

LP2N



MASTER 1 PHYSIQUE
UNIVERSITÉ BORDEAUX I

Imagerie de super-résolution basée sur la détection de molécules uniques dans le proche infrarouge

Caroline Busquet

SOUS LA TUTELLE DE
LAURENT COGNET
LABORATOIRE PHOTONIQUE NUMÉRIQUE ET NANOSCIENCES (LP2N)

AVRIL - JUIN 2013

Remerciements

Avant d'aborder le rapport de stage, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de faire le stage au Laboratoire Photonique Numérique et Nanosciences (LP2N) et qui m'ont accompagnée durant cette période.

Tout d'abord, je voudrais remercier le directeur du laboratoire M. Philippe Bouyer de m'avoir accueillie dans ce laboratoire, ainsi que M. Brahim Lounis, responsable du groupe Nanophotonique dans lequel j'ai travaillé.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers M. Laurent Cognet de m'avoir permis de faire ce stage au sein de son équipe de recherches, malgré toutes les incertitudes concernant le déménagement dans l'Institut d'Optique au cours de la période de stage.

D'autre part, je tiens à remercier Antoine Godin, postdoctorant au laboratoire, avec qui j'ai beaucoup appris, de la musique canadienne à l'alignement des lasers, en passant par les sculptures de pointes de pipettes et Matlab !

Enfin, je remercie toute l'équipe de recherches pour leur accueil, leurs conseils, la participation aux *Group Meeting* et les goûters (!) : Chiara, Morgane, Zhenghong, Bin, Jean-Baptiste, Pierre, Yi, Jonah, Laura et Philippe.

Table des matières

Introduction	1
I. Recherches Bibliographiques sur la méthode uPAINT	2
1) Microscopie de fluorescence en champ large	3
2) Acquisition des données - Détection de molécules uniques	4
3) Analyse des données	5
4) Intérêt de la méthode uPAINT dans le proche infrarouge	6
II. Etude de fluorophores infrarouges individuels	6
1) Optimisation du montage	6
2) Présentation des fluorophores à étudier	7
3) Analyse des propriétés de fluorescence au niveau de la molécule unique	9
4) Etude des fluorophores CWIR et ZWIR à l'échelle de la molécule unique	11
a) Etude des fluorophores uniques CWIR et ZWIR.	11
b) Etude des fluorophores ZWIR et CWIR couplés avec des anticorps.	12
Conclusion	15
Appendices	16
A Spectres d'Absorption et fluorescence du CWIR et du ZWIR donnés par les fournisseurs	16
B Spectres d'absorption du CWIR effectués au laboratoire	17
C Test du CWIR dans le visible	18
D Exemple d'analyse détaillée du ZWIR unique	19

Introduction

Depuis quelques années, on assiste à l'essor de l'étude de molécules individuelles pour faire de l'imagerie superrésolution. En effet, la résolution des images obtenues en microscopie classique est limitée par la diffraction de la lumière, dûe à l'ouverture numérique de l'objectif : deux objets sont distingués optiquement si la distance qui les sépare est supérieure à $\lambda/2$ où λ est la longueur d'onde. Une stratégie pour atteindre la superrésolution consiste à détecter chaque molécule individuellement, et déterminer le centre de chaque molécule, représentée par une tache lumineuse appelée *Point Spread Function* (PSF). En déterminant la position du centre de chaque PSF, on parvient à reconstituer l'image avec une position plus précise de chaque molécule détectée. La résolution devient ainsi nettement supérieure, de l'ordre de la dizaine de nanomètres.

Une technique d'imagerie superrésolution développée au laboratoire est le uPAINT (*universal Point Accumulation Imaging Nanoscale Topography*). Cette technique est basée sur la microscopie de fluorescence en champ large. Elle repose sur l'observation en temps réel des ligands fluorescents (anticorps couplés à des fluorophores) lorsqu'ils se lient aux récepteurs des membranes des cellules cibles. L'enregistrement de plusieurs séries d'images augmente le nombre de particules détectées. Avec une plus grande statistique on parvient à déterminer leur localisation pour reconstruire des images superrésolution. De plus, le uPAINT nécessite une illumination oblique de l'échantillon, qui permet d'observer uniquement les molécules fluorescentes fixées aux cellules, et non celles qui sont diffusées en solution.

Le but de mon stage est de voir si le uPAINT est applicable dans le proche infrarouge, car cette gamme de longueurs d'ondes est davantage adaptée pour l'étude des tissus épais. Il s'est donc agi de caractériser la photophysique de nouveaux fluorophores (ZWIR et CWIR) afin de déterminer lequel est le plus adapté pour le uPAINT.

I. Recherches Bibliographiques sur la méthode uPAINT

Tout d'abord, il est essentiel de présenter les recherches bibliographiques sur le uPAINT pour connaître le fonctionnement du montage expérimental, et de décrire plus précisément les techniques d'analyses nécessaires pour reconstituer les images superrésolution.

Nous allons expliquer dans un premier temps le principe de la manipulation uPAINT. Nous observons d'abord au microscope des cellules fixées sur une lamelle, sur laquelle on ajoute une solution de PBS¹. Puis, nous illuminons une grande zone de la lamelle avec le laser grâce à une technique de microscopie en champ large que nous détaillerons plus tard. Enfin, nous rajoutons un faible volume de fluorophores couplés à des anticorps dans la solution pour que ces derniers se lient de façon spécifique aux récepteurs des cellules cibles. Nous pouvons ainsi observer en temps réel les fluorophores couplés aux anticorps sur les membranes des cellules. La lamelle est éclairée suivant un champ oblique pour éviter l'observation des fluorophores hors focus. Les fluorophores sont représentés par des taches lumineuses (PSF) sur l'écran d'observation dûes à la diffraction de la lumière dans l'objectif. En déterminant le centre de chaque PSF, on est capable de localiser les molécules individuellement avec une précision de l'ordre de la dizaine de nanomètres pendant quelques secondes. En enregistrant plusieurs paquets d'images, on augmente ainsi le nombre de particules détectées, et on peut donc reconstruire une image qui restituera une topographie des molécules avec une grande résolution. La superrésolution est par conséquent un traitement statistique d'une image avec les résolutions limites standard du microscope ($\lambda/2$).

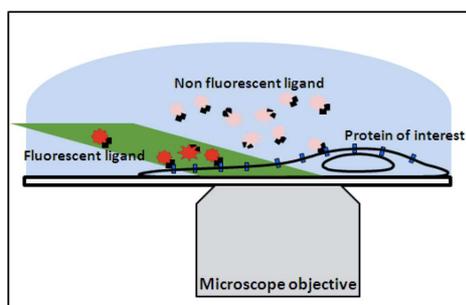


FIG. 1 – Schéma du dispositif expérimental en zoomant sur la lamelle. [2]

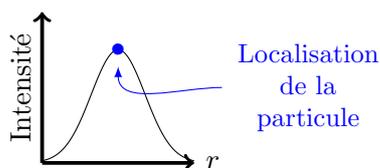


FIG. 2 – Principe de l'imagerie superrésolution : modélisation de la PSF sous forme d'une gaussienne : le centre de la fonction représente la position de la particule.

1. Phosphate Buffer Saline

Dans cette partie du rapport, je vous exposerai d'une part le principe de microscopie de fluorescence en champ large, ainsi que le détail du montage expérimental du uPAINT. D'autre part, je décrirai la méthode d'analyse des données. Enfin, j'évoquerai l'intérêt du uPAINT dans le proche infrarouge.

1) Microscopie de fluorescence en champ large

Le principe de la microscopie de fluorescence réside en l'observation des structures grâce à leur marquage par des fluorophores. En effet, lorsque le faisceau du laser est dirigé sur l'échantillon marqué par les fluorophores, ces derniers sont excités à une longueur d'onde caractéristique, la longueur d'onde d'absorption. Puis ils émettent un rayonnement en revenant à leur état fondamental avec une plus grande longueur d'onde (longueur d'onde d'émission) due à l'effet Stokes.

