaprism. Consequently, the optical path way of this polarization is longer than the other, leading to an extra delay of 160 ps (4,8 cm Fig. 13). Before any calculations on these decays, such as anisotropy calculation, this shift is corrected by computer post-treatment. A typical corrected FLIM image of the two polarizations of rubrene fluorescence is presented on Fig. 14.

3) Effect of the numerical aperture of the objectives

Obj	N.A.	Ao
0	0	0.307
10	0.3	0.281
40	0.6	0.272
60	0.95	0.283
100	1.45	0.234

Table 1: Time zero anisotropy (A_0) of rubrene in squalane with different numerical aperture (NA)

Since we intend to use different scales of sample, we use different microscope objectives (x10, x40, x60 and x100). Those objectives have different numerical aperture (resp.

0.3, 0.6, 0.95 and 1.45). We have studied the effect of the depolarization of the anisotropy with this increasing numerical aperture on the fluorescence on Fig. 15 and Fig. 16 and table 1. The anisotropy measured in cuvette has been added with a Numerical Aperture of 0. The Numerical aperture of 1.45 apart, the relaxation of anisotropy does not significantly change with the numerical aperture of the objective. The same observation is done when using one objective and changing the numerical aperture of the collection beam by placing a diaphragm before the Glan prism. We measure a time zero anisotropy of 0.280 to be compared to the 0.301 value measured in cuvette. The decrease of the measured anisotropy with the numerical aperture has been predicted by Axelrod¹¹ and observed by Schouffet *et al*¹², but it is a small effect that can be neglected as reported by Seigel *et al*⁸.

CONCLUSION

We describe a robust and useful set-up to measure fluorescence anisotropy imaging. The whole decay profile of the two polarizations is acquired simultaneously with a single photon counting system. Thus, there is no sampling of the fluorescence and the two polarizations are acquired at the same time, with the same sample, at the same position, with the same experimental conditions preventing us from artefacts such as instrument drift, evolution of the sample and photobleaching. Since FLIM can be estimated with a limited number of photons, FLIM images can be recorded with a single-photon counting system in less than one minute. Correction maps are required for gain and transit time. These correction maps appear to be stable for a few months and recalibration of the set-up is easy on a few reference samples. This device appears to be a powerful and sensible tool to do imaging in different fields such as cellular imaging (Fig. 17), chemical sensing, μ TAS, biochip diagnostic...

References

- 1 G. R. Fleming, *Chemical application of ultrafast spectroscopy*. (Oxford University
press, 1986).
- 2 L. Schouffet, P. Denjean, G. Joliff-Botrel, C. Bernard, D. Pansu, and R. B. Pansu,
Photochem Photobiol **70** (5), 701 (1999).
- 3 T. Förster, Disc.Faraday Soc **27**, 7 (1959).
- 4 D. P. Millar, Curr Opin Struct Biol **6** (5), 637 (1996).
- 5 A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y.
Tsien, Nature **388** (6645), 882 (1997).
- 6 M. Tramier, K. Kemnitz, C. Durieux, J. Coppey, P. Denjean, R. B. Pansu, and M.
Coppey-Moisan, Biophys J **78** (5), 2614 (2000).
- 7 A. H. Clayton, Q. S. Hanley, D. J. Arndt-Jovin, V. Subramaniam, and T. M. Jovin,
Biophys J **83** (3), 1631 (2002).
- 8 J. Siegel, K. Suhling, S. Leveque-Fort, S. E. D. Webb, D. M. Davis, D. Phillips, Y.
Sabharwal, and P. M. W. French, Review of Scientific Instruments **74** (1), 182 (2003).
- 9 D. Magde, R. Wong, and P. G. Seybold, Photochem Photobiol **75** (4), 327 (2002).
- 10 R. Méallet-Renault, H. Yoshikawa, Y. Tamaki, T. Asahi, R. B. Pansu, and H.
Masuhara, Polymer for Advanced Technologies **11** (8-12), 772 (2000).
- 11 D. Axelrod, Biophys J **26** (3), 557 (1979).
- 12 L. Schouffet, P. Denjean, and R. B. Pansu, Journal of Fluorescence **7** (2), 155
(1997).

Figure captions

Fig. 1: Experimental setup.

Fig. 2: Optical pathway in the polarization separator

Fig. 3: Time transit correction. a) Crude image of rhodamine 6G in water sample. b) Time transit correction map. Determined with another sample of the same type. c) Corrected image of the first sample using the time transit correction map.

Fig. 4: Histogram of the collected photons vs. lifetime before and after correction of time transit

Fig. 5: Evolution of the lifetime dispersion with the number of photons per pixel. The pixels of an image of a rhodamine sample were sorted according to their intensity and the lifetime distribution was fitted with a Gaussian whose width is the lifetime dispersion.

Fig. 6: Pulse and corrected pulse.

Fig. 7: Gain correction. a) Crude image of a rhodamine in water sample. b) Gain factor correction map calculated from another sample. c) Corrected image of the first sample using the gain factor correction map.

Fig. 8: Position of the anodes on the detector surface.

Fig. 9: Determination of the dead time.

Fig. 10: Saturation curve.

Fig. 11: Images of spin-coated 20 nm fluorescent nanolatex in PVA film. b is the image in focal plane, a is the image 1.2 μm underneath and c is the image 5 μm over the focal plane.

Fig. 12: a) 2-D Gaussian fit of the fluorescent spot of a 20 nm fluorescent nanolatex. b) Gaussian's width vs. altitude.

Fig. 13: Parallel and perpendicular decays of rubrene fluorescence. Fluorescence decays of rubrene in solution in squalane, before correction of the pathway shift.

Fig. 14: FLIM image of the two polarization components of the fluorescence of rubrene in squalane.

Fig. 15: Fluorescence decays of rubrene in squalane. The decays have been recorded using 4 different microscope objectives and numerical apertures. The decay for parallel polarization (resp. perpendicular) has been calculated from the upper part (resp. bottom part) of the image.

Fig. 16: Time resolved anisotropy of rubrene in squalane with different numerical apertures. The anisotropy has been calculated according to the formula $n^{\circ}1$ from the decays recorded using 4 different microscope objectives.

Fig. 17: Intensity image of a NIH 3T3 cell. Actin cytoskeleton is stained with phalloïdine-Alexa.

Figure 1:

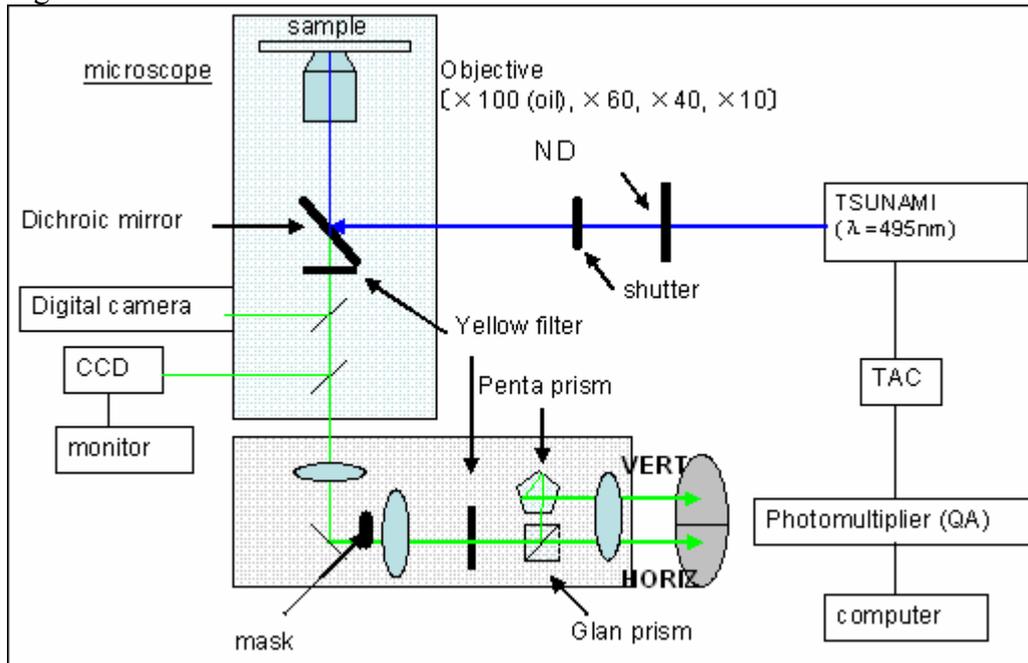


Figure 2:

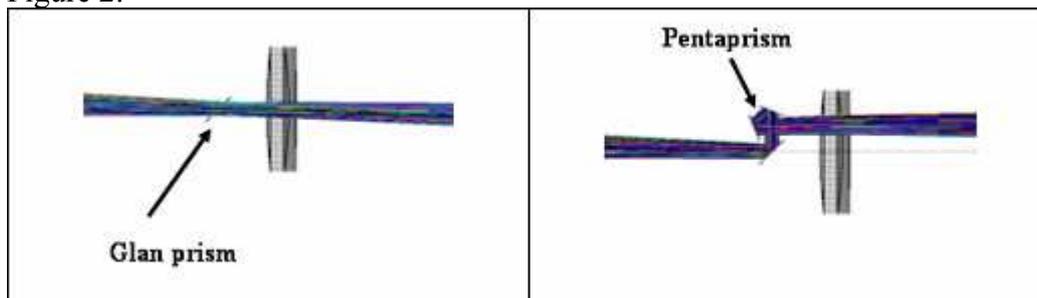


Figure 3:

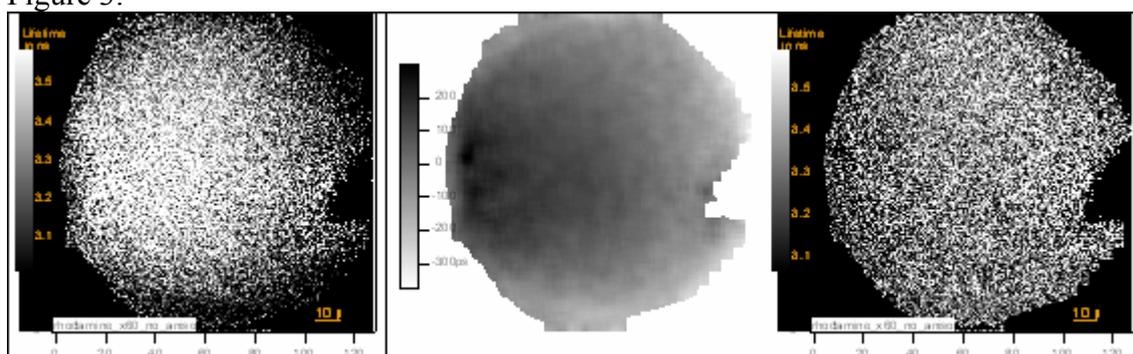


Figure 4:

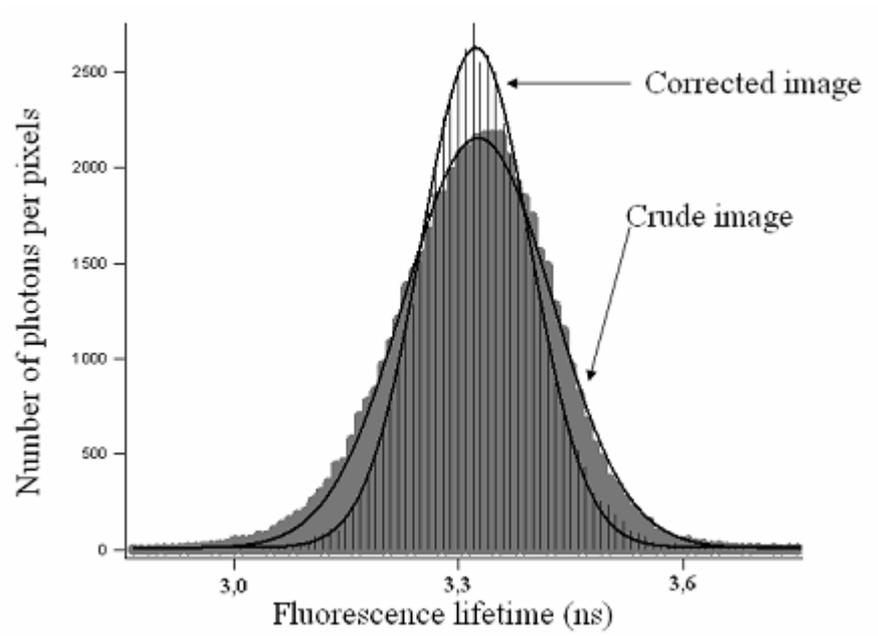


Figure 5:

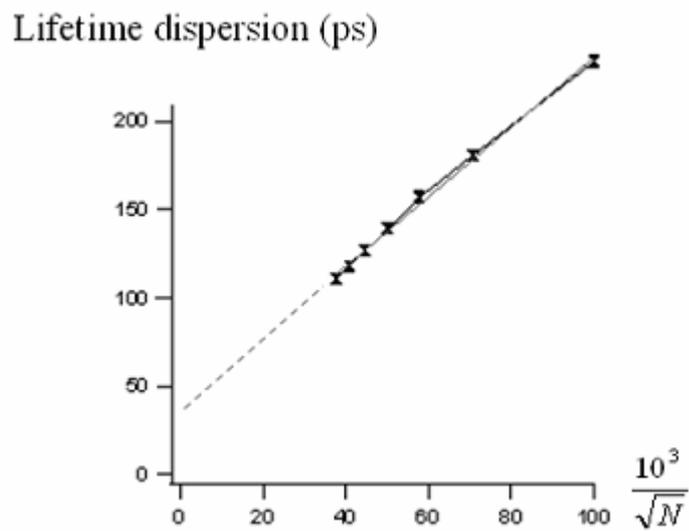


Figure 6:

