



HAL
open science

Développement de substrats actifs et d'une méthode d'analyse de FRET quantitative pour décoder la mécanotransduction

Alexis Coullomb

► **To cite this version:**

Alexis Coullomb. Développement de substrats actifs et d'une méthode d'analyse de FRET quantitative pour décoder la mécanotransduction. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAY044 . tel-02012587

HAL Id: tel-02012587

<https://theses.hal.science/tel-02012587>

Submitted on 8 Feb 2019

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Physique pour les Sciences du Vivant

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Alexis COULLOMB

Thèse dirigée par **Aurélié DUPONT**, CNRS

préparée au sein du **Laboratoire Interdisciplinaire de Physique**
dans **l'École Doctorale Physique**

**Développement de substrats actifs et d'une
méthode d'analyse de FRET quantitative
pour décoder la mécanotransduction**

**Development of active substrates and of a
quantitative FRET analysis method to
decode mechanotransduction**

Thèse soutenue publiquement le **16 octobre 2018**,
devant le jury composé de :

Monsieur NICOLAS BORGHI

CHARGE DE RECHERCHE, UNIVERSITE PARIS 7, Rapporteur

Monsieur MARC TRAMIER

INGENIEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION BRETAGNE PAYS
DE LOIRE, Rapporteur

Madame ISABELLE TARDIEUX

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION ALPES,
Examineur

Monsieur FRANCK RIQUET

PROFESSEUR, UNIVERSITE DE GAND - BELGIQUE, Examineur

Monsieur DOMINIQUE BOURGEOIS

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION ALPES, Président



Remerciements

Les résultats qui vont suivre ne sont pas seulement les fruits de mon travail, mais aussi des nombreuses collaborations et rencontres que j'ai eu la chance de faire au cours des ces 3 années de thèse. Si la thèse est l'occasion de se former sur des méthodes de pointe et de forger son esprit critique, j'en retiendrai surtout ces rencontres et moments vécus qui représentent à eux seuls un argument suffisant pour vivre une telle expérience.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, notamment Dominique Bourgeois pour avoir accepté de diriger ce jury. Merci à Isabelle Tardieux pour son point de vue et ses questions de biologiste, et pour sa grande bienveillance. Merci à Franck Riquet de s'être déplacé jusqu'à Grenoble malgré les "aventures" avec l'École Doctorale, et pour les discussions très intéressantes lors du séminaire la veille de la soutenance, certaines questions me trottent encore dans la tête. Un grand merci à mes rapporteurs, Marc Tramier et Nicolas Borghi, pour avoir accepté de lire méticuleusement ce manuscrit et y apporter des remarques et suggestions judicieuses, voire cruciales. Marc, en ce qui concerne la question du nom de la méthode, j'avais oublié de préciser que nous avons pensé à TARTI-FRET (The Absolute Reliable Three Images FRET), mais l'acronyme nous semblait tiré par les cheveux. . . Nicolas, merci pour tes nombreuses remarques, les analyses qui en découlent nous sont précieuses. Merci aussi de m'avoir accepté en stage de M2 (juste avant cette thèse donc !). Même si nous n'avons pas atteint nos objectifs scientifiques, j'en garde un excellent souvenir, tu as été un superviseur extrêmement attentif et gentil (et très cool).

Lors de ce M2, les enseignants nous ont donné de multiples conseils pour "bien choisir sa thèse". Ils ont insisté sur l'importance de l'ambiance dans l'équipe et des capacités relationnelles du potentiel futur directeur de thèse. Sur ce point là, Aurélie, je crois que je n'aurais pas pu mieux tomber. Merci de m'avoir accepté comme ton premier thésard, après seulement une journée de visite de labo (et quelques échanges de recettes de cuisine et de phrases cultes). Merci surtout de t'être montrée aussi attentive, tu as mis la priorité sur ma formation et l'avancement de mon projet, même si repoussais sans cesse ces échéances pourtant judicieusement placées (en même temps elles ne voulaient pas se transfecter ces cellules !). Merci pour la confiance que tu m'as accordée, et pour toutes ces discussions sur le féminisme, la bonne chère et tant d'autres. Je te souhaite toute la réussite possible.