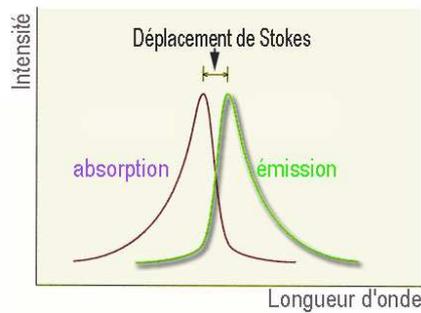


FIG. 3 – Représentation spectrale de l'effet Stokes, décrivant l'excitation des fluorophores et leur rayonnement à une longueur d'onde plus élevée

Par conséquent, en séparant spectralement l'émission de l'excitation pour chaque fluorophore, on obtient une image des molécules fluorescentes présentes marquant les récepteurs dans la cellule. Le montage expérimental est schématisé ci-après :

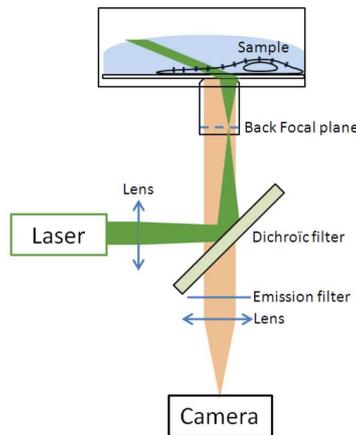


FIG. 4 – Schéma du dispositif optique. [3]

Pour une imagerie dans le proche infrarouge on utilise un laser Titane-Saphir pompé par un

laser à argon. Cette cavité permet d'obtenir un faisceau de longueur d'onde variable entre 700 et 900 nm. La longueur d'onde $\lambda = 740 \text{ nm}^2$. sera utilisée pour le uPAINT dans le proche infrarouge.

Puis, les rayons lumineux passent à travers un "télescope", c'est-à-dire une association de deux lentilles convergentes, pour tripler [3] la taille du faisceau afin de remplir l'objectif (non représenté sur le schéma).

De plus, un périscope se trouve sur le chemin optique afin d'acheminer le faisceau lumineux au niveau de la lentille précédant le microscope. Cette lentille sert à faire focaliser les rayons lumineux dans le plan focal arrière de l'objectif afin de réaliser un champ large en sortie de l'objectif.

On obtient par conséquent un champ large qui éclaire une zone de l'échantillon. Le laser excite l'ensemble des fluorophores présents sur une large zone de la lamelle. Le faisceau entrant dans l'objectif est fortement incliné par rapport à l'axe optique (environ 5 degrés), ce qui évitera dans le uPAINT d'exciter les fluorophores hors focus [3]. Nous utilisons un objectif à immersion d'huile, de forte ouverture numérique (1,45 ou 1,49) [3].

Avant d'entrer dans l'objectif, les rayons lumineux traversent un dichroïque, qui a la propriété de réfléchir la lumière dont la longueur d'onde est inférieure à une longueur d'onde critique (750 nm dans le cadre de l'expérience uPAINT dans le proche infrarouge). Au-delà, la lumière est transmise. Par conséquent, le rayon lumineux est réfléchi sur le dichroïque pour arriver sur la lamelle afin d'exciter les fluorophores. La longueur d'onde d'émission des fluorophores étant supérieure à la longueur d'onde critique du dichroïque, la lumière est transmise par le dichroïque lors de leur désexcitation.

La lumière de fluorescence arrive donc sur la caméra CCD sensible dans le proche infrarouge, qui permet d'acquérir les images de fluorescence, après avoir traversé un filtre d'émission ne laissant passer que les rayons lumineux dans le proche infrarouge. Au bout d'un certain temps, le signal des fluorophores disparaît : ce phénomène est appelé le photoblanchiment [3].

2) Acquisition des données - Détection de molécules uniques

Après avoir ajouté les anticorps fluorescents, l'acquisition des données est effectuée à partir de la caméra, en enregistrant plusieurs paquets d'images [3]. Sur l'écran, on remarque bien le fait que l'image d'une molécule devienne un spot lumineux à cause de la diffraction de la lumière [4].

Afin de pouvoir construire des images superrésolution, les images obtenues en microscopie de fluorescence doivent être de bonne qualité. On définit alors le rapport signal à bruit, qui compare l'amplitude du signal à celle du bruit. Pour obtenir ce rapport, il faut tenir compte de toutes les sources de bruit :

- le bruit de photons, "*shot noise*". Le rapport signal sur bruit suit une loi en \sqrt{N} . [7]
- le bruit de fond.
- le bruit créé par la fluorescence hors focus. Il dépend surtout de la dimension du plan d'illumination et la concentration des fluorophores utilisée.

2. Cette longueur d'onde correspond à la longueur d'onde d'excitation des fluorophores que nous étudierons.

– le bruit de lecture de la caméra

3) Analyse des données

L’analyse des données consiste à faire du “*particle tracking*”, c’est-à-dire à identifier chaque position d’une molécule fluorescente pour reconstituer sa trajectoire [7].

La théorie prédit un disque d’Airy pour le Point-Spread Function (PSF). Mais on assimile le PSF à une distribution gaussienne car c’est une fonction plus simple à utiliser et l’erreur commise est très faible [7].

Le logiciel Metamorph est utilisé afin de visualiser des résultats préliminaires (identification des fluorophores, et trajectoire des particules).

La technique utilisée pour l’analyse des données est basée sur la correspondance entre une gaussienne bidimensionnelle et le modèle de l’intensité du spot [2] :

$$I(x, y) = A_n \exp\left(-\frac{(x - x_n)^2 + (y - y_n)^2}{2\sigma_n^2}\right) \quad (1)$$

Où n est le numéro de l’image, A_n l’amplitude de la Gaussienne, et σ_n est l’écart type directement lié à la largeur à mi-hauteur : $\text{FWHM} = (2\ln(2))^{\frac{1}{2}}\sigma_n$.

Ce fit peut être effectué avec des logiciels tels que Matlab. La précision de pointé, c’est-à-dire l’incertitude sur la position du centroïde du spot, dépend donc directement du rapport signal sur bruit. A partir de cette analyse on peut reconstituer la topographie des molécules sur l’échantillon ainsi que leurs trajectoires avec une précision de l’ordre de quelques dizaines de nanomètres.

Ainsi, l’observation par la manipulation uPAINT est basée sur la révélation stochastique de certains récepteurs pour pouvoir déterminer précisément leur position.

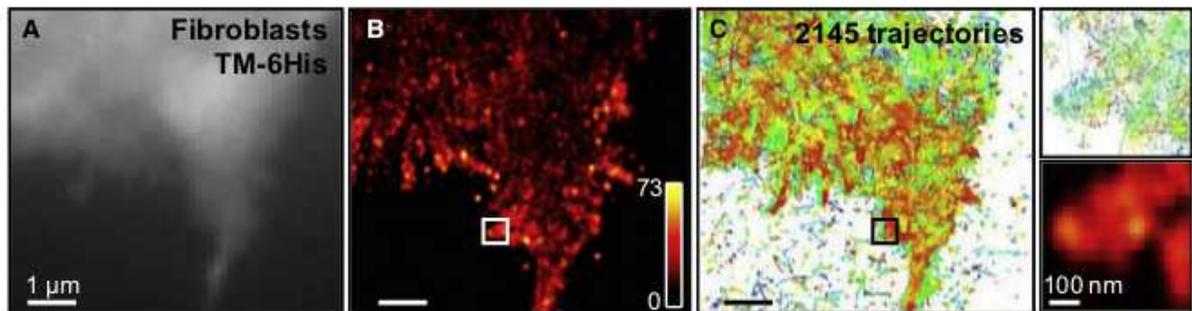


FIG. 5 – A : Imagerie uPaint par microscopie à fluorescence en champ large en utilisant le fibroblast TM-6His et le fluorochrome GFP ; B : Image superrésolue avec du TM-6His marquée avec du trisNTA-AT647N avec uPAINT ; C : trajectoires correspondantes. Source : [2]

4) Intérêt de la méthode uPAINT dans le proche infrarouge

La méthode uPAINT est applicable pour n'importe quel fluorophore. Travailler dans l'infrarouge serait très intéressant pour l'étude des tissus plus épais. En effet, les principaux composants du tissu biologique absorbent peu les rayons lumineux autour de 800 nm (l'eau et l'oxy-hémoglobine (HbO_2)), comme on peut le voir dans le spectre ci-après [6] :

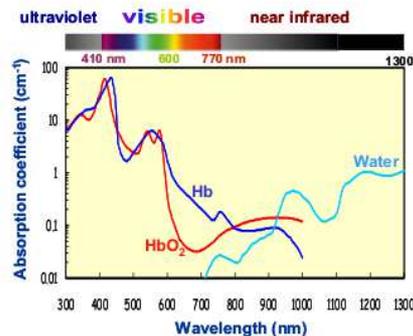


FIG. 6 – Spectre d'absorption du déoxy-hémoglobine (Hb), de l'oxy-hémoglobine (HbO_2) et de l'eau. Les concentrations de Hb et de HbO_2 sont fixées à $50 \mu M$. Source : [6]

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à des fluorophores émettant à 800 nm, le but étant de savoir lequel est adapté à la détection de molécules individuelles.