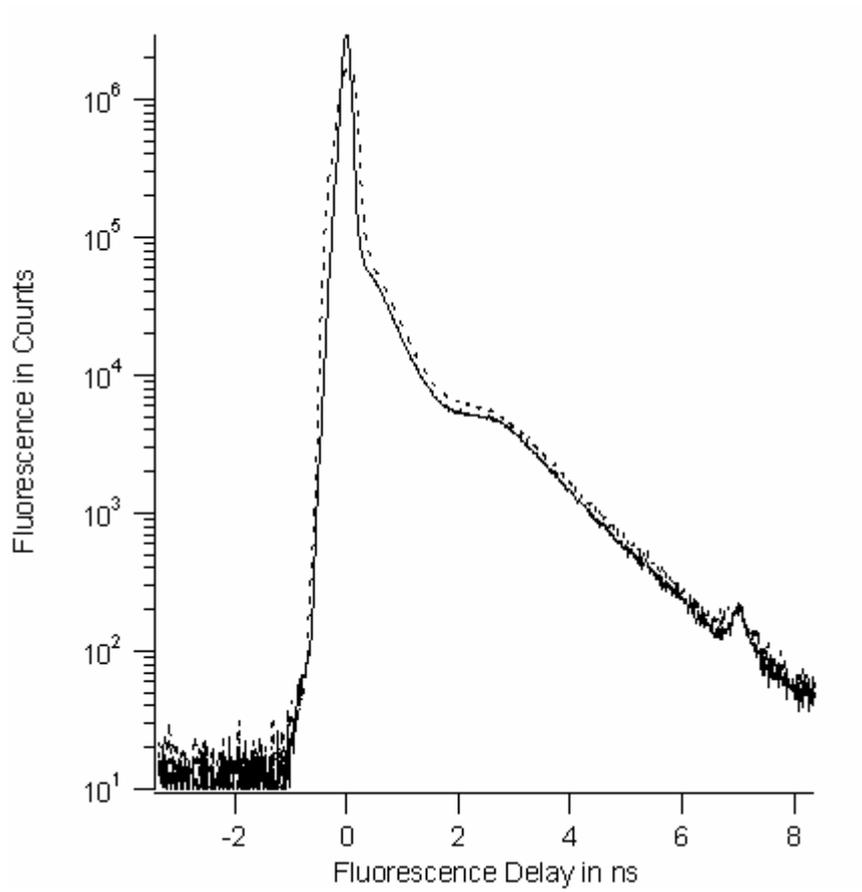


Figure 7:

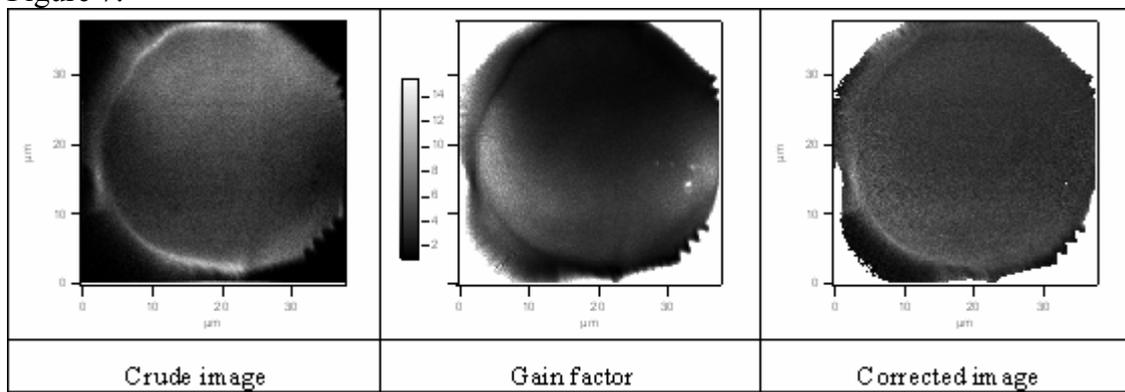


Figure 8:

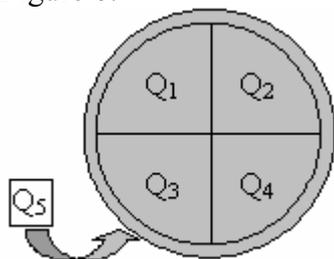


Figure 9:

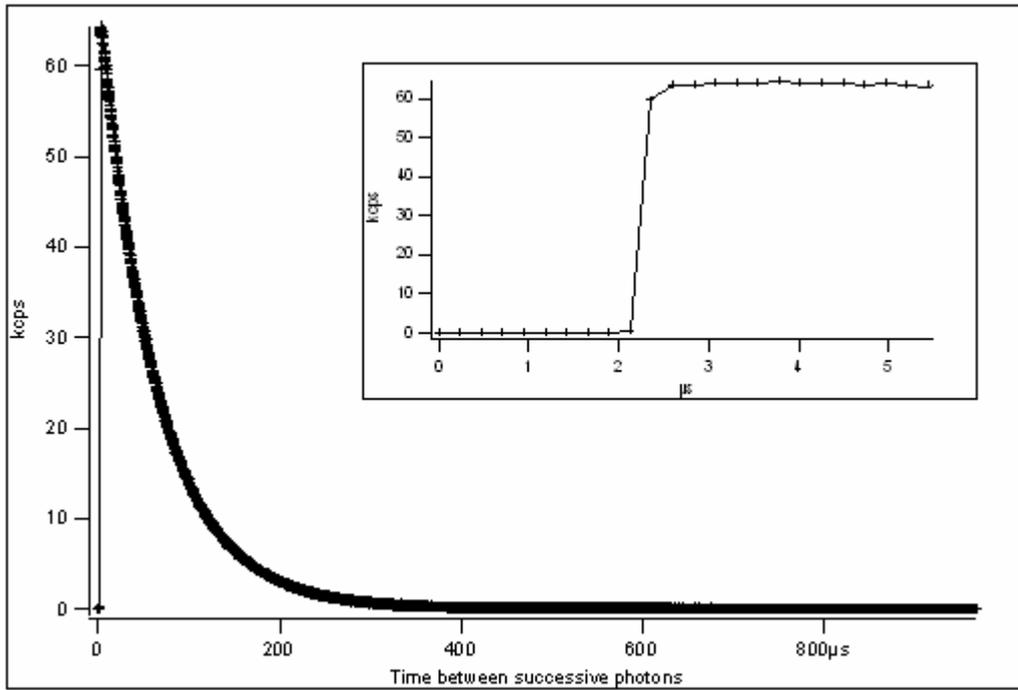


Figure 10:

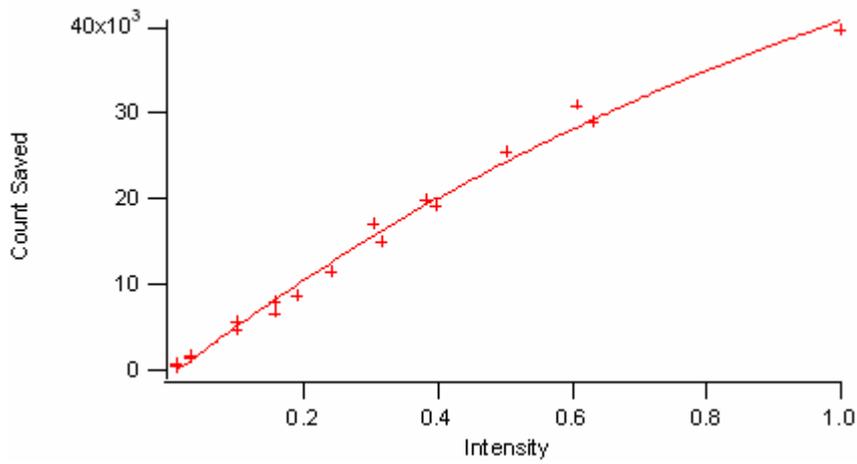


Figure 11:

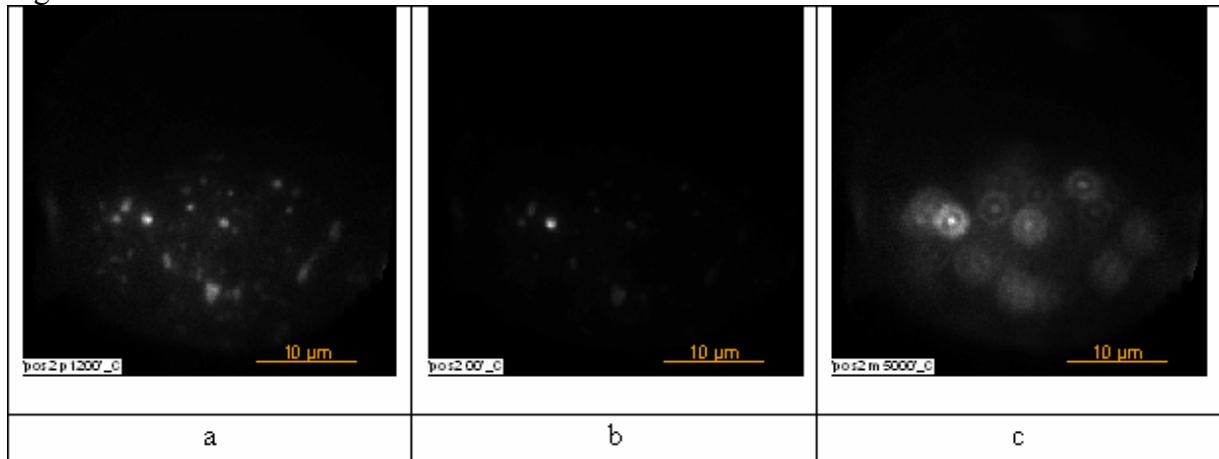


Figure 12:

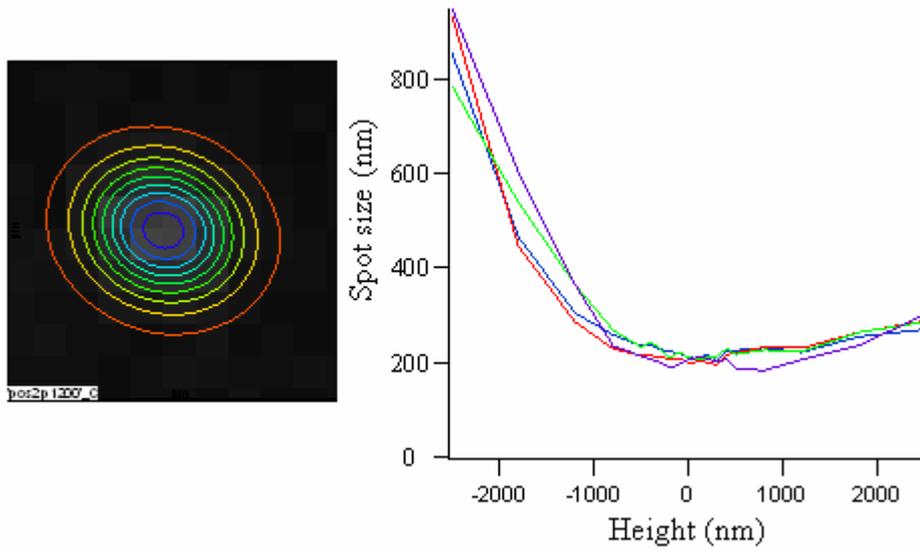


Figure 13:

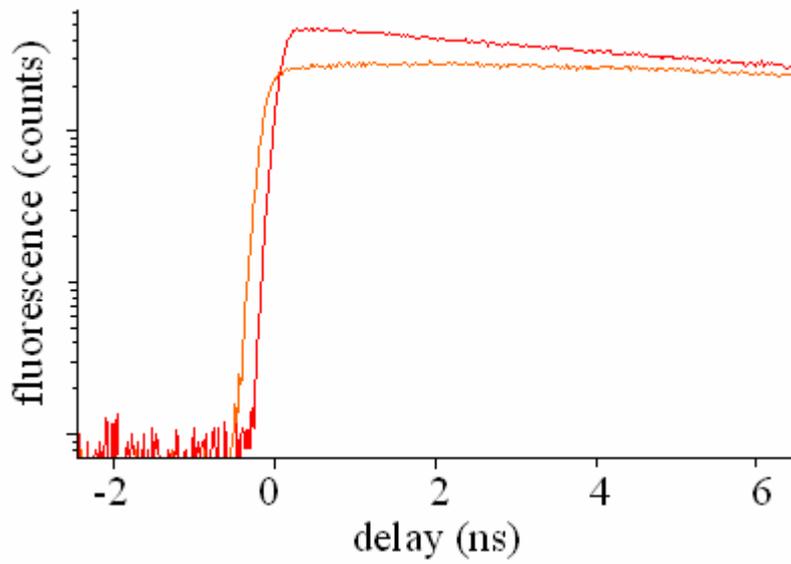


Figure 14:

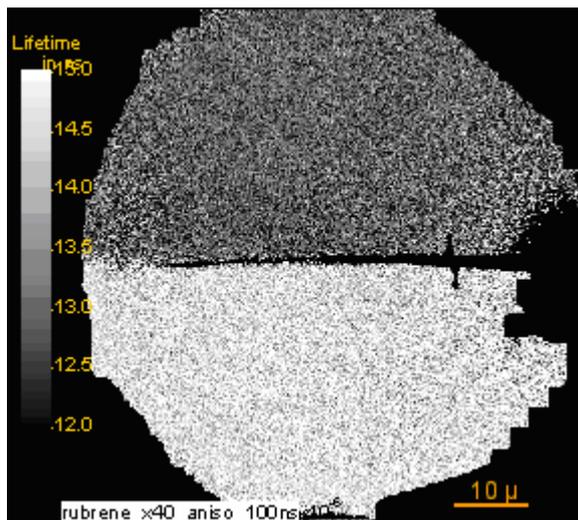


Figure 15:

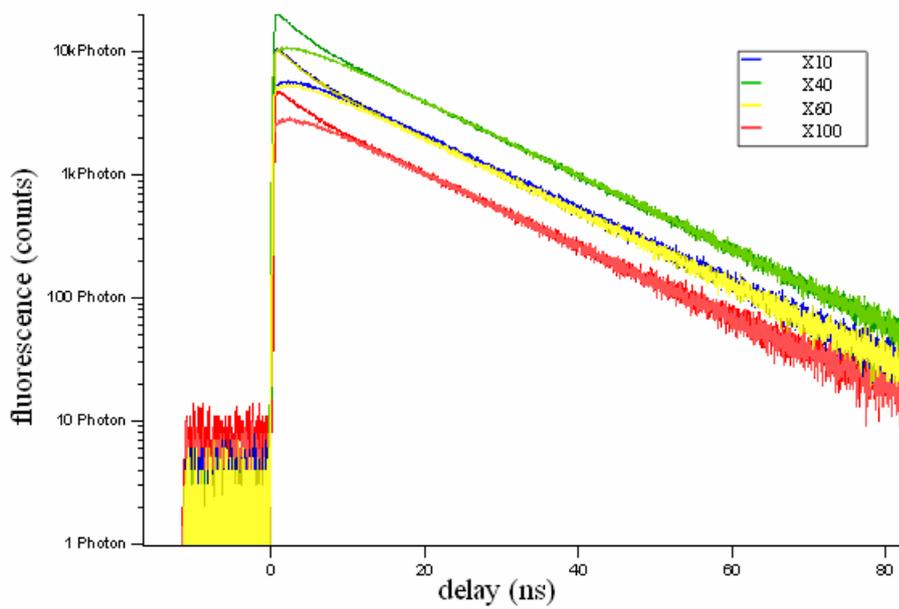


Figure 16:

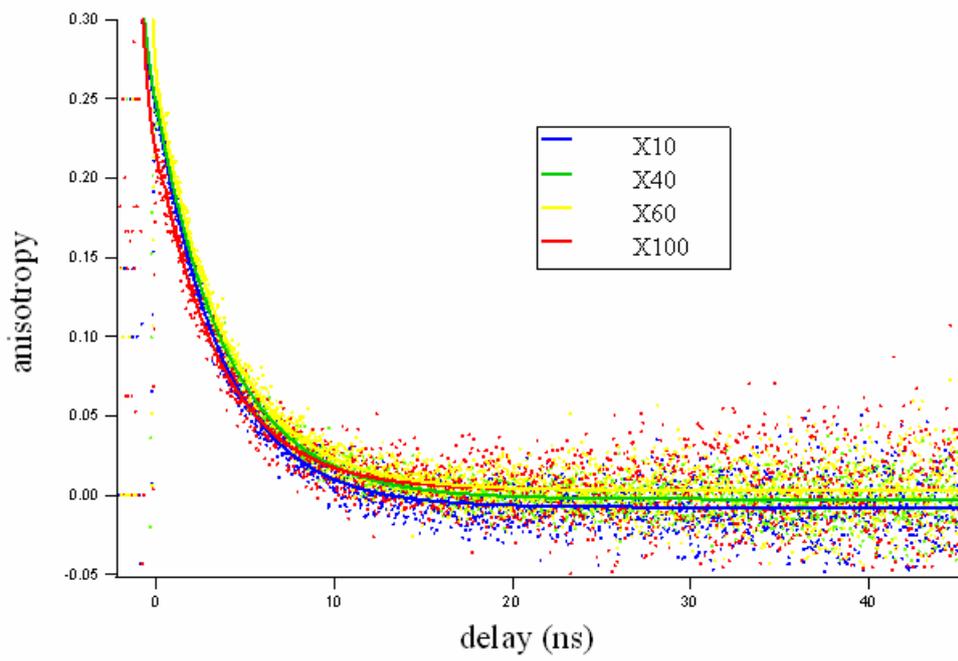
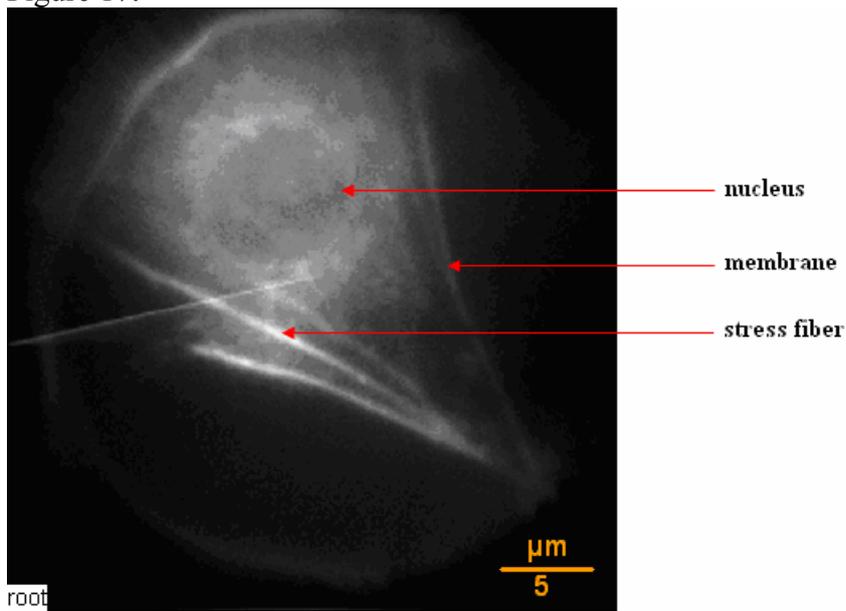


Figure 17:



Annexe II : Principe de fonctionnement des détecteurs à galettes de microcanaux.

Une galette de microcanaux est un arrangement parallèle de multiplicateurs tubulaires élémentaires d'électrons d'un diamètre variant de 10 à 100 μm dans une plaque de verre à forte teneur de plomb (Wiza 1979). Les deux faces sont métallisées afin de pouvoir appliquer une grande différence de potentiel de l'ordre de plusieurs milliers de volts.

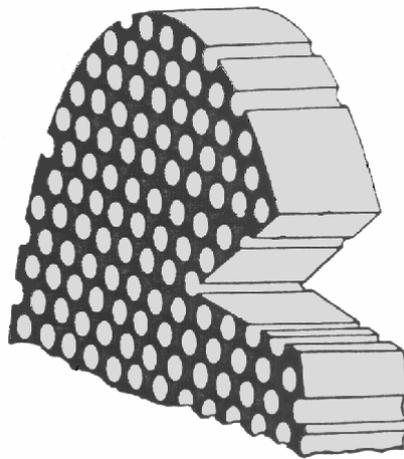


Figure 40 : Galette de microcanaux

Chacun des tubes de cet arrangement fonctionne de la façon schématisée sur la figure suivante. Lorsqu'elle est excitée par un photon, la cathode génère un photoélectron qui est dirigé et accéléré par la haute tension appliquée aux bornes de ce dispositif. Lorsque l'électron heurte les parois du tube qui sont recouvertes d'un film semi-conducteur et qui sont souvent légèrement inclinées par rapport à la direction incidente de la lumière (8°), il y a émission d'électrons secondaires. On parle alors d'amplification dynodale. A l'extrémité du tube, l'anode récolte les quelques 10^6 à 10^8 électrons ainsi produits et qui peuvent alors être envoyés sur un écran à phosphore dont la fluorescence émise sera détectée par une caméra CCD (*charged coupled device*) ou alors directement sur une caméra EBC CCD (*Electron Bombarded Camera CCD*)

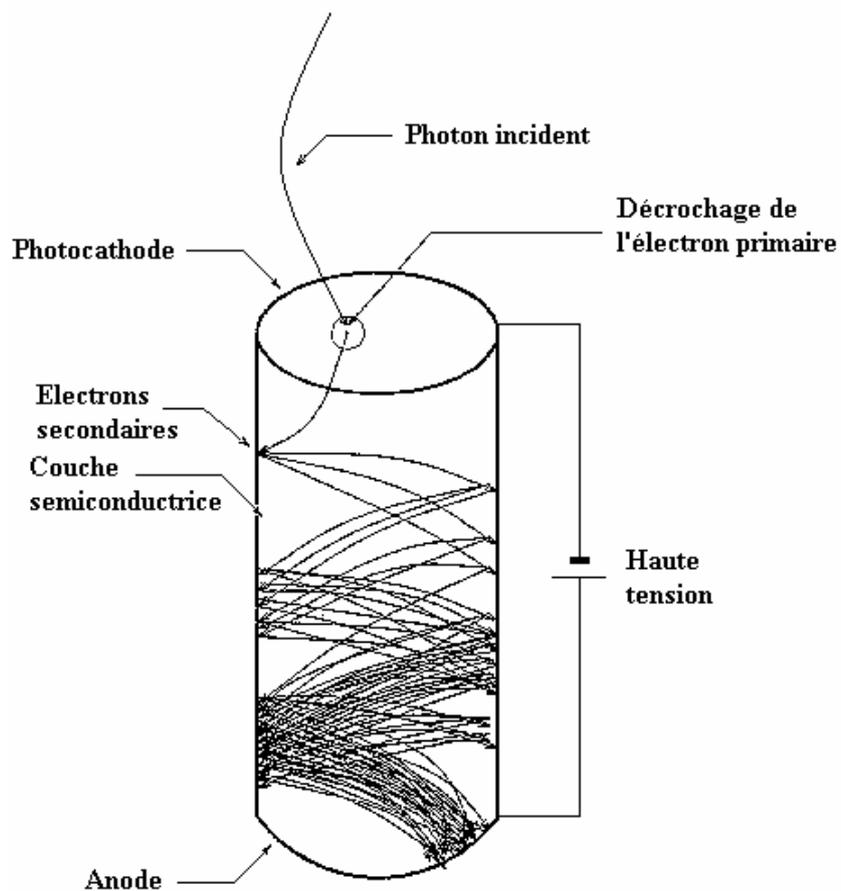


Figure 41 : Schéma d'un tube multiplicateur d'électrons

Référence :

Wiza, J. L. (1979). "Microchannel Plate Detectors." *Nuclear Instruments and methods* **162**: 587-601.

Annexe III : Principe de fonctionnement d'une camera CCD

Les caméras à circuit de charge couplée, dites caméras CCD, ont été largement développées depuis les années soixante-dix (Boyle et Smith 1970). S'il existe différents types d'architectures possibles, le principe de base est le même et s'articule autour de condensateurs MOS, composés d'une structure en trois étages (Métal, Oxyde et Semi-conducteur) à savoir un substrat semi-conducteur P ou N recouvert d'un isolant et d'une couche de métallisation appelée grille (Cerf 2000).

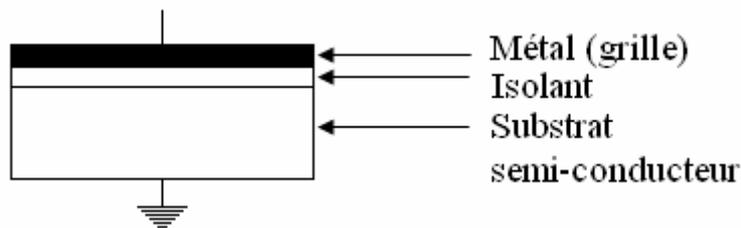


Figure 42 : Condensateur MOS

La grille comme l'isolant sont transparents et laissent donc passer les photons qui accèdent au semi-conducteur où ils génèrent, par effet photoélectrique, un couple électron/trou. Les électrons sont alors attirés en direction de la grille chargée positivement mais ne peuvent pas l'atteindre à cause de l'isolant. Parallèlement, les trous sont attirés vers le bas du condensateur. Il y a donc séparation de charges, charges d'autant plus importantes que le condensateur aura été soumis à un nombre important de photons. Ces charges sont alors stockées puis transférées selon les systèmes (transfert de trame, transfert interligne) puis numérisées afin de pouvoir reconstruire l'image à l'aide d'un logiciel informatique.

Références :

Boyle, W. S. et Smith, G. E. (1970). "Charge Coupled Semiconductor Devices." Bell Sys. Tech. J. **49**: 587-593.

Cerf, F. (2000). Les composants optoélectroniques. Paris, HERMES Science Publications.

Chapitre 3 : Imagerie de la polymérisation de l'actine *in vivo* après coupure par laser femtoseconde.

I – Application des lasers aux cellules	- 124 -
1- Historique	- 124 -
2- Applications actuelles des lasers femtosecondes	- 125 -
3- Effet des ondes de choc sur des cellules	- 126 -
II – Utilisation de protéines fluorescentes	- 128 -
1- La GFP, origine, structure, variantes	- 128 -
2- Utilisation	- 130 -
III – Résultats	- 132 -
1- Reformation d'une fibre de stress	- 132 -
2- Reformation d'un réseau à deux dimensions	- 134 -
3- Restructuration du cytosquelette après une onde de choc	- 135 -
Références	- 138 -

Table des illustrations

Figure 1 : Isolation d'une cellule vivante par ablation puis ondes de choc générées par un laser femtoseconde.....	- 127 -
Figure 2 : Structure de la GFP.....	- 128 -
Figure 3 : Chromophore de la GFP	- 129 -
Figure 4 : Schéma de formation du chromophore de la GFP.....	- 129 -
Figure 5 : Fibroblaste (NIH-3T3) transfecté par une actine-EGFP.....	- 131 -
Figure 6 : Reformation d'une fibre de stress après coupure par laser femtoseconde.....	- 133 -
Figure 7 : Reformation d'un réseau à deux dimensions après coupure laser.....	- 135 -
Figure 8 : Restructuration du cytosquelette d'actine après une onde de choc.	- 136 -

Comme nous venons de commencer à l'aborder dans les perspectives du chapitre précédent, l'imagerie dynamique du cytosquelette d'actine *in vivo* nécessite la conjonction entre un bon système d'imagerie et un bon échantillon, c'est-à-dire un échantillon dans lequel la polymérisation se fait à un endroit déterminé. Nous avons vu plus haut que certaines parties des cellules, tel que le lamellipode, étaient le lieu de polymérisation importante. Cependant, l'organisation et la polymérisation de l'actine dans ces structures diffèrent de celles des fibres de stress et n'en est donc pas forcément représentative. C'est pourquoi nous proposons, dans ce chapitre, un système original d'étude *in vivo* de la polymérisation de l'actine après coupure d'un filament par un laser femtoseconde.

I – Application des lasers aux cellules

Si la principale application des lasers femtosecondes dans le domaine de la biologie cellulaire est l'imagerie de fluorescence, dont il a déjà été largement question dans le chapitre précédent, d'autres effets de ces lasers, destructeurs cette fois-ci, peuvent être utilisés dans un nouveau domaine en plein développement, celui de la nanochirurgie.

1- Historique

La focalisation d'une source lumineuse sur une cellule a été utilisée depuis près d'un siècle. Le premier exemple est décrit par Tschachotin en 1912 lorsque celui-ci a inactivé des cellules en focalisant l'irradiation d'une source ultraviolette à magnésium au travers d'un objectif de microscope (Tschachotin 1912). Cette technique a par la suite été particulièrement développée par Bessis et Novarski au niveau de la résolution spatiale qui permettait de choisir des organites cellulaires visés (Bessis et Nomarski 1960).

Cependant, le temps d'irradiation était toujours long, souvent de l'ordre de grandeur de la minute. Cette contrainte a été minimisée avec l'utilisation nouvelle des lasers qui permettaient de concentrer l'énergie lumineuse (Moreno *et al.* 1969). Ainsi, l'utilisation de laser à rubis a rendu possible l'inactivation de mitochondries à l'intérieur de cellules épithéliales afin de mieux comprendre la fonction de ces organites cellulaires (Amy et Storb 1965; Storb *et al.* 1966).

Par la suite, la dissection directe de chromosomes a été possible à l'aide d'un laser à argon ionisé (Berns *et al.* 1969; Berns et Floyd 1971). Cette expérience a été une première étape avant la dissection de chromosomes dans des cellules vivantes en métaphase afin d'étudier la distribution des chromosomes au cours de la division cellulaire (Liang *et al.* 1993).

Les impulsions lasers ont également permis de développer la technique dite d'optoporation dans laquelle des pores sont ouverts dans les membranes cellulaires pour permettre le passage de gènes ou de molécules (Kurata *et al.* 1986; Tao *et al.* 1987).