De nombreux résultats ici n'auraient pas pu être obtenus sans nos collaborateurs. Je tiens donc à remercier les Néeliens Thibaut Devilliers, Nora Dempsey et Mario Fratzl sans qui nous continuerions à couper des cordes de guitare pour les incruster dans nos substrats actifs. Merci également au Professeur Don C. Lamb, qui nous a apporté son expertise sur la fluorescence tout au long de se projet, et un grand merci à son ancien doctorant Fabian Wehnekamp, qui a créé le programme nous permettant de contrôler nos instruments, et sans lequel nous n'aurions pas pu réaliser ces expériences.

En tant que physiciens de formation jouant avec des cellules, il nous arrive de commettre des énormités biologiques ou d'être coincés devant des manips de base pour un "vrai de vrai" biologiste. Heureusement, nos collègues de l'IAB arrivent à la rescousse. Un énorme merci, que dis-je, des **HOURRAS** pour Christiane, l'héroïne de ma 3^e année de thèse, dont le travail ne se voit malheureusement pas dans ce document mais avec qui j'ai pourtant passé des mois à purifier de l'ADN et quelques protéines fluo avec succès (oh les jolis tubes !), et quelques autres protéines sans jamais y arriver. Merci Christiane d'avoir passé tout ce temps à m'expliquer les détails obscurs des protocoles et tes recettes ultra-optimisées. Merci aussi à Olivier pour m'avoir formé sur la transfection des cellules, protocole essentiel pour la partie FRET, et sur

les différents conseils que tu m'as donné par la suite. Merci également à Cyril pour ton intérêt pour mon travail et les discussions passionnantes sur les réseaux de signalisation. Merci Mathilde pour ta bonne humeur et ta motivation malgré les plâtres récurrents que nous avons essayés avec tes cellules et notre microscope. Vraiment, tu mérites de réussir et de t'éclater pendant ta thèse.

La partie très exploratoire concernant les ultrasons a été soutenue par l'expertise de Philippe Marmottant et Pierre Thibault, un grand merci à eux pour leur disponibilité et les longues séances de vulgarisation des phénomènes acoustiques. Mention spéciale à Ianis, qui a toujours pris le temps de répondre en détail à mes nombreuses questions, alors qu'il rédigeait son manuscrit, désolé encore pour ce café. . .

Merci à Noël pour sa disponibilité et ses conseils concernant la purification de protéines et d'ADN, et merci à Salima d'avoir organisé ces supers séances de tutos Python au LIPhy, j'espère que ça va continuer ! Perdu dans les méandres de l'administration, combien de fois ai-je été sauvé par l'équipe du secrétariat ? Merci particulièrement à Nadine et Chantal qui résolvent toutes les situations et se montrent patientes face aux thésards qui n'intègrent pas les subtilités des marchés et autres joies.