II. Etude de fluorophores infrarouges individuels

1) Optimisation du montage

Le montage utilisé pour réaliser les expériences est identique à celui présenté dans les recherches bibliographiques (cf. 1)). Cependant il a dû être adapté au proche infrarouge puisqu'il fonctionnait avec des lasers visibles. Nous avons par conséquent utilisé un laser Titane-Saphir qu'il a fallu régler pour réaliser un montage en champ large avec une inclinaison oblique.

Dans un premier temps, nous avons réglé l'orientation des miroirs et leur positionnement, pour que les rayons lumineux passent au centre des iris afin d'aligner le faisceau. La direction du faisceau doit peu varier en fonction de l'intensité du laser.

Puis, nous avons modifié le télescope pour que la taille du faisceau soit diminuée. En effet, si les fluorophores sont excités par un faisceau lumineux trop grand, le photoblanchiment est accentué (les fluorophores sont dégradés et n'absorbent plus de lumière), peut-être à cause de l'illumination oblique. Les lentilles sélectionnées ont une distance focale $f_1 = 100$ mm et $f_2 = 30$ mm. Le faisceau arrivant sur la lentille étant divergent, on ne peut pas prédire exactement à quelle distance on doit

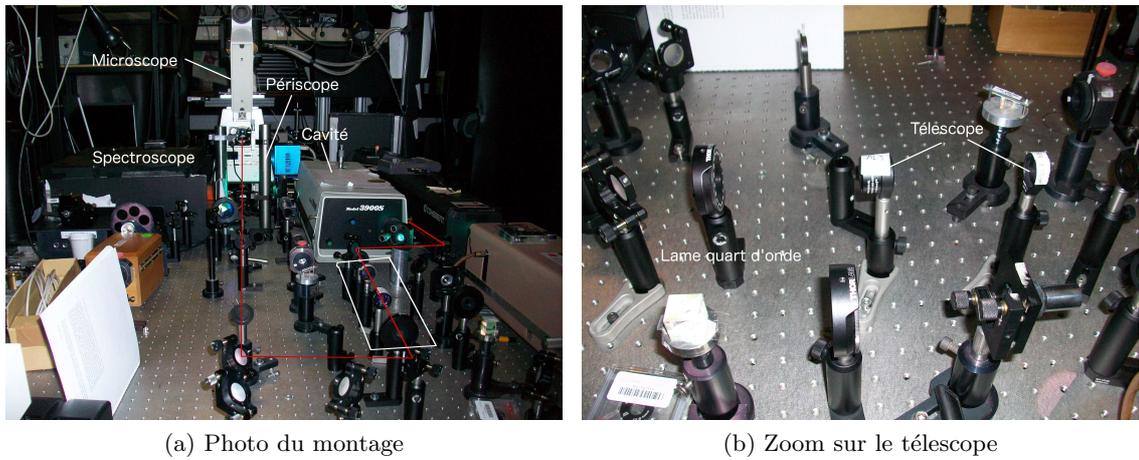


FIG. 7 – Photographies du montage expérimental légendées (a) Photo globale, avec en rouge le chemin optique. (b) Photo correspondant au zoom du rectangle de la photo de gauche.

positionner les lentilles l’une par rapport à l’autre. Toutefois, les calculs théoriques considérant des rayons lumineux parallèles donnent une bonne approximation. La distance théorique séparant les lentilles convergentes est ainsi égale à la somme des distances focales : $f'_1 + f'_2 = 130$ mm. La taille du faisceau est ainsi diminuée d’un facteur 3.

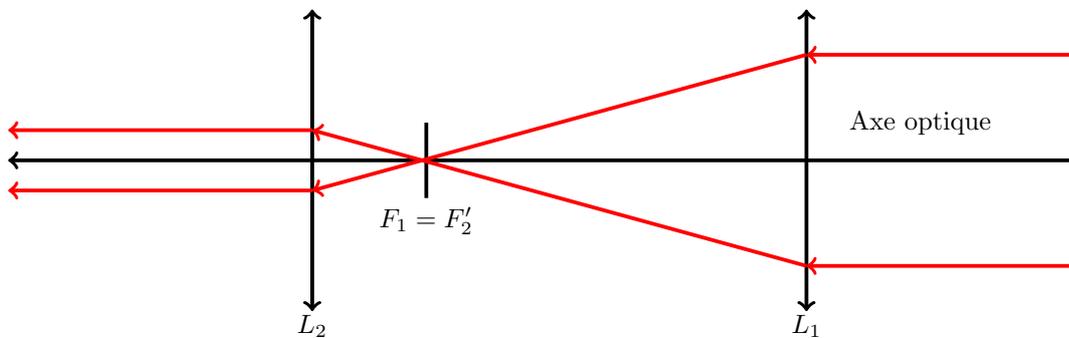


FIG. 8 – Schéma des rayons lumineux traversant les lentilles

Enfin, il faut modifier l’inclinaison du miroir du périscope pour obtenir un faisceau incliné.

2) Présentation des fluorophores à étudier

Nous avons étudié deux fluorophores émettant dans le proche infrarouge, le CWIR et le ZWIR, afin de sélectionner le plus adapté pour le uPAINT, c’est-à-dire pour la détection de molécules uniques. Ils ont été étudiés seuls et couplés. En effet, les fluorophores sont couplés à des anticorps (ici le Panitumumab) pour être utilisés pour le uPAINT. Ces molécules (les anticorps) se lient spécifiquement aux récepteurs EGFR (“*epidermal growth factor Receptor*”) à la membrane de cellules cancéreuses. Par conséquent ce sont ces anticorps fluorescents qui vont permettre d’observer

ver les cellules par fluorescence, avant de reconstituer l'image superrésolution. Nous avons ainsi fait des spectres d'absorption des fluorophores seuls et couplés pour vérifier la longueur d'onde d'excitation des fluorophores. Les spectres du ZWIR sont donnés dans la figure 9. Le spectre du CWIR est en annexe car les résultats aboutissent aux mêmes conclusions (cf B.).

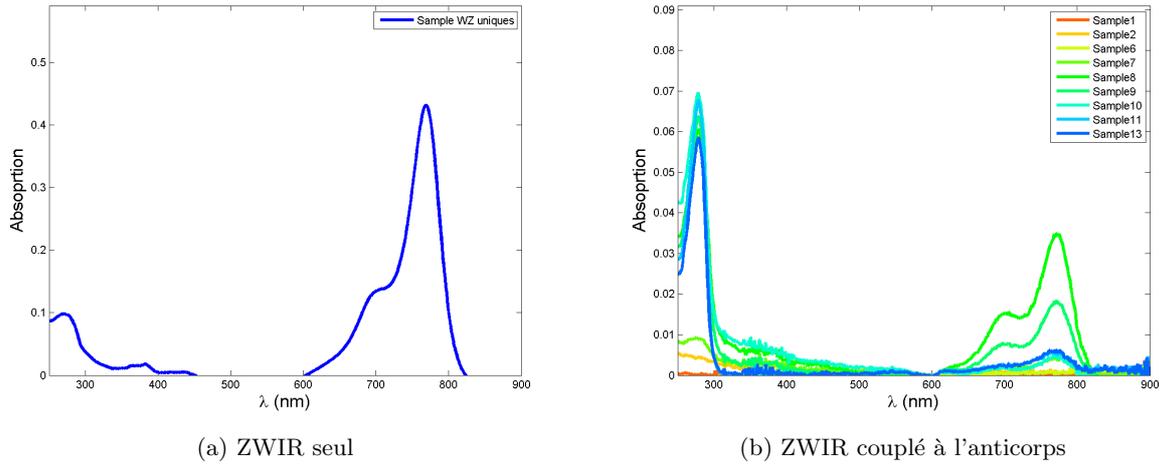


FIG. 9 – Spectres d'absorption du ZWIR (a) Fluorophore seul. (b) Fluorophore couplé à l'anticorps.