Parallèlement ou conjointement à ces techniques essentiellement ablatives des lasers, une autre application possible dans le contexte cellulaire est celle dite des pinces optiques qui a principalement été développée par Arthur Ashkin (Ashkin et Dziedzic 1987; Ashkin *et al.* 1987; Ashkin et Dziedzic 1989). Dans une pince optique, des objets microscopiques comme par exemple des cellules, des bactéries ou des virus, peuvent être retenus par les forces de pression de radiation engendrées par le faisceau laser. Une fois piégés, ils peuvent subir différents traitements ou analyses.

2- Applications actuelles des lasers femtosecondes

Dorénavant, le développement des lasers femtosecondes permet de nombreuses applications extrêmement délicates dans un nombre croissant de domaines (Vogel *et al.* 2005). Citons à titre d'exemple quelques applications remarquables d'études utilisant ces techniques de nanochirurgie.

La focalisation d'un laser femtoseconde sur une molécule d'ADN peut entraîner des dommages semblables à ceux causés par le rayonnement solaire et peut ainsi permettre l'étude cellulaire de la réparation de l'ADN (Meldrum *et al.* 2003). Des techniques d'ablation sont également employées pour l'étude du développement embryonnaire chez la drosophile (Supatto *et al.* 2005) ou encore pour l'étude de propriétés mécaniques des arrangements des chromosomes au moment de la mitose (Grill *et al.* 2003). Enfin, l'ablation sélective de mitochondries dans des cellules vivantes tend à confirmer que ces structures seraient bien isolées du reste de la cellule et ne formeraient pas un réseau continu comme l'envisageaient

certaines autres études (Shen *et al.* 2005) alors que l'ablation axonale chez *Caenorhabditis elegans* a permis de mettre en évidence la croissance neuronale (Yanik *et al.* 2004).

Un autre champ d'étude qui utilise ces potentialités d'ablation locales par des lasers femtosecondes et qui nous intéresse particulièrement dans le cadre de ce mémoire est celui de l'étude du cytosquelette. Quelques équipes s'intéressent à l'ablation de différents constituants du cytosquelette afin d'en déterminer des propriétés dynamiques ou mécaniques. En effet, en focalisant un laser, il est possible de couper individuellement certains éléments du cytosquelette comme des microtubules (Colombelli *et al.* 2005) ou des filaments d'actine (Shen, Datta *et al.* 2005). A partir de ces expériences, il est possible d'estimer quelques paramètres dynamiques liés à l'instabilité causée par la coupure tels que des vitesses de dépolymérisation. A partir de la quantité d'énergie relâchée lors de la rétractation mécanique des filaments d'actine, il est également possible d'avoir une idée des tensions exercées sur la cellule par ces différents constituants du cytosquelette.

Dans le cas des microtubules, les phénomènes de reformation de ces polymères ont déjà été abordés mais cela n'avait pas été encore le cas pour l'actine.

3- Effet des ondes de choc sur des cellules

Il est également possible d'utiliser, dans un contexte cellulaire, les ondes de choc créées par les lasers femtosecondes. Dans ce cas, l'irradiation n'est pas directement dirigée sur la cellule en culture mais à proximité, sur une zone où il n'y a pas de cellule. Contrairement à l'ablation directe qui met en jeu des phénomènes de photodécomposition (Srinivasan 1986) ainsi que la formation de plasmas de dimensions nanométriques qui provoquent l'ionisation de la matière (Vogel, Noak *et al.* 2005), les ondes de choc engendrées par les impulsions laser sont à l'origine de phénomènes moins facilement caractérisés tels que la cavitation ou la formation de bulles dans le milieu irradié. Dans certaines conditions déterminées dans le laboratoire du Professeur Masuhara (Hosokawa *et al.* 2004), ces ondes de choc peuvent servir à l'isolation de cellules vivantes qui sont décollées de leur support de culture selon le protocole illustré par le schéma de la figure 1. Dans un premier temps, les filopodes de la cellule sont sectionnés par ablation directe. La cellule prend alors une forme arrondie mais elle est encore accrochée à son support. C'est l'onde de choc initiée à proximité qui finit de la décrocher. Nous verrons plus loin que ce processus d'isolation s'accompagne

nécessairement d'un réarrangement du cytosquelette d'actine. Cependant, dans des conditions optimisées, ce processus permet de maintenir vivantes plus de 80 % des cellules.

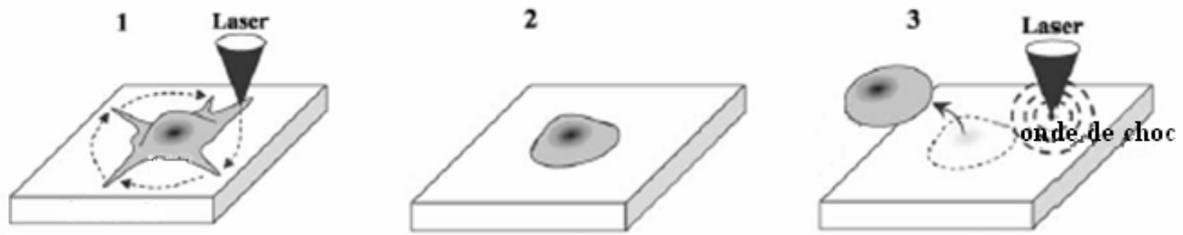


Figure 1 : Isolation d'une cellule vivante par ablation puis ondes de choc générées par un laser femtoseconde. Figure d'après Hosokawa *et al.*

II – Utilisation de protéines fluorescentes

Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, l'imagerie cellulaire nécessite souvent le marquage fluorescent des protéines ou organites cellulaires d'intérêt. Nous avons déjà présenté différentes techniques de marquage à l'aide de chromophores fluorescents synthétiques, une autre solution consiste à faire exprimer directement par la cellule une protéine fluorescente, comme par exemple une protéine de fusion entre la protéine d'intérêt et une variante de la GFP.

1- La GFP, origine, structure, variantes

Certains organismes, dont plusieurs représentants de la famille des cnidaires comme la méduse *Aequoria victoria* ou la pensée de mer *Renilla reniformis*, ont la propriété de synthétiser des protéines qui sont naturellement fluorescentes. La protéine issue de la méduse *A. victoria* a été isolée et purifiée pour la première fois en 1962 (Shimomura *et al.* 1962) et porte depuis le nom de *Green Fluorescent Protein* (GFP). Elle a depuis été séquencée (Prasher *et al.* 1992) et sa structure cristallisée a été résolue (Yang *et al.* 1996). C'est une protéine de 328 acides aminés pour un poids moléculaire de 27 kDa (27 kg.mol^{-1}) dont la structure est assez compacte et globulaire comme le montre la figure 2.

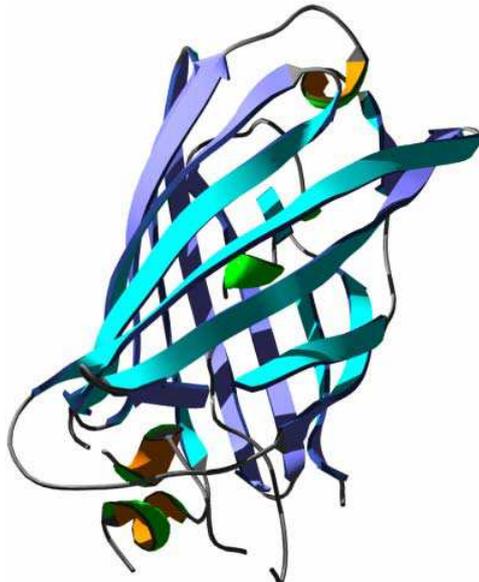


Figure 2 : Structure de la GFP d'après Yang *et al.*

La fluorescence de cette protéine est essentiellement due à l'enchaînement de trois acides aminés de sa structure primaire la sérine⁶⁵, la tyrosine⁶⁶ et la glycine⁶⁷ dont les chaînes

latérales subissent des modifications post-traductionnelles pour donner le chromophore qui est une para-hydroxybenzylidène-imidazolidone (figure 3).

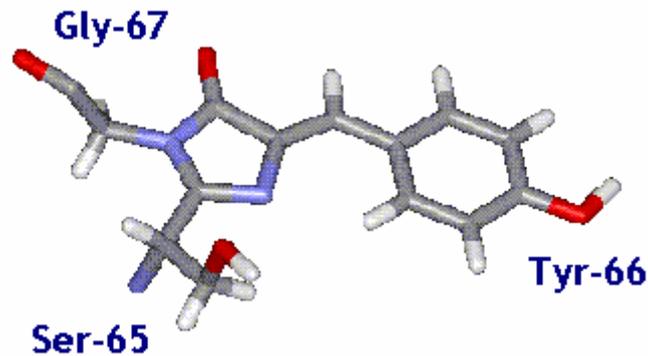


Figure 3 : Chromophore de la GFP

Ce chromophore est obtenu par un processus séquentiel auto-catalytique qui se déroule en deux étapes (Reid et Flynn 1997). Dans une première étape rapide, on observe la cyclisation entre la Ser⁶⁵ et la Gly⁶⁷ pour donner un intermédiaire imidazolin-5-one. La Tyr⁶⁶ est alors oxydée par le dioxygène afin d'étendre le système aromatique du cycle formé. Ce mécanisme est résumé sur la figure 4.

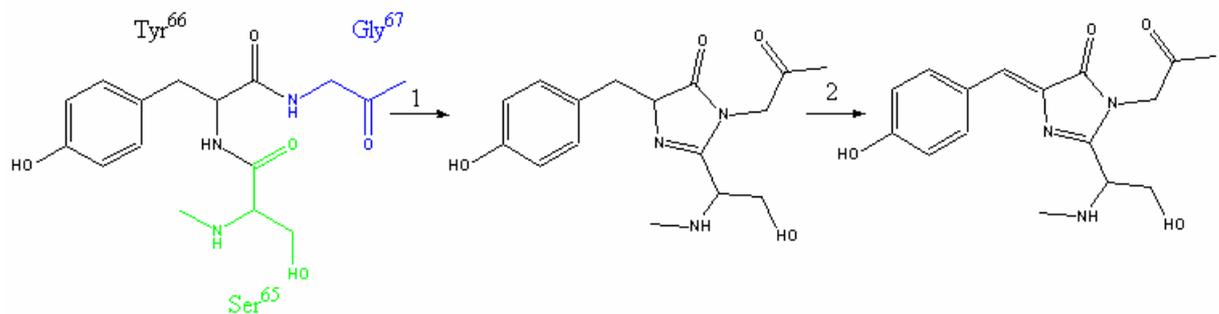


Figure 4 : Schéma de formation du chromophore de la GFP.

1 : Cyclisation et déshydratation. 2 : Oxydation

Dans sa forme sauvage, la GFP présente deux pics d'absorption. Le principal se situe à 395 nm et le second à 475 nm. L'émission de la fluorescence se fait à 508 nm (Morise *et al.* 1974). De nombreux mutants de cette protéine ont par ailleurs été obtenus par mutagenèse. Certaines mutations comme la double mutation de la Phénylalanine⁶⁴ en Leucine et de la Sérine⁶⁵ en Thréonine ont pour effet un déplacement de l'absorption vers le rouge (488 nm) sans déplacement de la bande d'émission (Cormack *et al.* 1996). Ce mutant, dénommé EGFP (Enhanced GFP), présente l'avantage de pouvoir être excité par les sources

lumineuses classiquement utilisées en imagerie de fluorescence et possède une émission de fluorescence 35 fois plus importante quand il est excité à 488 nm.

D'autres mutations, qu'elles soient le fruit du génie génétique ou de l'évolution chez d'autres espèces découvertes plus récemment et qui expriment également des protéines semblables à la GFP (Matz *et al.* 1999), s'accompagnent de changement dans les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence, offrant ainsi une large palette de protéines fluorescentes (Chudakov *et al.* 2005). Il existe ainsi en plus des protéines fluorescentes vertes, des protéines fluorescentes jaunes (YFP) (Griesbeck *et al.* 2001), bleues (CyanFP, CFP) (Rizzo *et al.* 2004) et rouge-orangé (Shaner *et al.* 2004).

2- Utilisation

Une fois que le gène est cloné dans un plasmide, il peut être transfecté dans un grand nombre de types cellulaires, en particulier chez les mammifères, dans lesquels il est alors exprimé (Chalfie *et al.* 1994). Dans une cellule de mammifère, son expression est assez large à la fois dans le noyau et le cytoplasme (Cubitt *et al.* 1995). Mais le principal avantage de cette protéine est qu'elle peut être fusionnée à d'autres protéines à la fois par son extrémité N ou C terminale sans modifier les propriétés de ces protéines. Elle peut alors servir pour de nombreuses applications en biologie cellulaire (Misteli et Spector 1997), en particulier le marquage spécifique pour différentes parties ou fonctions de la cellule comme les mitochondries (Rizzuto *et al.* 1996), la membrane plasmique (Marshall *et al.* 1995), des voies de sécrétions (Kaether et Gerdes 1995) mais surtout, pour ce qui nous intéresse le plus dans ce manuscrit, le cytosquelette (Choidas *et al.* 1998).

Transfectée par un plasmide codant pour une protéine de fusion entre l'actine et la GFP ou l'un de ses mutants, la cellule coexprime l'actine sauvage et l'actine-GFP qui sont alors à même de copolymériser. La localisation des protéines marquées est tout à fait satisfaisante comme on peut le constater sur l'image de la figure 5 sur laquelle on reconnaît bien les localisations attendues de l'actine (fibre de stress, actine sous corticale et périnucléaire).

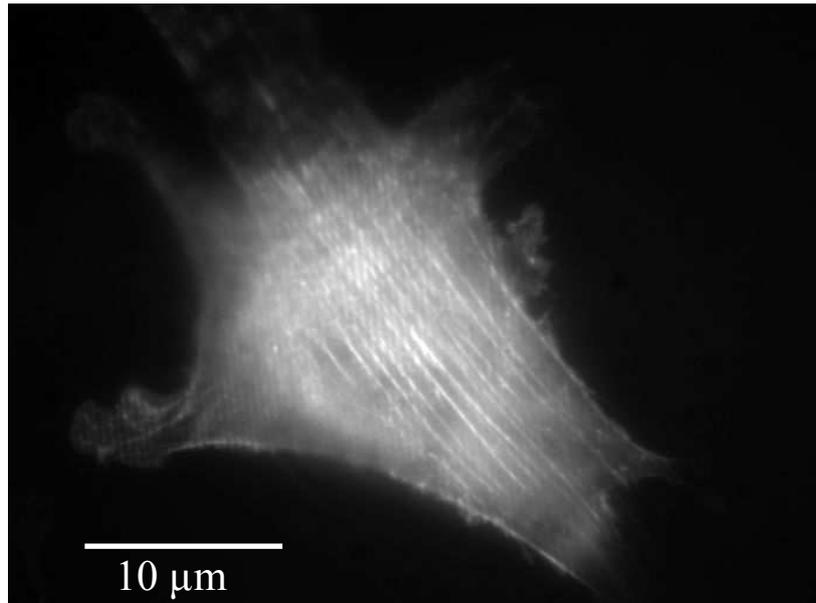


Figure 5 : Fibroblaste (NIH-3T3) transfecté par une actine-EGFP

Malgré la taille relativement importante de la GFP vis-à-vis de l'actine, de nombreuses revues font état d'études dynamiques avec ces protéines de fusion (Choidas, Jungbluth *et al.* 1998; Yoon *et al.* 2002). Cette dynamique, que ce soit au niveau des lamellipodes, des filopodes ou des fibres de stress ne semble pas trop perturbée par la présence de la GFP (Waddle *et al.* 1996; Westphal *et al.* 1997; Condeelis *et al.* 2001).