J'en viens maintenant aux membres de l'équipe MOTIV, grâce à qui le mot *équipe* a pris tout son sens pour moi. C'est d'ailleurs plus l'impression de mini-famille que de simple équipe de recherche que j'en ai eue, avec ses habituelles petites accroches et ses beaux moments vécus ensemble, et c'est cœur serré que j'écris ces lignes. Je regrette que la langue française n'ait pas de mot plus fort que merci pour l'adresser à Cécile. Tous ces moments d'espoir, d'échec et de joie devant des piliers qui bougent de 1 pixel ("non mais il bouge là non ?"), ou à chanter la crème de la musique française en collant des feuilles de plastique sur du PDMS sans faire de bulle, j'en garderai un souvenir impérissable. Merci Alain pour ta bonne humeur inébranlable, le chauffage naturel que tu prodigues à notre bureau si bien isolé, et ta curiosité sans limite. Merci de récupérer le bébé, et pour toutes ces discussions passionnantes, elles me manqueront. Merci également à Manon, qui a passé des journées entières de stage dans la salle du microscope pour explorer toutes les combinaisons possibles d'acquisition des cellules fluo. J'ai pu énormément avancer grâce à cela, même si j'ai souffert de l'entendre parler de la Calédonie, son soleil et ses plages à côté de son lycée. Philippe, je ne sais pas si je te remercie plus pour ton aide si précieuse durant ma thèse ou pour toutes ses discussions, blagues, conseils, sessions "le saviez-tu ?" et finalement pour la personne que tu es. De ta culture sans borne j'en retiendrai quelques sages dictons et promesses, la prochaine fois que je viens, c'est avec un OS de téléphone libre et on se fait cette dégustation dans ton magasin de vin et de bière ! Un immense merci à Irène, magicienne de la microscopie (certains disent qu'on est dans le Irène Institut !). Ton expertise nous a été essentielle, et ton rire égaye les journées les plus grises de Grenoble. Merci Bertrand, d'abord pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse officiel pour la première année, et surtout pour les discussions que nous avons eues, tant scientifiques que concernant mon avenir. C'est notamment grâce à toi que j'ai pu autant changer d'avis sur les entreprises et me tourner vers d'autres horizons toujours passionnants. Thomas, c'est grâce à toi que j'ai revu complètement le montage pour les ultrasons, après cette discussion chez Martial à 2h du matin. Suite à ça nous avons enfin obtenu des choses intéressantes. Merci pour tous tes conseils, ton sens de l'organisation collective et ton humour décalé (en fait je n'arrive pas à le qualifier). Merci du fond du cœur Martial pour tes conseils, tes blagues, ta bonne humeur et tes initiatives comme l'International Cooking Contest. Je n'aurai pas suivi tes derniers conseils en matière d'introduction de soutenance de thèse, assez "originaux", mais tu sais toute l'estime que je te porte. Merci aussi à Aurélien, chez qui j'allais toquer lorsque j'avais une question en Python ou pour emprunter sa pompe. Tu as un esprit d'équipe inégalable et les discussions avec toi le midi ont été sources de nombreuses recherches culturelles sur internet. Merci pour toute ton aide Monika lorsque je me battais pour observer des ondes stationnaires sur différents matériaux. Je n'aurais pas pu avancer autant sans tes conseils et ton expérience. Enfin, Katha, Tomas, Vanni et Elisa, merci infiniment pour les dons de cellules, de matériel biologique, et tout le temps que vous avez passé à m'aider ! C'était vraiment chouette de passer dans votre bureau, et j'espère qu'on se reverra.

La vie de thésard ne se conçoit pas sans ses congénères, les autres thésards, et je suis heureux d'avoir gagné quelques amitiés et d'avoir pu partager avec eux autant de bons moments entre tarot, bières, débats politiques et d'autres plus incongrus. Merci à tous les anciens, dont Léo et Rachel, qui ont marqué les soirées de leur humour décapant. Merci à Thomas, toujours prêt à héberger un thésard en situation de

crise ou à lui apprendre le snowboard, à Nico qui m'a fait découvrir les univers du houblon et du piment, à Loïc pour ces incroyables discussions et à ses argumentations au débit ininterrompu, et à Sylvain et sa toison d'or pour (aussi) héberger les thésards sans abris et sa passion partagée des bonnes choses. Enfin, je ne saurais exprimer toute ma gratitude et ma profonde amitié envers Léo (le grand) et Romain, vous m'avez apporté chacun à votre manière énormément de choses, et c'est le cœur en joie que je vous remercie pour tous ces moments partagés.

Merci aussi à la bande des médecins, Lulu, Claire, Gabriel, Louise et Romane pour m'avoir fait découvrir le merveilleux monde des pathologies. Merci pour ces soirées au Dr D et celles de révision, ça a fait de Grenoble un beau foyer. Yannis et Gabrielle, merci du fond du cœur pour votre hospitalité et votre tolérance à l'enfermement du colloc pour cause de travail à finir, sans ça je ne sais pas comment j'aurais fait ! Merci Olivier, Thibaut et Gilles pour votre amitié sans faille malgré les occasions de se voir qui se sont faites rares.