Chaque couleur correspond à une fraction de l'échantillon recueillie au cours du couplage, correspondant à un rapport anticorps-fluorophore différent. Les deux fluorophores peuvent être excités à partir de 740 nm pour avoir une absorption optimale. On remarque une déformation du spectre lors du couplage, avec une diminution de l'absorption plus marquée à 700 nm. Il s'agira de savoir si cette différence révèle une modification des propriétés de fluorescence. De plus, on remarque un pic d'absorption sur le spectre des anticorps couplés à 280 nm. Il indique la quantité d'un acide aminé présent dans une protéine, le tryptophane. Il permet de quantifier la concentration des protéines (ici les anticorps). Ainsi, avec une analyse qualitative des spectres, nous avons choisi l'échantillon de fluorophores nous allons étudier. Par exemple, on a sélectionné la huitième fraction du ZWIR (cf. *Sample 8* sur le spectre) car c'était l'échantillon qui possédait le plus de fluorophores par anticorps, le ratio du pic d'absorption à 776 nm (fluorophore) par rapport à celui de 280 nm (tryptophane) correspondant à 0.5 fluorophore par anticorps en moyenne.

De plus, nous avons réalisé un double couplage, en fixant sur les anticorps des fluorophores ATTO 532, en plus du ZWIR (ou CWIR). Ceci a pour but de vérifier si les anticorps sont fonctionnels en réalisant du uPAINT à 532 nm, avant de procéder aux investigations sur le uPAINT dans l'infrarouge que l'on est en train de mettre au point. Le spectre d'absorption est donné ci-après pour le ZWIR, celui du CWIR est donné en annexe :

On voit bien l'absorption à 532 nm, en plus de celles à 280 et 740 nm. Le couplage a bien été effectué, et nous avons procédé à des tests pour vérifier la bonne fixation des anticorps sur les cellules.

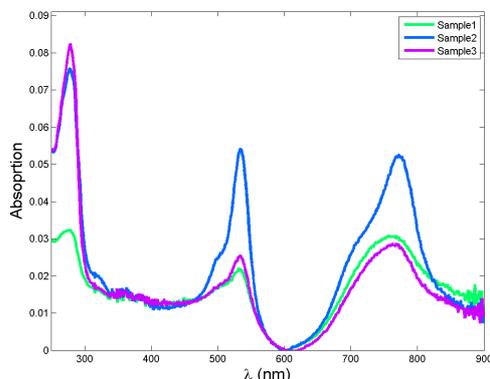


FIG. 10 – Spectre d’absorption du ZWIR et de l’ATTO 532 couplés à l’anticorps Panitumumab

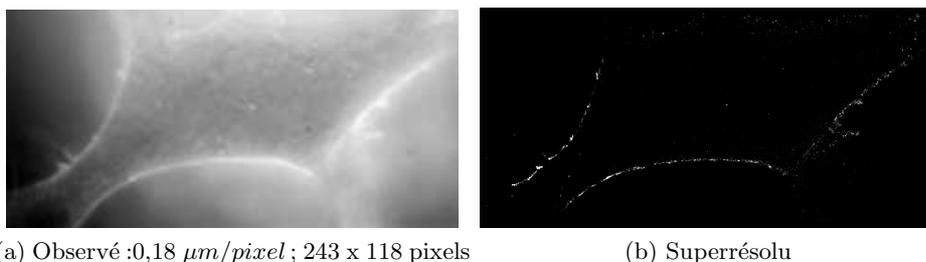


FIG. 11 – Test des fluorophores ZWIR dans le visible (a) Visualisation de molécules uniques sur l’écran d’observation. (b) Image superrésolue reconstituée après traitement des images observées

On voit bien les fluorophores, couplés aux anticorps, se fixer correctement sur la membrane de la cellule, ce qui implique un couplage réussi. Le résultat est identique pour le CWIR (cf C).

3) Analyse des propriétés de fluorescence au niveau de la molécule unique

On s’intéresse maintenant à la photophysique des fluorophores, par conséquent on a réalisé une étude sur des lamelles “vides”, c’est-à-dire sans cellules, sur lesquelles on ajoute 250 μL de PBS. On ajoute ensuite un volume de fluorophores (5 μL pour les uniques, 10 μL pour les couplés).

Après avoir vérifié au spectrophotomètre la longueur d’onde souhaitée, on a acquis plusieurs vidéos avec le logiciel *Winview*. Le temps d’intégration choisi est de 50 ms. Ceci correspond à la durée d’accumulation des photons sur les pixels de la caméra.

Puis, on a analysé ces vidéos, en faisant du *particle tracking*, grâce à un programme fait par le logiciel *Metamorph*. Cette analyse donne accès aux positions des points lumineux, au nombre de trajectoires reconstituées avec leurs durées correspondantes, ainsi qu’aux intensités. De plus, on peut reconstituer des images superrésolution. Voici un exemple d’image superrésolution obtenue pour le ZWIR :

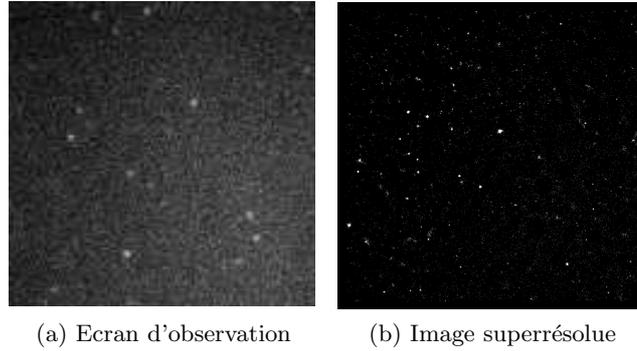


FIG. 12 – Image correspondant à l’observation du ZWIR dans le proche infrarouge, pour une puissance appliquée de 20 mW

Nous déterminons ensuite la résolution pour convertir les pixels en micromètres quand nous analyserons les données. On observe une lamelle graduée au microscope, une graduation correspondant à $10\ \mu\text{m}$. Puis, à l’aide d’un logiciel de lecture d’images, on détermine le nombre de pixels correspondant à plusieurs graduations.

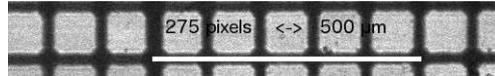


FIG. 13 – Image utilisée pour la calibration, 500 microns correspondent à 275 pixels

En effectuant un produit en croix, on en déduit que $0,18\ \mu\text{m}$ correspond à 1 pixel.

On peut ainsi procéder à l’analyse des propriétés de fluorescence des fluorophores avec Matlab. En effet, on a mesuré dans un premier temps l’intensité moyenne de fluorescence pour chaque trace d’une molécule unique, et calculé la moyenne et la médiane pour la distribution composée par l’ensemble des molécules.

Puis, on a déterminé la précision de pointé, c’est-à-dire l’incertitude sur la position (x, y) de la particule. Pour cela, on considère la distribution des positions sur les traces longues de molécules immobilisées. Ensuite on construit un histogramme pour avoir la distribution des positions autour de la valeur moyenne. Cette distribution est modélisée par une gaussienne (cf. (1)). La largeur à mi-hauteur de cette gaussienne représente ainsi la précision de pointé.

Ensuite, nous avons calculé un autre paramètre important, le rapport signal sur bruit. Pour cela, nous avons utilisé la définition suivante :

$$SNR = \frac{\text{Intensité du signal} - \text{Fond}}{\text{Ecart type de l'intensité du fond}} \quad (2)$$

Pour calculer le fond, on détermine l’intensité autour du point lumineux correspondant au fluorophore. L’intensité du signal correspond au centre de la gaussienne modélisant l’intensité de chaque particule.

4) Etude des fluorophores CWIR et ZWIR à l'échelle de la molécule unique

Les anticorps utilisés sont excités dans le proche infrarouge. On effectue les mesures et analyses expliquées dans la partie 3). Pour un même fluorophore, on réalise plusieurs acquisitions en modifiant l'intensité du faisceau appliqué pour chaque échantillon.

a) Etude des fluorophores uniques CWIR et ZWIR

Les résultats de l'étude des fluorophores uniques sont regroupés dans la figure 15.

Durée des traces : La durée des traces est à peu près constante, moyennée à 0,8 s pour l'ensemble des intensités appliquées, et semblable pour les deux fluorophores.