Bien que la transfection soit annoncée par de nombreux auteurs comme étant stable, il semble cependant que les divisions cellulaires soient un peu plus difficiles en présence de l'actine-GFP, c'est pourquoi nous choisissons de ne pas maintenir en culture les cellules transfectées mais de procéder aux transfections avant chaque campagne d'expériences.

On remarquera enfin en passant que malgré tous les avantages cités ici sur l'utilisation de l'actine-GFP, cette utilisation nous aurait été impossible dans l'approche abordée au chapitre précédent. En effet, dans le cas de l'actine GFP, le marqueur fluorescent n'est plus un petit chromophore synthétique accroché à la protéine par un marqueur suffisamment flexible pour lui permettre une certaine libration, il s'agit maintenant d'un chromophore au sein d'une protéine d'une taille comparable à celle de l'actine et qui ne présente pas la relaxation relativement rapide observée dans le cas de l'actine-Alexa488. La relaxation mesurée pour l'anisotropie de fluorescence des GFP de l'ordre de 15 ns (Borst *et al.* 2005), ce qui correspond à la rotation lente de la protéine.

III – Résultats

Dans le système étudié dans le laboratoire du Professeur Masuhara, à l'Université d'Osaka, des impulsions laser femtosecondes sont appliquées directement ou à proximité de cellules fibroblastiques murines (NIH-3T3) transfectées par un plasmide codant pour l'actine-EGFP. L'étude biomécanique de la contraction du filament d'actine directement après la coupure laser, et qui est due à la fois à la libération de l'énergie élastique emmagasinée par la fibre de stress et à la dépolymérisation de l'actine (Kumar *et al.* 2006), est l'objet du travail de Ryohei Yasukuni. Nous ne décrivons ici que les étapes suivantes de reformation des fibres de stress coupées et de réorganisation du cytosquelette.

1- Reformation d'une fibre de stress

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à des fibres de stress isolées qui traversaient la cellule. Après la phase de contraction habituellement observée, on voit dans certains cas une recroissance du filament par l'une, l'autre ou bien les deux extrémités. Dans le cas présenté sur la figure 6, celle-ci se fait des deux cotés. On constate que petit à petit les deux extrémités formées lors de la coupure se rapprochent l'une de l'autre. La vitesse de polymérisation est de $0,4 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ ce qui correspond bien aux vitesses de polymérisation de l'actine observées par d'autres équipes (Bernheim-Groswasser *et al.* 2005).

Si l'on regarde à une échelle plus importante (zoom de la figure 6-c), on constate que le câble observé est en fait la réunion de plusieurs filaments plus fins qui croissent à des vitesses sensiblement différentes et qui finissent par s'entremêler au niveau de la jonction. Il est cependant difficile de décrire précisément et à partir de ces simples observations les processus qui sont mis en jeu lors de cette jonction. Cependant, après que le contact soit fait, et bien que l'on poursuive l'observation pendant une durée importante, il ne semble plus rien se passer.

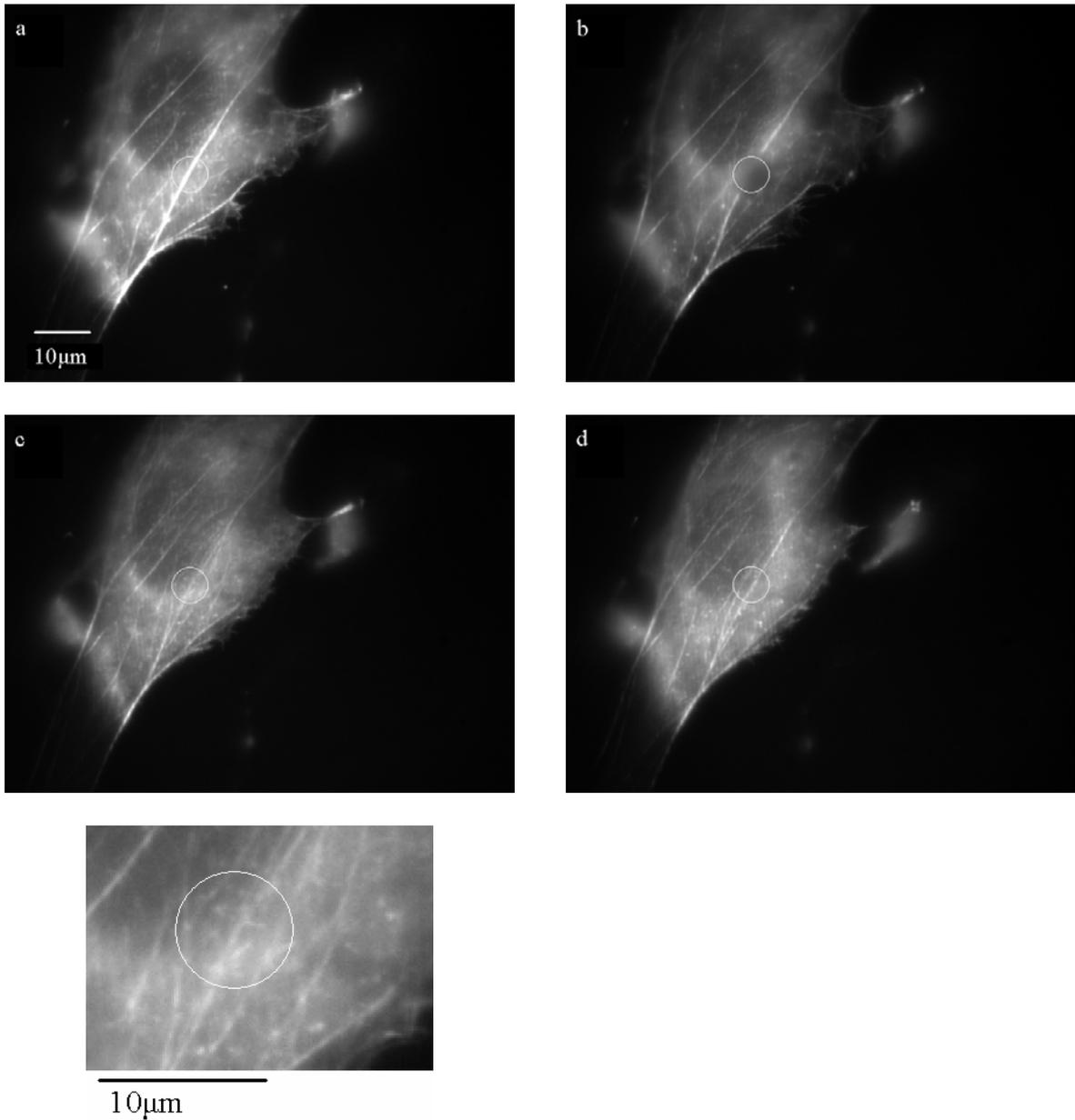


Figure 6 : Reformation d'une fibre de stress après coupure par laser femtoseconde.
 a) Microphotographie de fluorescence de la cellule avant la coupure. b) Même cellule, juste après la coupure. c) Même cellule, après 18 minutes avec détail à un plus fort grossissement.
 d) Même cellule après 40 minutes.

Malgré le caractère assez invasif de l'ablation laser, il semble que la cellule, dont on savait qu'elle pouvait continuer à vivre, arrive également à reconstituer de façon raisonnable les filaments lésés.

2- Reformation d'un réseau à deux dimensions

Dans l'exemple suivant présenté sur la figure 7, la situation est relativement semblable à la situation précédente mais la coupure est cette fois-ci faite sur un filament branché. Après deux minutes de contraction puis dépolymérisation, l'une des extrémités formées lors de la coupure a atteint le niveau du branchement sur un autre câble de stress. A la fin de ce processus de raccourcissement, la polymérisation débute au niveau de l'extrémité encore existante et ce à une vitesse semblable à celle observée précédemment. Le filament progresse alors en direction de l'autre jusqu'à le rejoindre. Dans l'exemple présenté sur la figure 7, le point de rencontre du filament formé avec le filament qui n'a pas été coupé diffère d'environ un micromètre de la position d'origine du branchement. Cependant, dans d'autres exemples, cette position semble invariante. Une fois que les deux filaments se sont rejoins, il ne semble plus rien se passer. En effet, même en prolongeant l'observation, le filament en croissance ne traverse pas l'autre, ce qui aurait pu se passer si les deux filaments n'avaient pas été dans le même plan. Il semble donc que le branchement se fasse.

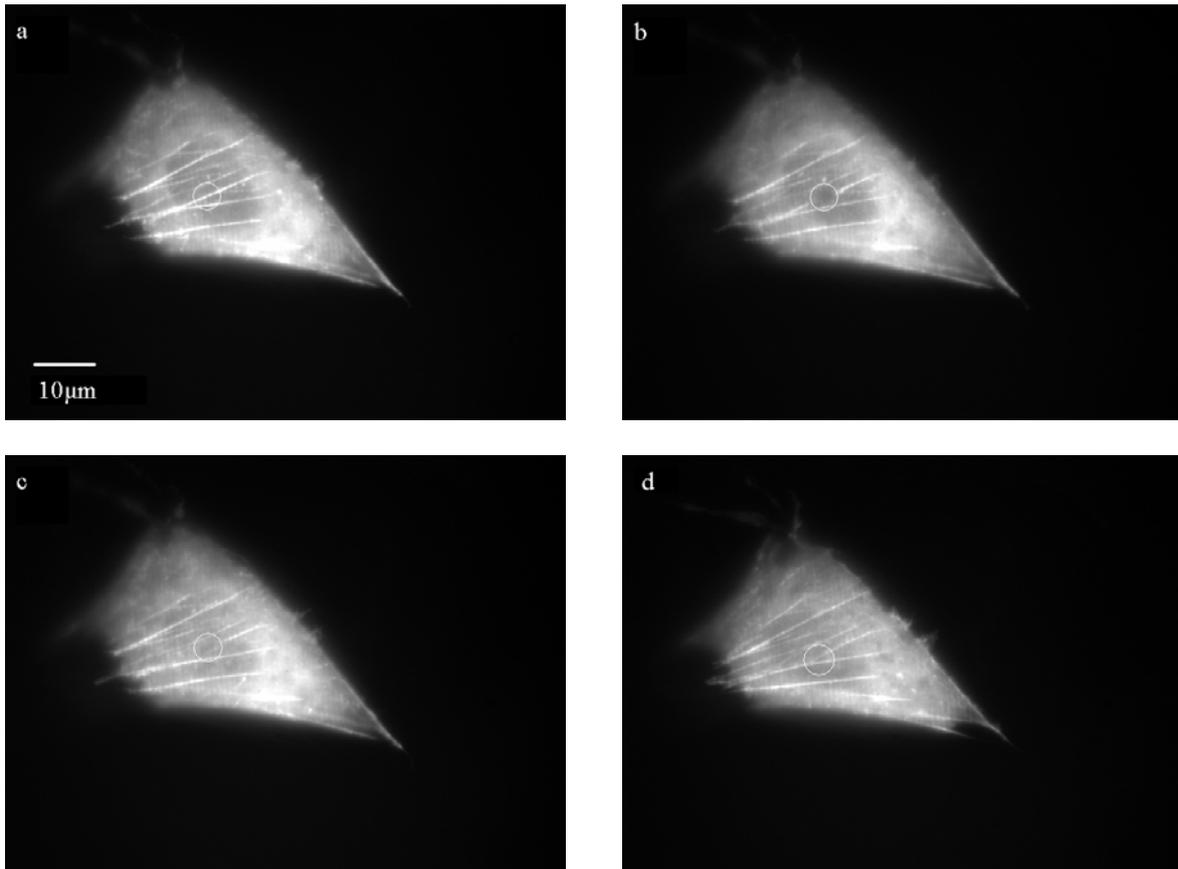


Figure 7 : Reformation d'un réseau à deux dimensions après coupure laser.
a) Microphotographie de fluorescence avant la coupure. b) Juste après la coupure.
c) Après 2 minutes. d) Après 24 minutes.

Ce branchement pourrait faire intervenir le complexe Arp2/3 dans un arrangement tel que le décrivent Pollard et ses collaborateurs (Blanchoin *et al.* 2000) dans un système *in vitro*. On commence ici à voir l'avantage d'un tel système d'imagerie *in vivo* qui permette d'initier, par une perturbation très localisée, en l'occurrence une ablation laser, des phénomènes qu'il est sinon difficile d'observer en direct.

3- Restructuration du cytosquelette après une onde de choc

On a vu plus haut qu'il était possible de décrocher une cellule dont les filopodes avaient été préalablement coupés par ablation directe. Même si les mécanismes directs de l'action de l'onde de choc sur la cellule sont difficiles à étudier, on constate cependant que ce décrochage s'accompagne d'une certaine déstructuration du cytosquelette comme on le voit sur la première image de la figure 8. L'onde de choc a été initiée en haut à droite du champ

d'observation. La cellule est légèrement décollée et ses prolongations ne présentent plus les fibres de stress qui sont présentes partout ailleurs. Afin de ne pas perdre la cellule du champ d'observation, les filopodes n'ont pas été coupés.

On peut alors étudier comment la cellule va réadhérer à son support. On voit bien sur les trois clichés suivants comment la cellule se redéploie tout en rétablissant un réseau de câbles de stress parallèles qui la sous-tendent.