Enfin, merci papa et maman. Vous m'avez appris le bon sens paysan, la curiosité, et que rien n'est plus important que l'amour, et ces 3 idées m'ont façonné. Merci pour votre soutien et pour le modèle que vous êtes, je suis fier d'être votre fils. Merci à mes sœurs Aude et Anne-Laure et au reste de la famille pour leur soutien, vous voir si nombreux pour ma soutenance m'a fait chaud au cœur ! Merci également à ma 2nde famille, les Aïtout, pour leur accueil et leur soutien pendant cette thèse. Un énorme merci à Bénédicte pour avoir passé tout un week-end à préparer avec sa fille un buffet mémorable pendant que j'apportais les dernières modifications à ma soutenance.

Camille, merci pour ça mais pour tant d'autres choses aussi. Pour ton soutien sans lequel cette dernière année aurait été toute différente, pour ta sagesse qui relève la moyenne des *chatis*. Pour partager ta vie avec moi.

Résumé

Les cellules vivantes sont capables de réagir aux signaux mécaniques tels que la rigidité de la surface sur laquelle elles adhèrent, les forces de tractions ou de compressions auxquelles elles sont soumises, le flux de liquide à la surface de leur membrane ou encore la géométrie de leurs adhérences ou de leur forme globale. Ces signaux influent sur des processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la migration et la mort cellulaire. Ces processus sont finement régulés par des réactions biochimiques qui forment un réseau de signalisation. La mécanotransduction est la traduction du signal mécanique en signal biochimique.

C'est dans le but d'étudier la mécanotransduction que nous avons étudié l'utilisation d'ultrasons pour stimuler mécaniquement les cellules à des fréquences temporelles et spatiales relativement élevées. De nombreux montages expérimentaux et de nombreuses voies ont été considérées dans cette partie très exploratoire. Nous en retenons finalement des pistes prometteuses pour la continuation future de ce projet.

Nous avons par ailleurs développé ce que nous nommons des substrats actifs, qui nous permettent de contrôler à la fois spatialement et temporellement la stimulation mécanique appliquée à des cellules vivantes. Ces substrats actifs consistent en des micropiliers de fer incrustés dans un élastomère peu rigide (PDMS) et manipulés par deux électroaimants. Nous pouvons contrôler dynamiquement le déplacement des piliers qui vont déformer localement et de manière continue la surface. Cette déformation va ensuite déformer en traction ou en compression les cellules vivantes étalées sur la surface à proximité. En employant des marqueurs fluorescents nous pouvons réaliser de la Microscopie de Forces de Traction et surveiller la contrainte appliquée par les piliers aux cellules à travers la surface de PDMS, et nous pouvons étudier la réponse mécanique des cellules. De plus, ces substrats sont compatibles avec la microscopie de fluorescence en cellule vivante, ce qui rend possible l'observation de la réponse cellulaire au niveau morphologique (forme des adhérences focales, activité protrusive, ...) et surtout biochimique.

En effet, pour étudier la réponse biochimique des cellules après une stimulation mécanique, nous observons par microscopie de fluorescence des biosenseurs portant des paires de fluorophores donneur/accepteur. Ces biosenseurs nous permettent d'observer l'activité de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire en calculant l'efficacité de Transfert d'Énergie Résonnant de Förster (FRET) de ces biosenseurs. Pour ce faire, les échantillons sont illuminés alternativement aux longueurs d'ondes d'excitation des fluorophores donneurs puis accepteurs. Le signal de fluorescence est collecté simultanément dans un canal d'émission du donneur et un canal d'émission de l'accepteur. Une grande partie de ma thèse a été consacrée à la mise au point d'une méthode quantitative pour analyser les images de fluorescence afin de mesurer une efficacité de FRET qui ne dépende pas de facteurs expérimentaux ni de la quantité de biosenseurs présents dans les cellules. Nous évaluons alors les différentes méthodes pour déterminer les facteurs de correction répandus corrigeant le débordement de spectre du donneur dans le canal accepteur et l'excitation directe de l'accepteur à la longueur d'onde d'excitation du donneur. Pour obtenir des mesures plus quantitatives, nous avons mis au point une nouvelles méthode pour déterminer 2 facteurs de correction supplémentaires. Nous comparons cette méthode à la seule préexistante et évaluons l'influence des paramètres de traitement des images sur les valeurs d'efficacité de FRET mesurées.