Médiane et Moyenne des intensités : Ces deux quantités évoluent au fur et à mesure que l'on augmente la puissance du laser. Elles sont presque toujours supérieures pour le ZWIR, ce qui signifie que les intensités du rayonnement pour les fluorophores ZW sont plus élevées et favorisent une meilleure détection. De plus, lorsque l'on étudie l'évolution de la moyenne des intensités en fonction de l'intensité appliquée, on s'attend à la présence d'un plateau de saturation, dû à une saturation de l'excitation des fluorophores. En effet, le fluorophore reste un certain temps dans l'état excité avant de revenir à l'état fondamental, phénomène à l'origine de son rayonnement. Si l'intensité est trop importante, alors le taux d'excitation des fluorophores est trop rapide, l'état excité est saturé car les fluorophores mettent du temps à revenir à l'état fondamental. Il existe une loi modélisant cette saturation :

$$I_R = C \times \frac{1}{1 + \frac{I_S}{I}} \quad (3)$$

Où : I_R est l'intensité rayonnée par les fluorophores (u.a.), C est une constante à définir suite au fit des données expérimentales (en u.a.), I_S est l'intensité de saturation ($W.cm^{-2}$), I est l'intensité appliquée (en $W.cm^{-2}$).

En étudiant les courbes expérimentales obtenues on retrouve bien une saturation. On a effectué un fit sur la courbe représentant la moyenne des intensités avec cette équation, par exemple celle du CWIR unique :

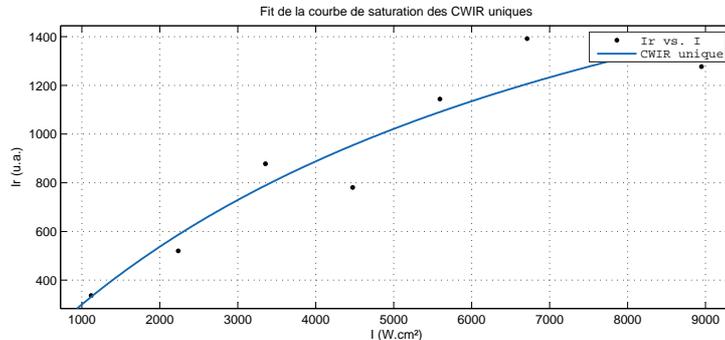


FIG. 14 – Fit de la courbe de saturation de la moyenne des intensités.

L'équation obtenue est :

$$I_R = \frac{2557}{1 + \frac{7521}{I}}$$

Le coefficient de corrélation R^2 est égal à 0,9131. Par identification, l'intensité de saturation est égal à $7,52 \text{ kW.cm}^{-2}$, le coefficient C est égal à 2557 u.a. Les données expérimentales suivent les lois théoriques.

Cette courbe peut servir de courbe de calibration, afin de déterminer l'intensité rayonnée par les fluorophores pour chaque puissance appliquée.

Rapport signal sur bruit : Ce rapport est important pour déterminer la qualité des images obtenues. Il est supérieur pour le ZWIR, avec une différence importante à $5,6 \text{ kW.cm}^{-2}$. A cette puissance, le rapport signal sur bruit du ZWIR est 1,7 fois supérieur à celui du CWIR.

Précision de localisation : Cette donnée est très importante dans la comparaison des fluorophores puisque la précision avec laquelle on détecte les particules constitue un grand enjeu dans l'étude des molécules uniques. Le ZWIR se détache de nouveau du CWIR par ces précisions de pointé toujours plus grandes (incertitudes plus petites), allant jusqu'à atteindre un minimum en $5,6 \text{ kW.cm}^{-2}$, avec $16 \pm 2 \text{ nm}$.

Suite à l'interprétation des résultats obtenus, on peut en déduire que le ZWIR est meilleur que le CWIR, avec une utilisation optimale à $5,6 \text{ kW.cm}^{-2}$. Le couplage avec les anticorps va-t-il influencer sur cette conclusion ?

b) Etude des fluorophores ZWIR et CWIR couplés avec des anticorps

Les résultats de l'étude des fluorophores couplés aux anticorps sont sur la figure 16. On compare ainsi les fluorophores couplés aux anticorps :

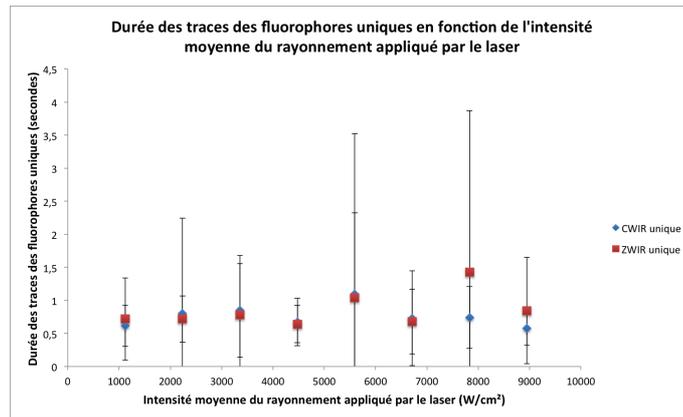
Durée des traces : On constate ici une distinction à partir de $4,5 \text{ kW.cm}^{-2}$ où la durée des traces du ZWIR reste toujours supérieure à celle du CWIR. Ces durées sont cependant plus grandes que celles obtenues pour les fluorophores uniques. Ceci est dû à la fixation de trois fluorophores pour un anticorps. Par conséquent on observe la plus longue trace des trois fluorophores sur l'anticorps, alors qu'auparavant on observait les traces de tous les fluorophores.

Médiane et Moyenne des intensités : Elles suivent la même tendance que pour l'étude des fluorophores uniques avec la présence du même plateau de saturation. Les valeurs sont toujours plus grandes pour le ZWIR.

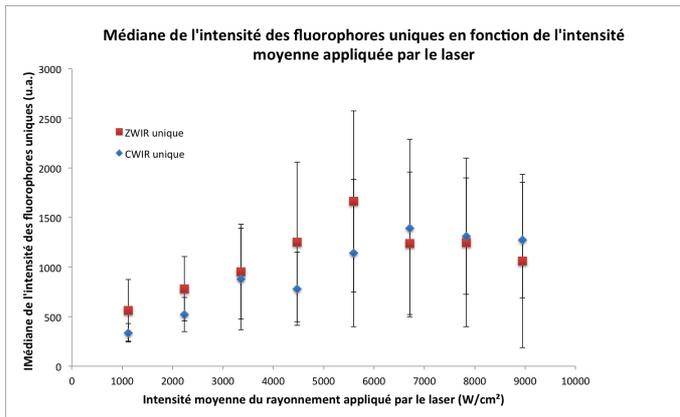
Rapport signal sur bruit : Le rapport signal sur bruit est globalement supérieur pour le ZWIR, avec une distinction notable à $6,7 \text{ kW.cm}^{-2}$, où il est 1,5 fois supérieur à celui du CWIR.

Précision de localisation : Le ZWIR a toujours une précision comparable à celle obtenue lors de l'étude des fluorophores uniques. En effet, le minima est atteint en $6,7 \text{ kW.cm}^{-2}$, avec $21 \pm 2 \text{ nm}$ de précision de pointé.

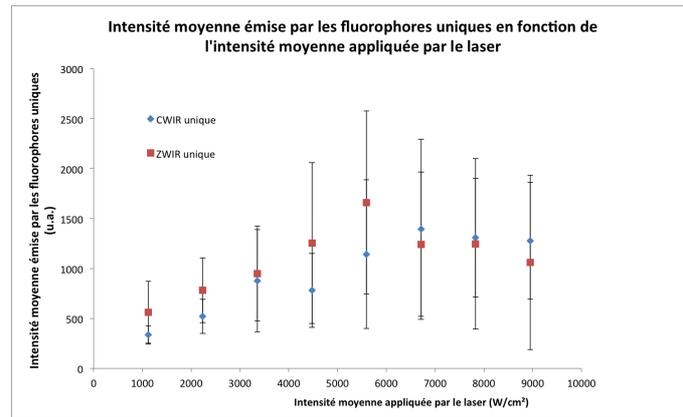
Le ZWIR reste ainsi le meilleur fluorophore. La précision de pointé est restée comparable après couplage, en revanche le couplage a entraîné l'augmentation de la durée des traces. L'utilisation optimale est ainsi obtenue pour $6,7 \text{ kW.cm}^{-2}$.