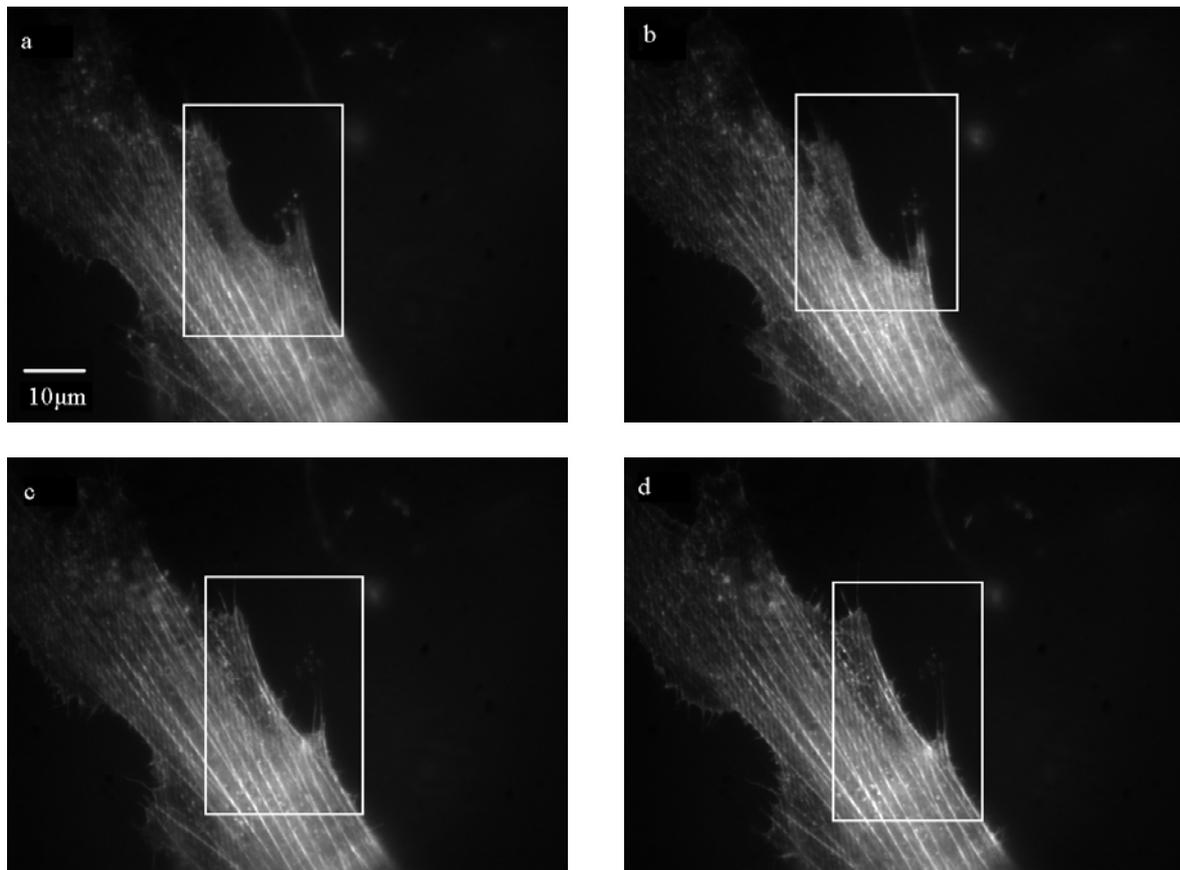


Figure 8 : Restructuration du cytosquelette d'actine après une onde de choc.
a) Microphotographie de fluorescence juste après l'onde de choc. b) 6 minutes après.
c) 15 minutes après. d) 21 minutes après.

Une fois de plus, ce système d'imagerie combiné à une perturbation induite localement, cette fois-ci par une onde de choc, permet de suivre un phénomène physiologique en direct, ici l'organisation du cytosquelette au moment de l'adhésion cellulaire.

Au travers de ces quelques expériences préliminaires d'observations du cytosquelette d'actine réalisées après avoir créé une catastrophe parfaitement localisée à l'aide d'un laser femtoseconde, nous proposons donc un système d'imagerie de la dynamique du cytosquelette

d'actine *in vivo*. Ce système qui met en évidence la polymérisation de l'actine en temps réel et dans des cellules vivantes pourrait permettre de mieux comprendre certains phénomènes tels que les branchements des câbles de stress pour former des réseaux secondaires ou plus largement l'organisation du cytosquelette lors de l'adhésion cellulaire. Les applications potentielles d'une telle méthodologie sont extrêmement prometteuses et variées, parmi lesquelles on peut envisager l'étude de l'implication directe de protéines effectrices de la polymérisation dans des cellules où l'on pourrait localement initier une dépolymérisation de l'actine.

Références

- Amy, R. L. et Storb, R. (1965). "Selective mitochondrial damage by a ruby laser microbeam: an electron microscopic study." *Science* **150**(697): 756-8.
- Ashkin, A. et Dziedzic, J. M. (1987). "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria." *Science* **235**(4795): 1517-20.
- Ashkin, A. et Dziedzic, J. M. (1989). "Internal cell manipulation using infrared laser traps." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(20): 7914-8.
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M. et Yamane, T. (1987). "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams." *Nature* **330**(6150): 769-71.
- Bernheim-Groswasser, A., Prost, J. et Sykes, C. (2005). "Mechanism of actin-based motility: a dynamic state diagram." *Biophys J* **89**(2): 1411-9.
- Berns, M. W. et Floyd, A. D. (1971). "Chromosomal microdissection by laser. A cytochemical and functional analysis." *Exp Cell Res* **67**(2): 305-10.
- Berns, M. W., Olson, R. S. et Rounds, D. E. (1969). "In vitro production of chromosomal lesions with an argon laser microbeam." *Nature* **221**(175): 74-5.
- Bessis, M. et Nomarski, G. (1960). "Irradiation Ultra-Violette des Organites Cellulaires avec Observation Continue en Contraste de Phase." *Biophys Biochem Cy (JCB)* **8**(3): 777-792.
- Blanchoin, L., Amann, K. J., Higgs, H. N., Marchand, J. B., Kaiser, D. A. et Pollard, T. D. (2000). "Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins." *Nature* **404**(6781): 1007-11.
- Borst, J. W., Hink, M. A., van Hoek, A. et Visser, A. J. (2005). "Effects of refractive index and viscosity on fluorescence and anisotropy decays of enhanced cyan and yellow fluorescent proteins." *J Fluoresc* **15**(2): 153-60.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. et Prasher, D. C. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* **263**(5148): 802-5.
- Choidas, A., Jungbluth, A., Sechi, A., Murphy, J., Ullrich, A. et Marriott, G. (1998). "The suitability and application of a GFP-actin fusion protein for long-term imaging of the organization and dynamics of the cytoskeleton in mammalian cells." *Eur J Cell Biol* **77**(2): 81-90.
- Chudakov, D. M., Lukyanov, S. et Lukyanov, K. A. (2005). "Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging." *Trends Biotechnol* **23**(12): 605-13.
- Colombelli, J., Reynaud, E. G., Rietdorf, J., Pepperkok, R. et Stelzer, E. H. (2005). "In vivo selective cytoskeleton dynamics quantification in interphase cells induced by pulsed ultraviolet laser nanosurgery." *Traffic* **6**(12): 1093-102.
- Condeelis, J. S., Wyckoff, J. B., Bailly, M., Pestell, R., Lawrence, D., Backer, J. et Segall, J. E. (2001). "Lamellipodia in invasion." *Semin Cancer Biol* **11**(2): 119-28.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. et Falkow, S. (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." *Gene* **173**(1 Spec No): 33-8.
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. et Tsien, R. Y. (1995). "Understanding, improving and

- using green fluorescent proteins." *Trends Biochem Sci* **20**(11): 448-55.
- Griesbeck, O., Baird, G. S., Campbell, R. E., Zacharias, D. A. et Tsien, R. Y. (2001). "Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications." *J Biol Chem* **276**(31): 29188-94.
- Grill, S. W., Howard, J., Schaffer, E., Stelzer, E. H. et Hyman, A. A. (2003). "The distribution of active force generators controls mitotic spindle position." *Science* **301**(5632): 518-21.
- Hosokawa, Y., Takabayashi, H., Miura, S., Shukunami, C., Hiraki, Y. et Masuhara, H. (2004). "Nondestructive isolation of single cultured animal cells by femtosecond laser-induced shockwave." *Applied Physics a-Materials Science & Processing* **79**(4-6): 795-798.
- Kaether, C. et Gerdes, H. H. (1995). "Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein." *FEBS Lett* **369**(2-3): 267-71.
- Kumar, S., Maxwell, I. Z., Heisterkamp, A., Polte, T. R., Lele, T. P., Salanga, M., Mazur, E. et Ingber, D. E. (2006). "Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics." *Biophys J* **90**(10): 3762-73.
- Kurata, S., Tsukakoshi, M., Kasuya, T. et Ikawa, Y. (1986). "The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells." *Exp Cell Res* **162**(2): 372-8.
- Liang, H., Wright, W. H., Cheng, S., He, W. et Berns, M. W. (1993). "Micromanipulation of chromosomes in PTK2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced optical force (optical tweezers)." *Exp Cell Res* **204**(1): 110-20.
- Marshall, J., Molloy, R., Moss, G. W., Howe, J. R. et Hughes, T. E. (1995). "The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function." *Neuron* **14**(2): 211-5.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. et Lukyanov, S. A. (1999). "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species." *Nat Biotechnol* **17**(10): 969-73.
- Meldrum, R. A., Botchway, S. W., Wharton, C. W. et Hirst, G. J. (2003). "Nanoscale spatial induction of ultraviolet photoproducts in cellular DNA by three-photon near-infrared absorption." *EMBO Rep* **4**(12): 1144-9.
- Misteli, T. et Spector, D. L. (1997). "Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology." *Nat Biotechnol* **15**(10): 961-4.
- Moreno, G., Lutz, M. et Bessis, M. (1969). "Partial cell irradiation by ultraviolet and visible light: conventional and laser sources." *Int Rev Exp Pathol* **7**: 99-137.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H. et Winant, J. (1974). "Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*." *Biochemistry* **13**(12): 2656-62.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. et Cormier, M. J. (1992). "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein." *Gene* **111**(2): 229-33.
- Reid, B. G. et Flynn, G. C. (1997). "Chromophore formation in green fluorescent protein." *Biochemistry* **36**(22): 6786-91.

- Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B. et Piston, D. W. (2004). "An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET." *Nat Biotechnol* **22**(4): 445-9.
- Rizzuto, R., Brini, M., De Giorgi, F., Rossi, R., Heim, R., Tsien, R. Y. et Pozzan, T. (1996). "Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants in vivo." *Curr Biol* **6**(2): 183-8.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E. et Tsien, R. Y. (2004). "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein." *Nat Biotechnol* **22**(12): 1567-72.
- Shen, N., Datta, D., Schaffer, C. B., LeDuc, P., Ingber, D. E. et Mazur, E. (2005). "Ablation of cytoskeletal filaments and mitochondria in live cells using a femtosecond laser nanoscissor." *Mech Chem Biosyst* **2**(1): 17-25.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. et Saiga, Y. (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*." *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-39.
- Srinivasan, R. (1986). "Ablation of polymers and biological tissue by ultraviolet lasers." *Science* **234**(4776): 559-65.
- Storb, R., Amy, R. L., Wertz, R. K., Fauconnier, B. et Bessis, M. (1966). "An electron microscopy study of vitally stained single cells irradiated with a ruby laser microbeam." *J Cell Biol* **31**(1): 11-29.
- Supatto, W., Debarre, D., Moullia, B., Brouzes, E., Martin, J. L., Farge, E. et Beaurepaire, E. (2005). "In vivo modulation of morphogenetic movements in *Drosophila* embryos with femtosecond laser pulses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(4): 1047-52.
- Tao, W., Wilkinson, J., Stanbridge, E. J. et Berns, M. W. (1987). "Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(12): 4180-4.
- Tschachotin, S. (1912). "Die mikroskopische Strahlenstichmethode, eine Zelloperationsmethode." *Biol. Zentralbl.* **32**: 623-630.
- Vogel, A., Noak, J., Hüttman, G. et Paltauf, G. (2005). "Mechanism of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues." *Applied Physics B (laser and optics)* **81**: 1015-1047.
- Waddle, J. A., Karpova, T. S., Waterston, R. H. et Cooper, J. A. (1996). "Movement of cortical actin patches in yeast." *J Cell Biol* **132**(5): 861-70.
- Westphal, M., Jungbluth, A., Heidecker, M., Muhlbauer, B., Heizer, C., Schwartz, J. M., Marriott, G. et Gerisch, G. (1997). "Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein." *Curr Biol* **7**(3): 176-83.
- Yang, F., Moss, L. G. et Phillips, G. N., Jr. (1996). "The molecular structure of green fluorescent protein." *Nat Biotechnol* **14**(10): 1246-51.
- Yanik, M. F., Cinar, H., Cinar, H. N., Chisholm, A. D., Jin, Y. et Ben-Yakar, A. (2004). "Neurosurgery: functional regeneration after laser axotomy." *Nature* **432**(7019): 822.
- Yoon, Y., Pitts, K. et McNiven, M. (2002). "Studying cytoskeletal dynamics in living cells using green fluorescent protein." *Mol Biotechnol* **21**(3): 241-50.

Matériel et méthodes – Chapitre 3

Sommaire

Culture cellulaire	- 142 -
Transfection du plasmide pEGFP-actine.....	- 142 -
Présentation du système	- 142 -
Coupure par ablation directe	- 144 -
Génération d'une onde de choc	- 145 -

Table des illustrations

Figure 9 : Système d'imagerie associé à un laser femtoseconde permettant l'ablation ou la génération d'ondes de choc localisées	- 143 -
Figure 10 : Système développé dans le laboratoire du Professeur Masuhara	- 144 -
Figure 11 : Etendue de la zone de focalisation du laser femtoseconde.....	- 144 -

Culture cellulaire

La lignée de NIH-3T3 a été mise en culture selon le protocole décrit dans la section correspondante du chapitre 1. Deux jours avant les expériences, les cellules sontensemencées sur des boîtes de Pétri dont la partie centrale du fond est une lamelle de microscope recouverte de fibronectine afin de faciliter l'adhésion cellulaire.

Transfection du plasmide pEGFP-actine

Quand les cellules atteignent une confluence de l'ordre de 50 % (un jour avant les expériences), on procède à la transfection du plasmide codant pour la protéine de fusion entre l'actine et la variante de la GFP (Enhanced GFP) de chez Clontech. Cette transfection se fait au moyen de la TransFectin™ de chez Bio-Rad selon le protocole décrit par ce fabricant. La TransFectin™ est un lipide cationique qui va former une micelle autour du plasmide et c'est la micelle qui aura la capacité de traverser la membrane des cellules.

Présentation du système

Le système d'imagerie développé dans le laboratoire du Professeur Masuhara est présenté sur la figure 9 et photographié sur la figure 10.

L'échantillon est étudié sur la platine d'un microscope inversé de chez Olympus (1X71). Il est maintenu à une température de 37°C et une atmosphère contrôlée contenant 5% de dioxyde de carbone par une plateforme thermostatée reliée à une bouteille de CO₂.