Abstract

Living cells can react to mechanical signals such as the rigidity of the surface they adhere on, the traction or compression forces applied on them, the liquid flow at their membrane surface or the geometry of their adhesions or of their overall shape. Those signals influence cellular processes such as proliferation, differentiation, migration or cell death. Those processes are tightly regulated by biochemical reactions that constitute a signaling network. Mechanotransduction is the translation of the mechanical signal into the biochemical one.

In order to study mechanotransduction, we have considered the use of ultrasound to mechanically stimulate cells at relatively high temporal and spatial frequencies. Numerous setups and options have been considered in this very exploratory project. Finally, we will retain some promising leads for the continuation of this project.

We have also developed what we call active substrates that allow us to control both spatially and temporally the mechanical stimulation on living cells. Those active substrates consist of iron micropillars embedded in a soft elastomer and actuated by 2 electromagnets. We can control dynamically the displacement of the pillar that will deform locally and continuously the surface. This deformation will then deform in traction or in compression the living cells spread on the surface nearby. Thanks to fluorescent trackers we can perform Traction Force Microscopy and monitor the stress applied by the pillars to the cells through the PDMS surface, and we can look at the mechanical response of the cells. Moreover, those substrates are compatible with live cell fluorescence microscopy, which makes possible the observation of the cellular response at the morphological level (focal adhesions, protrusive activity, ...) and most importantly at the biochemical level.

Indeed, in order to study the cellular biochemical response after a mechanical stimulation, we use fluorescence microscopy to observe biosensors containing pairs of donor/acceptor fluorophores. Those biosensors allow us to monitor the activity of proteins implied in cellular signaling by computing the Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) efficiency of those biosensors. To do so, samples are alternatively excited at donor and acceptor excitation wavelengths. The fluorescence signal is then simultaneously measured in donor and acceptor emission channels. A substantial part of my thesis has been dedicated to the development of a quantitative method to analyze fluorescence images in order to measure FRET efficiencies that do not depend on experimental factors or biosensors concentration in cells. We assess different methods to compute standard correction factors that account for spectral bleed-through and direct excitation of acceptors at donor excitation wavelength. To obtain more quantitative measurements, we have developed a new method to compute 2 additional correction factors. We compare this method with the only one preexisting, and we assess the influence of image processing parameters on FRET efficiency values.

Table des matières

Introduction	13
I Stimulation mécanique des cellules	16
1 Substrats actifs	17
1.1 Présentation de la publication	17
1.2 Publication	21
1.3 Discussion	35
2 Un autre type de stimulation : les ondes acoustiques	37
2.1 Motivations, brève revue des effets des ultrasons	37
2.2 Montages expérimentaux et limites	38
II FRET quantitatif	46
3 État de l’art et présentation générale du FRET	48
3.1 Introduction à la fluorescence	48
3.2 Principe du FRET	51
3.3 Les applications en biologie	52
3.4 Différentes méthodes pour mesurer le FRET, limitations et motivations pour aller plus loin	57
4 Live Cell ALEX FRET	64
4.1 Montage expérimental et interfaçage	64
4.2 Analyse de données ALEX	69
4.3 Les équations de l’ALEX FRET	70
4.4 Mise en pratique	73
4.5 Test de notre méthode	85
Conclusion et perspectives	102
A Protocoles expérimentaux	105
A.1 Protocoles de transfection	105
A.2 Protocole de micro-impression de protéines sur PDMS	106
B Suppléments mathématiques sur le FRET	108
B.1 Équation d’efficacité de FRET d’après l’énergie absorbée	108
B.2 Équivalence mathématiques des méthode de détermination de γ^M et γ^X	108
B.3 Incertitudes de mesure sur E et méthodes alternatives de calcul de E	112

C Propriétés des fluorophores et caractéristiques du montage expérimental	119
C.1 Propriétés des fluorophores et spectres des filtres	119
C.2 Caractéristiques de la caméra et du laser	121