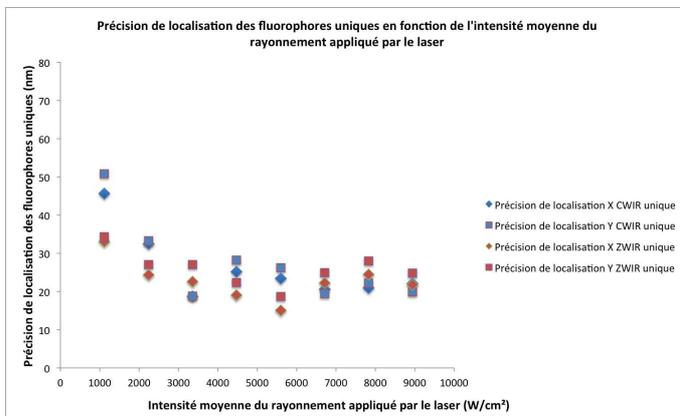
(a) Durée de vie



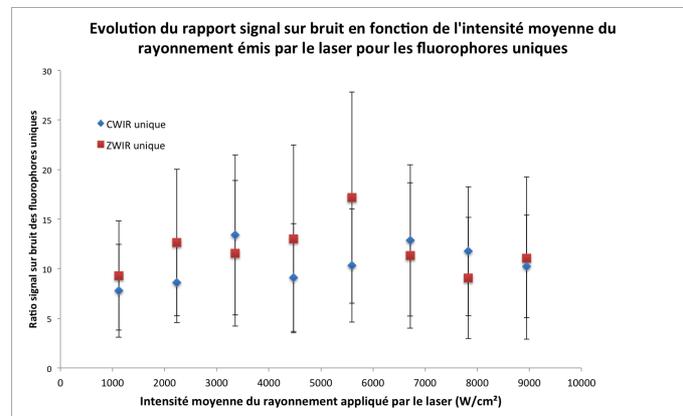
(b) Médiane Intensité



(c) Intensité moyenne

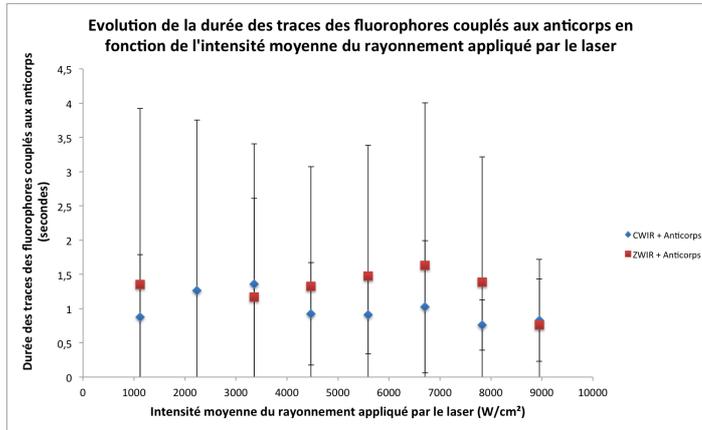


(d) Précision de pointé

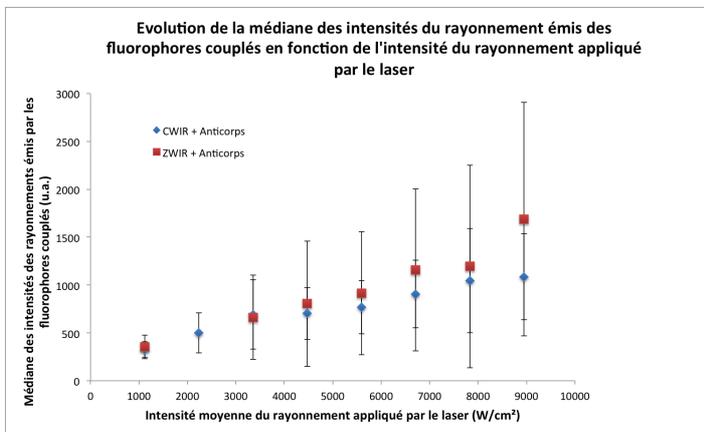


(e) Rapport signal à bruit

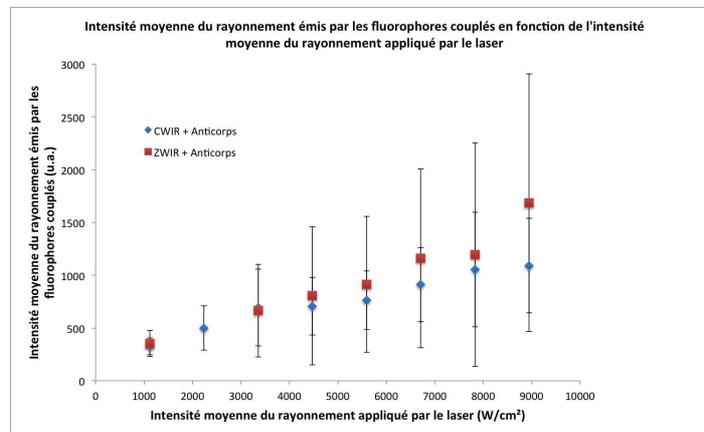
FIG. 15 – Résultats relatifs à l'étude des fluorophores uniques



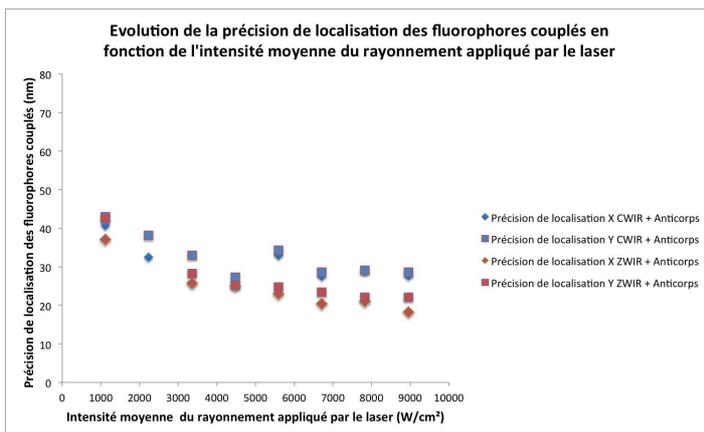
(a) Durée de vie des fluorophores



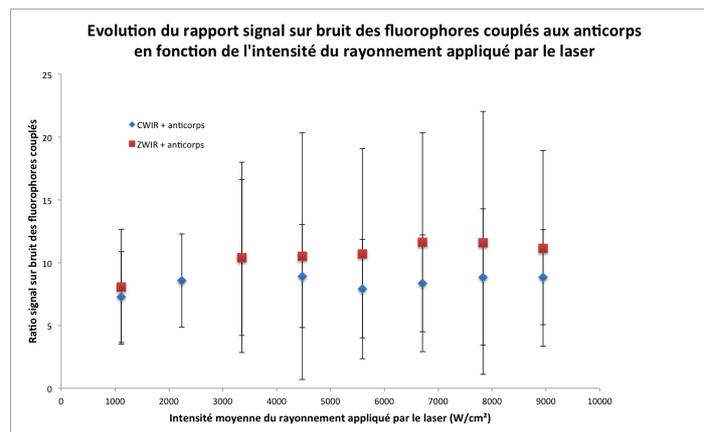
(b) Médiane Intensité



(c) Intensité moyenne



(d) Précision de pointé



(e) Rapport signal à bruit

FIG. 16 – Résultats relatifs à l'étude des fluorophores couplés aux anticorps

Conclusion

Ainsi, pendant ce stage, nous avons pu valider un fluorophore infrarouge utilisable par le uPAINT, le ZWIR, en le comparant à un autre nouveau fluorophore, le CWIR. Grâce à une optimisation du montage optique, nous avons été capables d'observer ces composés à l'échelle de la molécule unique, avec une résolution de vingt nanomètres. Ceci n'était pas évident à réaliser, car cela implique une résolution égale à $\lambda/40$, alors que la résolution reste égale à $\lambda/2$ pour le microscope classique, soit un gain en résolution d'un facteur 20. Malgré l'étude effectuée sur les fluorophores, nous n'obtenons pas d'images de cellules superrésolution : les fluorophores couplés aux anticorps photoblanchissent trop rapidement pour faire des vidéos analysables. En revanche, si l'on se déplace sur la lamelle en bougeant la platine du microscope, on observe nettement les membranes. Les fluorophores sont-ils photoblanchis avant d'être fixés sur la membrane ? De plus, le microscope utilisé pour les expériences a quelques problèmes qui expliqueraient aussi le fait qu'on ne fasse pas d'images superrésolution : présence de taches noires sur l'écran d'observation, par exemple. Un nouveau microscope optimisé pour l'infrarouge est actuellement en train d'être monté au laboratoire. Ainsi, en résolvant ce problème, on pourra réaliser des images super-résolution de cellules dans le proche infrarouge. L'étude des molécules uniques offre ainsi des perspectives d'imagerie particulièrement intéressantes pour comprendre le mécanisme du corps humain, et ainsi apporter une contribution aux recherches médicales sur des maladies telles que le cancer, l'Alzheimer...