Un système laser amplifié Hurricane de chez Spectra-Physics est dirigé à l'intérieur du microscope par un miroir dichroïque et focalisé sur l'échantillon au travers d'un objectif X100 possédant une grande ouverture numérique. Les impulsions qu'il délivre à une fréquence de 125 Hz ont une fréquence centrée autour de 800 nm et une largeur de 120 ps. Il est atténué par une série d'atténuateurs et de polariseurs. Des impulsions uniques sont sélectionnées à l'aide d'un obturateur mécanique (1/125s). Pendant l'étape préliminaire d'ablation laser, l'imagerie

en transmission est assurée par une caméra CCD (notée CCD1 sur le schéma) IKEGAMI, ICD-8718.

La fluorescence de l'EGFP est excitée par un laser bleu continu DPPSS à 473 nm de marque Shanghai Dream. En raison du photoblanchiment relativement rapide de l'EGFP, le laser est atténué par un filtre neutre et la fluorescence est enregistrée par une caméra CCD (notée CCD2) CoolSNAP-HQ sensible et refroidie par un étage Peltier de chez Roper Scientific. Cette fluorescence n'est de plus pas enregistrée en continu mais par clichés successifs à l'aide d'un obturateur piloté informatiquement qui ne permet l'illumination du laser que pendant l'acquisition des images.

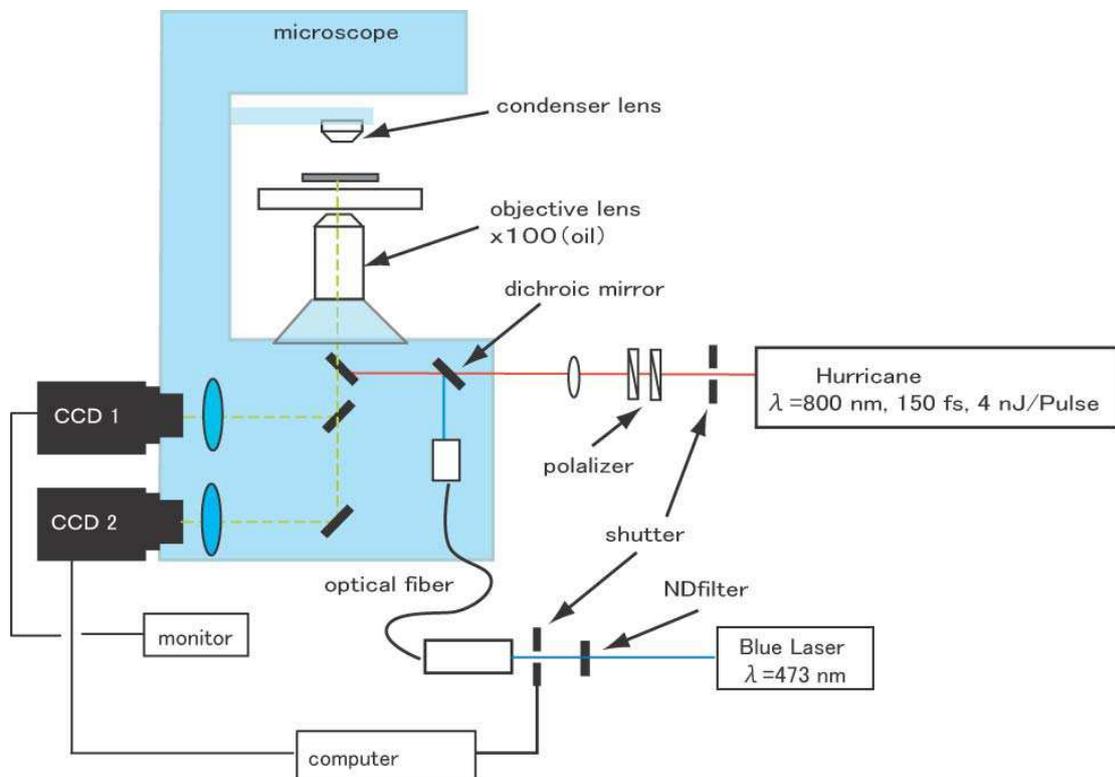


Figure 9 : Système d'imagerie associé à un laser femtoseconde permettant l'ablation ou la génération d'ondes de choc localisées



Figure 10 : Système développé dans le laboratoire du Professeur Masuhara

Coupure par ablation directe

L'ablation des filaments d'actine est réalisée par des impulsions uniques du laser d'une énergie de 4 à 7 nJ. La zone de focalisation du laser ne s'étend pas sur une zone de plus d' $1\mu\text{m}^2$ comme le montre la figure 11 qui présente la zone de photoblanchiment due à l'impulsion laser sur un échantillon fluorescent.

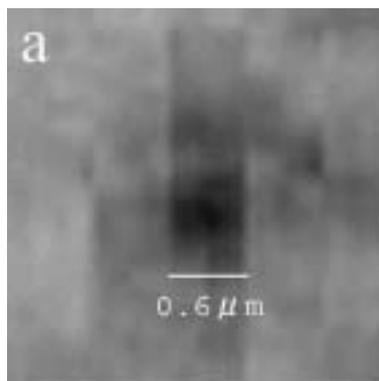


Figure 11 : Etendue de la zone de focalisation du laser femtoseconde

Génération d'une onde de choc

Une onde de choc suffisante pour décoller une cellule sans toutefois la mettre en péril est obtenue en focalisant une impulsion laser d'une vingtaine de nanojoules à une distance comprise entre 15 et 20 μm de la cellule étudiée.

Le travail présenté dans le chapitre 3 a fait l'objet d'une communication orale

Processus de reformation du cytosquelette d'actine après destruction induite par laser femtoseconde (coupure directe ou ondes de choc). Journées de l'Institut d'Alembert. MNHN, Paris. 29 Septembre 2006

et d'une communication par affiche :

Femtosecond laser-induced ablation and contact dynamics of actin filaments in NIH3T3 fibroblast cells. R. Yasukuni, J.-A. Spitz *et al.* XXIst IUPAC Symposium on Photochemistry, Kyoto, Japon, Avril 2006.

Il a de plus été soumis pour publication dans la revue *Applied Surface Science* comme compte rendu du congrès ICPEPA. Le manuscrit est présenté ci-après.

Realignment Process of Actin Stress Fibers in Single Living Cells Dissected by Focused Femtosecond Laser Irradiation

Ryohei YASUKUNI¹, Jean-Alexis SPITZ^{1,4,5}, Rachel Meallet-RENAULT⁴, Takayuki NEGISHI¹,
Yoichiro HOSOKAWA^{1,3}, Tsuyoshi ASAHI¹, Chisa SHUKUNAMI², Yuji HIRAKI^{2,3},
and Hiroshi MASUHARA^{1,3}

¹*Department of Applied Physics, Osaka University,*

²*Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University, and* ³*JST-Crest, Japan*

⁴*Laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (UMR 8531) and* ⁵
*Laboratoire de Biotechnologies et Pharmacologie génétique Appliquée (UMR 8113), Ecole Normale
Supérieure de Cachan, France*

Corresponding author: Hiroshi Masuhara, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan
Tel: +81-6-6879-7837, Fax: +81-6-687-7840, E-mail: Masuhara@ap.eng.osaka-u.ac.jp

Abstract

Recently, three-dimensional dissection of a single stress fiber in living cell was performed utilizing multi-photon absorption of a focused femtosecond laser pulse. We investigated deformation and realignment processes of an actin stress fiber after a single-shot femtosecond laser pulse irradiation by a high-speed imaging and a fluorescence imaging. In the time scale within 100 μ s, it was confirmed that the dissection at the laser focal point was initiated by deformation succeeding to the laser-induced shockwave and bubble generation. The dissected actin stress fiber was realigned in the time scale of a few tens of minutes. This result suggests that the cell activity was not affected by the deformation due to single-shot femtosecond laser pulse.

PACS code: 87.17.-d Cellular structure and processes, 87.80.Rb Tissue and cellular engineering and biotechnology, 52.38.Mf Laser ablation, 42.62.Be Biological and medical applications.

Keyword: femtosecond laser, laser processing, fibroblast cell, actin cytoskeleton, high speed imaging, fluorescence imaging.

Main text

1. Introduction

Actin cytoskeleton plays an important role in many cellular processes such as cell motility, cell-cell adhesion, cell adhesion to extracellular matrix, phagocytosis, exocytosis, and endocytosis [1]. All those biological processes are directly linked to actin polymerization and depolymerization. So that, controlling the cytoskeleton dynamics and organization can be of interest. In the field of cell biology, Sokabe *et al.* have reported that motion of cell group can be controlled by such cytoskeleton modifications applying external force to the culture substrate [2].

Recently, ultrashort laser pulse has been applied to dissect cells and tissue. Particularly, femtosecond laser has attracted much attention as a tool to cut inside cells. When a near-infrared femtosecond laser was focused by a high-numerical-objective lens, the cytoskeleton or cell organelles can be locally cut with little damage in cell membrane because of multi-photon absorption only at the laser focal point [3-6]. Furthermore, we have investigated a single-shot femtosecond laser ablation of molecular association and confirmed its efficient mechanical disruption [7-8]. From results of time- and space- resolved investigations of the initial dynamics, it was indicated that the mechanical disruption of the solid was induced not by the thermal evaporation but by thermoelastic stress

generation. When the cytoskeleton or cellular organelles were cut by a single-shot femtosecond laser pulse, it predicts that the cutting process is also due to mechanical disruption. Therefore, even low energy femtosecond laser can cut inside cells and photo -thermal and -chemical damages at the cut edge will be mineralized. So our attention was directed to the deformation and recovery process of cytoskeleton after single-shot laser irradiation.

In this work, we investigated effects of single-shot femtosecond laser dissection upon the actin cytoskeleton in two different time ranges. Cellular dissection immediately after the laser irradiation was monitored as a transmission image with time resolution of 100 μ s using a high-speed camera. The realignment of an actin stress fiber after the dissection was confirmed by a real-time fluorescence microscopy.

2. Experiment

NIH 3T3 fibroblasts were plated onto glass-bottom Petri dishes which had been coated by fibronectin (5 mg/ml) and cultured in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium supplemented with 5 % fetal bovine serum. The cells were transfected with pEGFP-actin plasmid (Clontech) and transfectin (Biorad) according to standard procedure and incubated in a CO₂ incubator (5 % CO₂ in air) at 37 °C for 2 days. Then the specimen was set on an inverted microscope (Olympus, 1X71)

equipped with an incubator chamber, where the temperature and CO₂ condition were also kept with 37 °C and 5 %. Schematic diagram of experimental set up is shown in Fig. 1. A regeneratively amplified femtosecond Ti:Sapphire laser (Spectra-Physics, Hurricane, 800 nm, 120 fs) was led into the microscope and focused by a microscope objective lens (100x, NA 1.25). The diameter of the laser focal point was about 1 μm. Single shot laser pulse was picked up from the pulse train with repetition rate of 125 Hz by a mechanical shutter. Laser power was tuned by a half-wavelength plate and dual polarizers. The laser dissection process was monitored by a high-speed CMOS camera (Photron, FASTCAM) as transmission images, whose gate time and frame rate were 20 μs and of 10000 frame/sec, respectively. In order to obtain fluorescence images, a diode pumped solid state (DPSS) laser (473 nm) was led to the 100x objective lens. The fluorescence of the actin-EGFP inside the cell before and after the laser irradiation was imaged by a cooled CCD camera (Roper Scientific, CoolSNAP-HQ).

3. Results and discussion

The modification of NIH 3T3 cells within 100 μs after the laser pulse irradiation (10 nJ/pulse) was monitored with the high-speed camera as transmission images, whose representative result is shown in Fig. 2A. Here the laser was focused in the cytoplasm. A bright circle with diameter of 6 μm

was observed at the laser focal point though the diameter of the laser focal point was less than 1 μm . The circle will be due to a bubble generation process induced by the single-shot femtosecond laser pulse. At the laser focal point, electronically excited and ionized states of water will be produced by multi-photon absorption. A part of the energy of these states will initiate photochemical reactions of bio-molecules and the residual energy will be quickly distributed to vibrational-excited states of molecules having many frequency modes, which induces a thermoelastic stress. When the stress propagates to the area surrounding the two-dimensional actin filament as a shockwave, the pressure at the laser focal point will decrease simultaneously with a little temperature elevation. Conclusively, an explosive vaporization will be induced at the laser focal point [9]. In order to make the modification more clearly, a difference image between images A(a) and A(b) was calculated as shown in Fig.2 A(c). The laser focal point and outline of the cell had a strong contrast in the difference image which means shape of the cell changed after the laser irradiation. One could consider that the cell deformed by its biological activity, however this time scale is most probably too short to activate cells. It is considered that the shockwave and the bubble formation process would induce the deformation of the whole cell. On the other hand, when a second pulse was sent to the same position, there was little contrast except for the laser focal point. Moreover, when the laser pulse was focused in the nucleus of the cell, there was also no contrast except for the laser focal point, as shown in Fig. 2 B(c). Since the cytoskeleton runs throughout the cell other than inside nuclear, these results suggest that mechanical

forces due to laser- induced shockwave and bubble generation pushed tautened cytoskeleton and propagated to the cell membrane within 100 μ s.

The behavior after the femtosecond laser dissection of an actin stress fiber has been investigated. The actin stress fiber (one of the main component of the cytoskeleton) is constructed from a bundle of actin filaments. It is well known that actin stress fibers are contractile and exert tension. A contraction of the actin fiber was observed in the time scale of a few seconds after the laser irradiation and that contraction process will be due to both actin depolymerization and release of elastic energy. Kumar *et al* also reported the same behavior of an actin stress fiber [10]. Figs. 3 shows fluorescence images after the relaxation of the cell tension. The realignment process of the actin stress fiber was observed in a few tens of minutes. Its recovery progressed with the apparition of thin individual microfilaments. It is worth noting that the actin stress fiber did not lose its directionality of the elongation even after femtosecond laser dissection. As mentioned in the introduction, the realignment process of the actin stress fibers has been investigated by affecting an external stress to the scaffold, where the actin stress fibers detached from the scaffold was adhered again and realigned in the time scale of a few tens of minutes. From the result that the realignment speed is in good agreement with that after femtosecond laser dissection, it was suggested that the cell activity was not affected by the mechanical stress induced by single-shot femtosecond laser irradiation.

4. Conclusion

We confirmed cellular events when a femtosecond laser was focused into cells in the time range of 100 μ s to a few tens of minutes. The mechanical force due to laser-induced shockwave and bubble generation was not localized near the laser focal point but propagated to the whole cell. Furthermore, femtosecond laser dissection will probably not suppress the cell activity. This fact indicates single shot femtosecond laser dissection will provide a nice approach for investigating the realignment process of the actin stress fibers. We are now developing further advanced experiment systems utilizing the original characteristics of a single-shot femtosecond laser irradiation [11-12], such as micro injection of extra cellular materials into single cell, single cell patterning, which will be reported soon.