Table des figures

1	Mécanotrasduction au niveau des jonctions d'adhérence et des adhérences focales	14
1.1	Substrats avec billes ou piliers magnétiques	19
1.2	Répartition spatiale de billes micrométriques fluorescentes	20
1.3	Effet du plasma sur le PDMS	35
1.4	Patronage micrométrique	36
2.1	Montage à ultrasons préliminaire	37
2.2	Premiers montages à ultrasons	39
2.3	Montage avec résonateurs secondaires	40
2.4	Les 2 stratégies pour obtenir un substrat dans une chambre macrofluidique	41
2.5	Assemblage de prototypes de chambres	42
2.6	Montage final de la chambre à ultrason	43
2.7	Billes fluorescentes incrustées à la surface d'un substrat en PAA	43
2.8	Déphasage des ondes stationnaires croisées	44
2.9	Montage avec lamelles piézoélectriques	45
3.1	Diagramme général de Jablonski	48
3.2	Principe de Franck-Condon et états vibrationnels	49
3.3	Diagramme de Jablonski et désexcitation d'un fluorophore	50
3.4	Efficacité de FRET et distance de Förster	52
3.5	Senseur de force TSMOD inséré dans la séquence d'une cadhérine	53
3.7	Conformations possibles de l'apolipoprotéine apoA-I	54
3.8	Activation de la kinase Src	55
3.9	Biosenseur d'activité de la kinase Src	55
3.10	Le cycle d'activité des GTPases et un senseur d'activité	56
3.11	Données de graphe de phase (phasor plot)	58
3.12	Spectres de Cerulean et Venus avec débordement de spectre et excitation directe	60
3.13	Montage expérimental de l'ALEX FRET en molécule unique	62
3.14	Histogrammes 2D E/S	62
4.1	TIRF standard et sur PDMS	64
4.2	Montage optique	65
4.3	L'interfaçage avec les modules d'acquisition	67
4.4	La maître noir	73
4.5	La Plage de Lumière Uniforme	74
4.6	L'alignement numérique des canaux	74
4.7	L'alignement des canaux sur des images de billes micrométriques	75
4.8	Histogrammes du fond de 2 canaux différents après soustraction du maître noir	75
4.9	Suppression du noir et du bruit de mesure	76
4.10	Autofluorescence des cellules et tri par stœchiométrie	77
4.11	Les méthodes de détermination de γ^{BT}	79

4.12	Effet des paramètres d'acquisition sur les distributions de γ^{BT} et γ^{DE}	80
4.13	Filtrage spatial par convolution avec un noyau et ajustement de polynôme	81
4.14	Étude des filtres spatiaux et effets sur les valeurs de γ^{BT} et γ^{DE}	82
4.15	Représentation 3D des valeurs d'intensité d'une cellule	83
4.16	La descente de gradient	84
4.17	Les standards FRET	86
4.18	Nuage de points de mesure et vérification des facteurs de correction	87
4.19	Mesures d'efficacité de FRET	88
4.20	Nuages de points de mesures avec CTV	89
4.21	Histogramme de E pour une cellule et pour l'ensemble des cellules d'un standard	91
4.22	Comparaison de 2 méthodes de détermination de γ^M et γ^X	91
4.23	Effet du filtrage spatial sur les mesures de E et S	93
4.24	Sélection des pixels d'intensité supérieure au 70 ^e percentile	94
4.25	Une cellule de très haute intensité de fluorescence présente un très haut E	96
4.26	Effets de la variations de γ^{BT} et γ^{DE} sur les coefficients directeurs de E en fonction de I_{AA}	98
4.27	Évolution de E et S avant et après le seuil d'intensité dans le canal I_{AA}	99
4.28	Histogramme 2D de E et I_{AA} de toutes les valeurs des cellules C17V	99
4.29	Histogramme 2D compressé	100
4.30	Image et profil de variation d'intensité au sein d'une cellule	100
B.1	Histogramme des intensités dans une zone de fond (en dehors d'une cellule) pour les 3 canaux	113
B.2	Histogramme de $1/S$ en fonction de E et ajustement de droite pour la méthode LEE	115
B.3	Cartes d'incertitudes sur E et histogramme de différences d'incertitude	116
C.1	Spectres des fluorophores Cerulean et Venus	119
C.2	Spectres des fluorophores Cerulean et Venus ainsi que des plages effectives d'excitation et d'émission	120
C.3	Spectre des filtres du cube de fluorescence	120
C.4	Spectre des filtres du séparateur chromatique	121
C.5	Réponse spectrale de la caméra	121
C.6	Spécifications électroniques de la caméra	122
C.7	Puissance du laser selon le temps de chauffe et les commandes logicielles	123