De plus, les compétences acquises durant ces deux derniers mois sont multiples. D'une part, j'ai pris connaissance des protocoles expérimentaux en biochimie, comme la culture et la fixation de cellules, le couplage de fluorophores avec des anticorps. D'autre part, j'ai appris quelques notions en programmation (Matlab). Enfin, j'ai acquis un savoir-faire dans l'alignement des lasers et la conception de lignes optiques (disposition des miroirs plans, de cubes séparateurs, de lentilles, de lame quart d'onde), qui me semblent très importantes car les lasers sont devenus incontournables dans le monde de la physique. Ces deux mois passés au laboratoire ont aussi été l'occasion de réfléchir sur mon projet professionnel. En effet, suite au Master Recherche que j'ai commencé cette année, je souhaitais soutenir une thèse en biophysique. Ce stage m'a beaucoup plu et m'encourage à poursuivre l'objectif que je m'étais fixé.

A | Spectres d’Absorption et fluorescence du CWIR et du ZWIR donnés par les fournisseurs

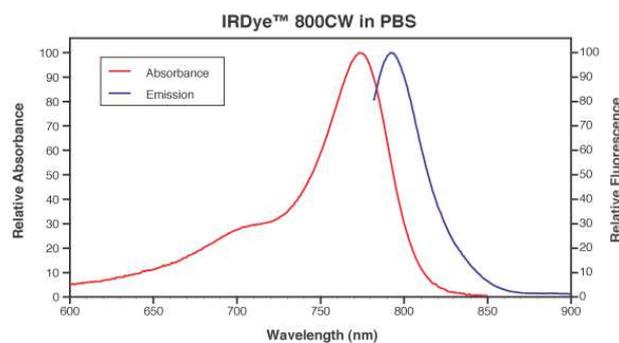


FIG. A.1 – Absorption et Fluorescence du fluorophore CWIR en fonction de la longueur d’onde en solution de PBS. Source : <http://biosupport.licor.com>

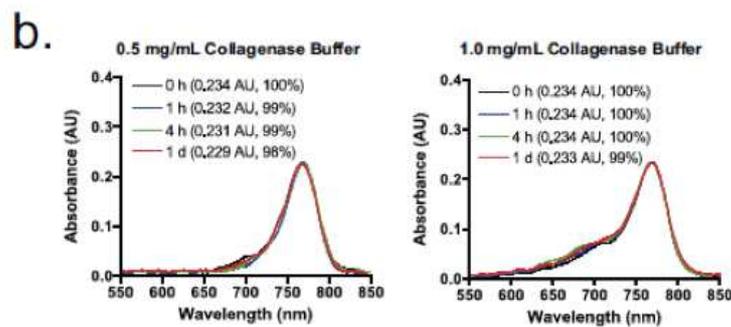


Figure 1 | Preparation of NIR fluorophore-conjugated collagen scaffold. (a) Schematic drawing of NIR scaffold preparation and chemical structure of ZW800-1 NHS ester. (b) Optical property and stability of ZW800-1 (10 μ M) in collagenase buffer. Shown are absorbance spectra measured after 10-fold dilution in working buffer (extinction coefficient = 234,000 L mol⁻¹ cm⁻¹ in collagenase buffer).

FIG. A.2 – Absorption et fluorescence du fluorophore du HER-ZW800 en fonction de la longueur d’onde. Source : “The Flare Foundation”

B | Spectres d'absorption du CWIR effectués au laboratoire

Ci-dessous figurent les spectres d'absorption du CWIR seul et couplé à un anticorps, car nous devons utiliser des anticorps couplés pour le uPAINT (fixation sur les membranes des cellules cibles).

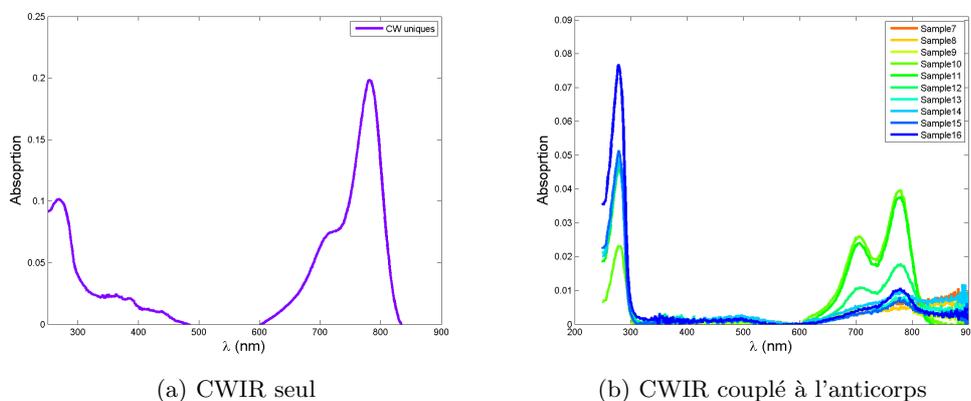


FIG. B.1 – Spectres d'absorption du CWIR (a) Fluorophore seul. (b) Fluorophore couplé à l'anticorps

Chaque couleur correspond à une fraction de l'échantillon recueillie au cours du couplage, correspondant à un rapport anticorps-fluorophore différent. Les deux fluorophores peuvent être excités à partir de 740 nm pour avoir une absorption optimale, comme le ZWIR. On remarque également une déformation du spectre lors du couplage. De plus, on remarque le même pic d'absorption sur le spectre des anticorps couplés à 280 nm. Ainsi, avec une analyse qualitative des spectres, nous avons décidé quel échantillon de fluorophores choisir pour les étudier. Par exemple, on a sélectionné la dixième fraction du CWIR (cf. *Sample 10* sur le spectre) car c'était l'échantillon qui possédait le plus de fluorophores par anticorps, le ratio s'élevant à 1.5 fluorophore par anticorps

C | Test du CWIR dans le visible

Dans un premier temps, nous avons fait le spectre d'absorption du CWIR et l'ATTO 532 couplés à l'anticorps pour voir si le couplage était réussi.

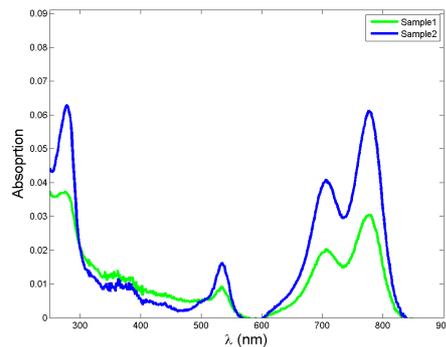


FIG. C.1 – Spectre d'absorption du CWIR 800 et de l'ATTO 532 couplés au Panitumumab

En constatant un pic d'absorption à 532 nm, en plus de ceux à 280 et 740 nm, nous avons effectué des images superrésolution de cellules sur le uPAINT du visible :

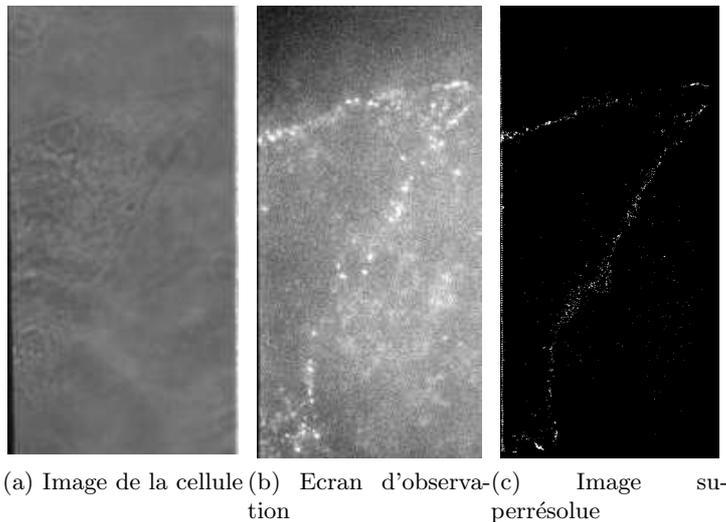


FIG. C.2 – Test des fluorophores CWIR dans le visible

Les anticorps se fixent bien sur les récepteurs cibles, on obtient des images superrésolution des membranes. Le couplage a donc été bien réalisé, et on peut étudier le CWIR pour une utilisation dans le proche infrarouge.