5. Acknowledgments

This work was partly supported by the Grant-in-Aid Project on Scientific Research (KAKENHI) on Priority Area on “Molecular Nano Dynamics” from the MEXT.

References

- [1] T. D. Pollard, L. Blanchoin and R. D. Mullins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29 (2000) 545.
- [2] K. Naruse, T. Yamada, M. Sokabe, *Am. J. Physiol.* 43 (1998) 1532.
- [3] A. Heisterkamp, I. Z. Maxwell, E. Mazur, J. M. Underwood, J. A. Nickerson, S. Kumar, D. E. Ingber, *Opt. Express*. 13 (2005) 3690.
- [4] W. Watanabe, N. Arakawa, S. Matsunaga, T. Higashi, K. Fukui, K. Isobe, K. Itoh, *Opt. Express*. 12 (2004) 4203.
- [5] K. König, *Histochem. Cell Biol.* 114 (2000) 79.
- [6] U. K. Tirlapur, K. König, *The Plant J.* 31 (2002) 365.
- [7] Y. Hosokawa, M. Yashiro, T. Asahi, H. Masuhara, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*. 142 (2001) 197.
- [8] L. V. Zhigilei, B. J. Garrison, *Appl. Surf. Sci.* 127 (1998) 142.
- [9] A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman and G. Paltauf, *Appl. Phys. B: Lasers and Optics*. 81 (2005) 1015
- [10] S. Kumar, I. Z. Maxwell, A. Heisterkamp, T. R. Polte, T. P. Lele, M. Salanga, E. Mazur, D. E. Ingber, *Biophys. J.* 90 (2006) 3762
- [11] Y. Hosokawa, J. Takabayashi, S. Miura, C. Shukunami, Y. Hiraki, H. Masuhara, *Appl. Phys. A*. 79 (2004) 795.
- [12] Y. Hosokawa, J. Takabayashi, T. Omoto, T. Adachi, K. Fujiyama, T. Seki, H. Masuhara, *Proc. of ICOPB* (2003) 53.

Figure captions

Fig. 1. Schematic diagram of high-speed imaging and fluorescence imaging system incorporating regeneratively amplified femtosecond laser.

Fig. 2. High-speed microphotographs of NIH3T3 cells before (a) and at 100 μ s (b) after a single-shot femtosecond laser irradiation. The laser was focused at the cytoplasm (A) and the nucleus (B) of the cell. Microphotographs (c) is difference images between (a) and (b).

Fig. 3. Fluorescence microphotographs of actin stress fibers before laser irradiation (a) and at 0 (b), 18 (c), and 40 (d) min. after laser irradiation. Laser focal spot is in center of the white circle.

Figure

Fig. 1.

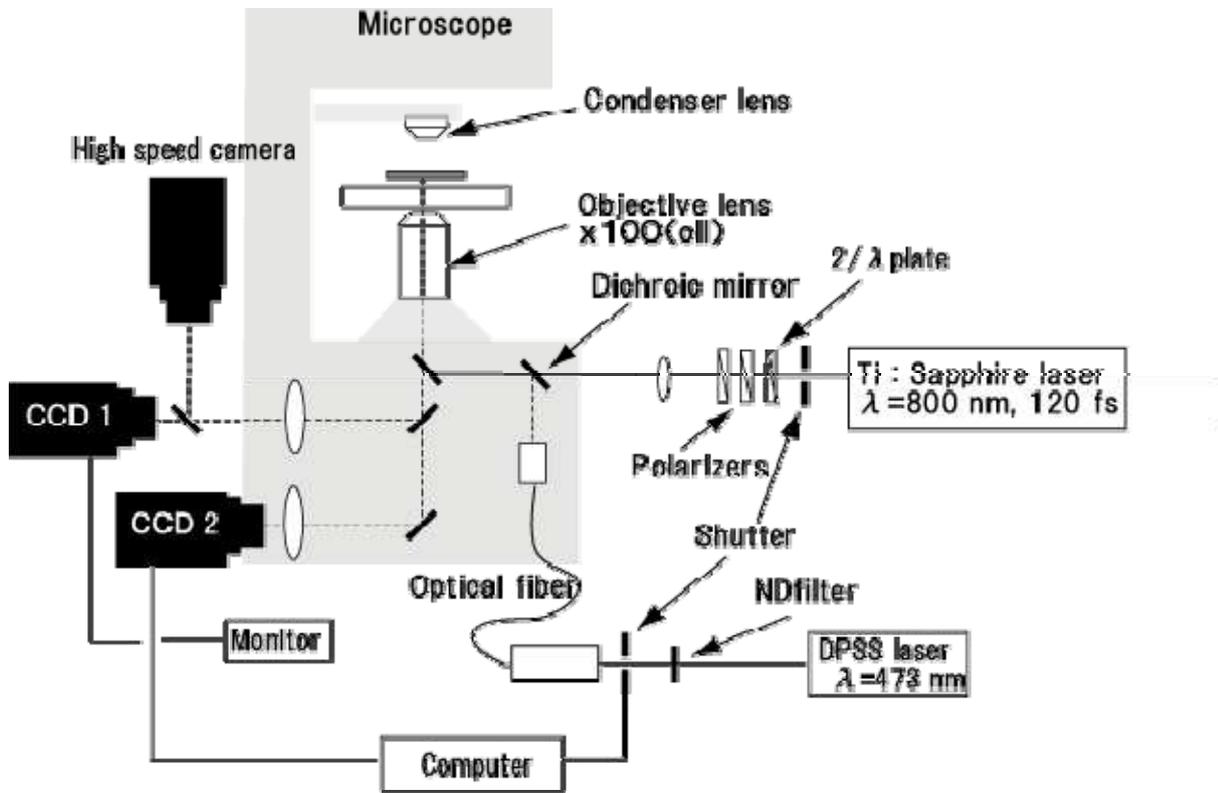


Fig. 2.

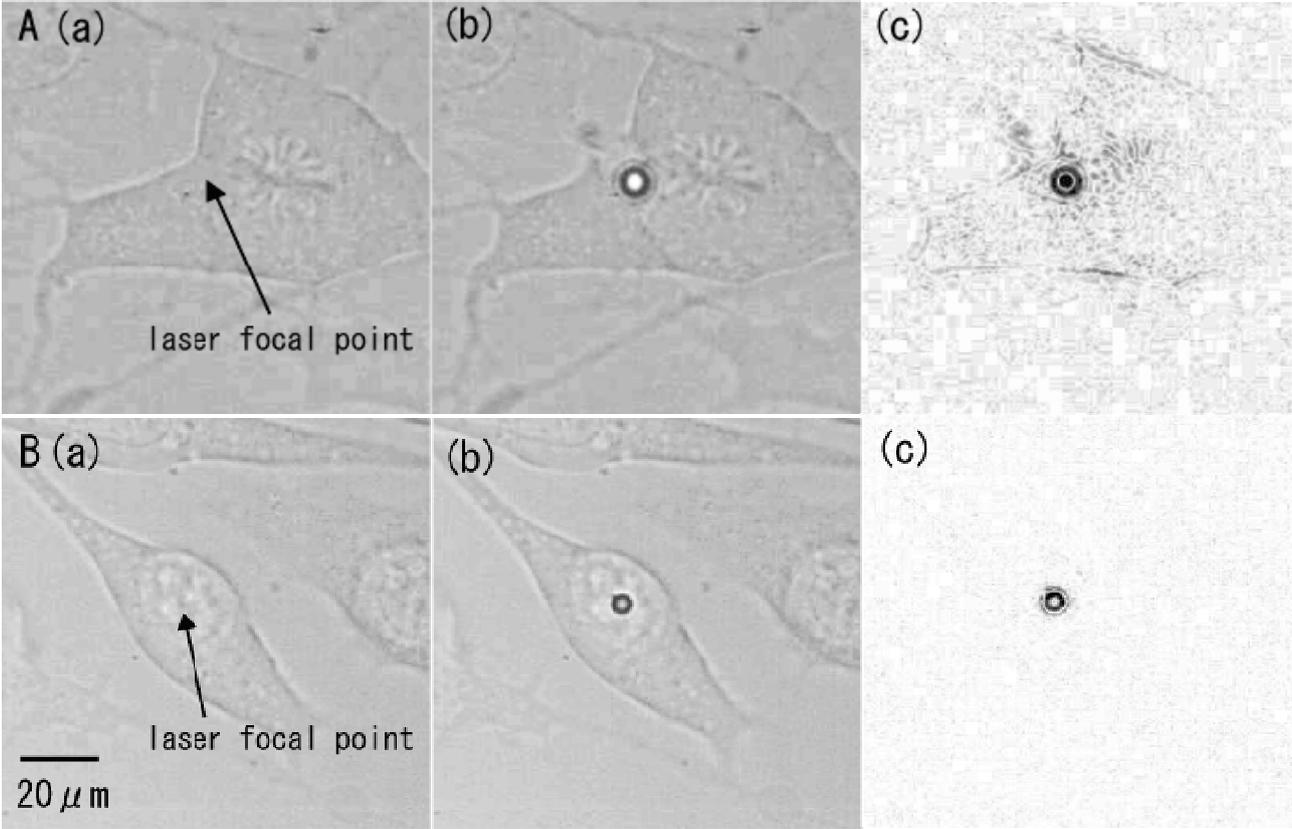
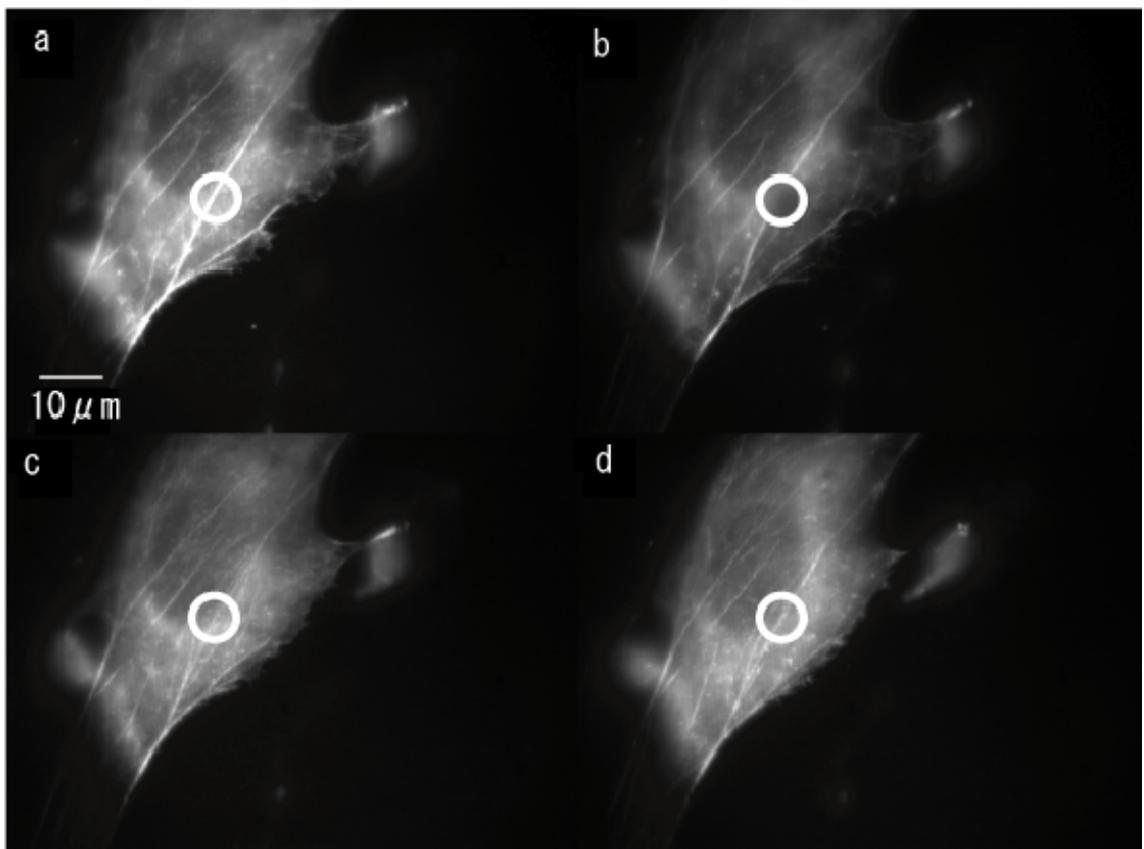


Fig. 3.



Alors que la problématique de l'étude et de l'imagerie de la polymérisation de l'actine nous était posée, nous avons essayé d'apporter et nous avons décrit dans ce manuscrit un certain nombre de réponses et de développements instrumentaux.

Tout d'abord, nous avons développé et caractérisé un nouveau protocole de mesure de la polymérisation *in vitro* de l'actine par anisotropie de fluorescence. Ce système présente un certain nombre d'avantages par rapport aux systèmes déjà décrits. En particulier, il est adapté à la mesure de la polymérisation d'actine dans des extraits cellulaires. De plus, la fluorescence est étudiée dans une gamme de longueur d'onde visible ce qui évite les problèmes d'autofluorescence non spécifique des protéines dans l'ultra-violet et permet d'utiliser les optiques classiques sans traitement UV. Ce système est d'ores et déjà utilisé par la société BioAlliance Pharma, partenaire du laboratoire, pour faire du criblage haut débit de molécules effectrices de la polymérisation de l'actine. Il a permis de sélectionner des molécules cibles dont certaines font maintenant l'objet de premières études cliniques.

Ensuite, nous avons développé un système d'imagerie de la durée de vie de fluorescence et de l'anisotropie de fluorescence résolue en temps autour d'un détecteur expérimental qui permet de faire du comptage monophotonique résolu spatialement et temporairement. Ce détecteur a été entièrement calibré et caractérisé. Pour l'imagerie de l'anisotropie, les deux polarisations sont séparées par un dispositif optique et enregistrées simultanément. Le système est maintenant fonctionnel et devrait permettre de faire de l'imagerie vidéo d'échantillons en cours de polymérisation *in vitro*, voire à plus long terme dans des cellules. Il est par ailleurs parfaitement intégré à d'autres thématiques développées dans le laboratoire, en particulier pour l'imagerie du calcium intracellulaire.

Enfin, nous proposons un système original pour faire l'imagerie de la polymérisation de fibres de stress d'actine *in vivo*. Les fibres de stress sont préalablement nanodisséquées par ablation laser femtoseconde. Les processus de restauration des fibres de stress constituées d'actine-GFP sont ensuite étudiés par imagerie de fluorescence. Ce système ouvre un large champ d'étude de processus dynamiques et architecturaux au sein d'une cellule vivante.