D | Exemple d'analyse détaillée du ZWIR unique

Dans cette annexe figure l'ensemble des courbes, histogrammes qui montrent la démarche des calculs pour faire l'image superrésolution. On a choisi de comparer les données obtenues à 1,1 et 7,8 $kW.cm^{-2}$, soit 5 et 35 mW de puissance appliquée sur le montage uPAINT dans le proche infrarouge du laboratoire.

Moyennes et Médianes des intensités

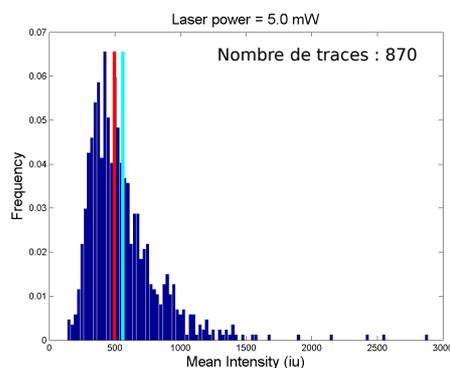


FIG. D.1 – Histogramme des intensités moyennes pour chaque trace à 5 mW. En ordonnée figure la fraction de traces ayant l'intensité en abscisse.

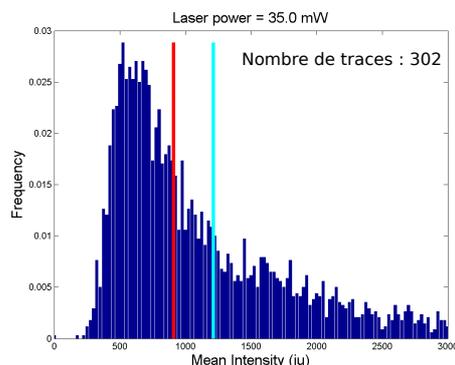


FIG. D.2 – Histogramme des intensités moyennes pour chaque trace à 35 mW

Le trait rouge correspond à la moyenne de l'ensemble des intensités des traces obtenues, le trait bleu correspond à la médiane. Comme l'on s'y attend, les moyennes et médianes des intensités sont plus élevées pour 35 mW.

Durée des traces

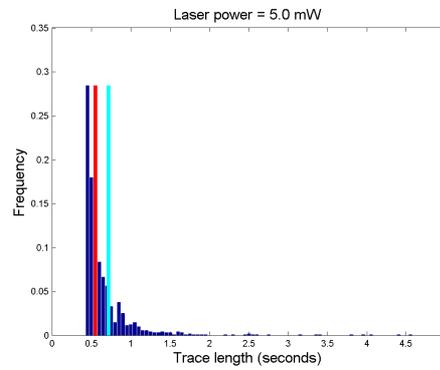


FIG. D.3 – Histogramme des durées des traces : 5 mW

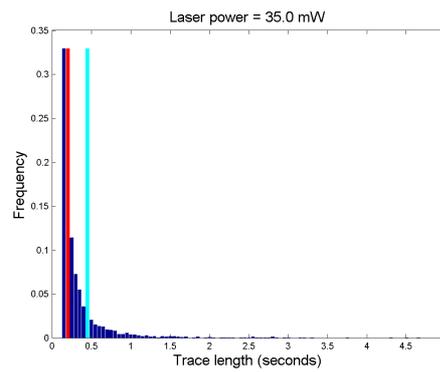


FIG. D.4 – Histogramme des durées des traces : 35 mW

Rapport signal sur bruit

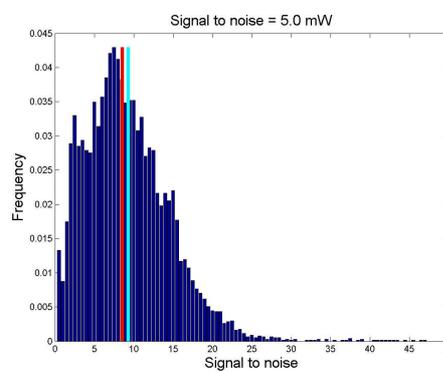


FIG. D.5 – Histogramme du rapport signal sur bruit : 5 mW

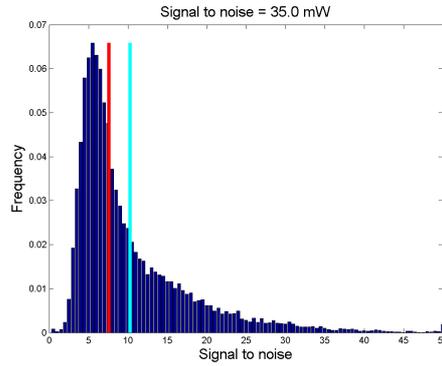


FIG. D.6 – Histogramme du rapport signal sur bruit : 35 mW

Modélisation de l'ensemble des détections par une gaussienne

Pour obtenir ces courbes, il faut modéliser chaque PSF par une gaussienne sur l'ensemble des images de la vidéo enregistrée. On modélise aussi le faisceau du laser par une gaussienne. Sur l'axe vertical, nous avons les intensités, sur l'axe horizontal nous avons les positions.

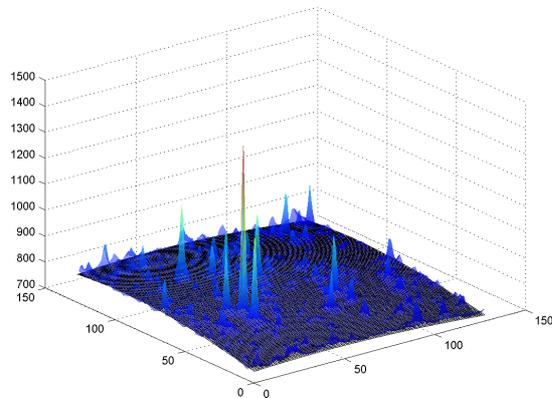


FIG. D.7 – Modélisation de la somme des images par des gaussiennes : 5 mW.

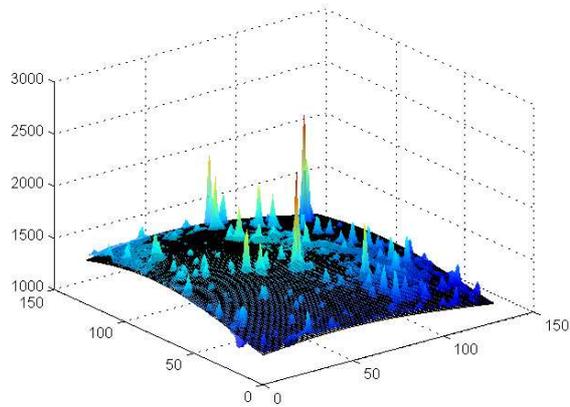


FIG. D.8 – Modélisation de la somme des images par des gaussiennes : 35 mW.

On retrouve bien le fait que les intensités sont plus élevées à 35 mW, par rapport à 5 mW. En effet, le maximum d'intensité s'élève à 2000 à 35 mW, alors qu'il n'atteint que 1050 à 5 mW (unités arbitraires).

Références Bibliographiques

- [1] L. Cognet, C. Tardin, D. Boyer, D. Choquet, P. Tamarat, and B. Lounis. Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells. *PNAS*, 100 :11350–11355, 2003.
- [2] Grégory Giannone, Eric Hosy, Florian Levet, Audrey Constals, Katrin Schulze, Alexander I. Sobolevsky, Michael P. Rosconi, Eric Gouaux, Robert Tampé, Daniel Choquet, and Laurent Cognet. Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living at ultra high density. *Biophysical Journal*, 99 :1303–1310, 2010.
- [3] Grégory Giannone, Eric Hosy, Jean-Baptiste Sibarita, Daniel Choquet, and Laurent Cognet. High-content super-resolution imaging of live cell by upaint. *Methods in Molecular Biology*, 2013.
- [4] Bo Huang, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biochem.*, 78 :993–1016, 2009.
- [5] Marisa L. Martin-Fernandez and David T. Clarke. Single molecule fluorescence detection and tracking in mammalian cells : The state-of-the-art and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 :14742–14765, 2012.
- [6] Tufts University) Sergio Fantini’s Group (Department of Biomedical Engineering. Near-infrared spectroscopy for the study of biological tissue.
- [7] Russel E. Thompson, Daniel R. Larson, and Watt W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical Journal*, 82 :2775–2783, 2002.
- [8] M.A. van Dijk, A.L. Tchebotareva, M. Orrit, M. Lippitz, S. Berciaud, D. Lasne, L. Cognet, and B. Lounis. Absorption and scattering microscopy of single metal nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8 :3486–3495, 2006.