Introduction

Les cellules vivantes sont capables de sentir des signaux mécaniques et d'y réagir. Ces signaux peuvent correspondre à la rigidité du substrat sur lequel les cellules adhèrent, aux forces de traction ou de compression qui s'exercent sur les cellules, à la géométrie de l'environnement où elle peuvent adhérer et migrer, ou encore à un flux qui exerce des forces de frottement au niveau de leur membrane. Par exemple des travaux pionniers ont montré que les cellules migraient préférentiellement vers les zones de plus haute rigidité [1], ou encore que des cellules souche se différenciaient en cellules nerveuses, de muscle ou d'os lorsqu'elles étaient cultivées sur des substrats de rigidité croissante [2]. RUIZ *et al.* [3] ont par ailleurs mis en évidence comment la forme d'un agrégat cellulaire produisait des gradients de forces internes qui dirigeaient la différenciation des cellules en fonction de leur position dans l'agrégat. La présence d'un flux entraîne couramment les cellules dans le sens du courant [4], mais certaines cellules comme les lymphocytes T peuvent sentir et remonter le sens du courant [5], de même que les cellules endothéliales qui peuvent aussi s'aligner parallèlement ou perpendiculairement à la direction du courant selon sa vitesse [6]. Ces réponses des cellules à un signal mécanique nécessitent la traduction du signal mécanique en signal biochimique, c'est ce processus de traduction qu'on nomme *mécanotransduction*.

De nombreux composants et mécanismes sont impliqués dans la réponse cellulaire à une stimulation mécanique. Certains canaux ioniques sont sensibles aux forces de tension membranaires qui peuvent favoriser leur état ouvert [7] dans lequel les canaux sont perméables aux ions, permettant la conversion rapide d'un signal mécanique en signal électrochimique. Les canaux ioniques emblématiques de ce phénomène appartiennent à la famille *Piezo* [8], mais d'autres familles de protéines telles que les *transmembrane channel-like* (TMC) jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal acoustique en signal électrochimique dans les cellules auditives [9]. Par ailleurs, la membrane des cellules est décorée par un ensemble de molécules qui forment le *glycocalyx*. Ce glycocalyx est composé de glycoprotéines (protéines liées à des oligosaccharides) et de protéoglycanes (protéines liée à des glycoaminoglycanes, sucres non ramifiés). Le glycocalyx joue un rôle dans la protection mécanique des cellules, dans le complexe majeur d'histocompatibilité, et il permet de transmettre les contraintes de cisaillement du fluide environnant à la membrane et au cytosquelette d'actine [10, 11]. Le *cil primaire*, présent chez quasiment toutes les cellules eucaryotes, est un autre moyen de sentir le flux environnant [12]. Ce cil est un nœud important du réseau de signalisation cellulaire, notamment pour les voies de signalisation de hedgehog ("hérissou") et de Wnt [13]. Il est responsable par exemple de la modulation de la prolifération et de la différenciation des cellules mésenchymateuses suite à une contrainte de cisaillement cyclique [14]. Dans les tissus, les cellules sont liées entre elles par la *matrice extra cellulaire* (ECM) composée notamment de protéines telles que le collagène, l'élastine et la fibronectine, et de polysaccharides comme l'acide hyaluronique. La composition de l'ECM détermine sa rigidité, qui est un signal mécanique connu pour influencer sur la migration [15], la prolifération [16] et la différenciation cellulaire [2]. L'ECM permet en outre de transmettre des forces entre cellules qui ne sont pas directement en contact [17], permettant par exemple aux cellules cardiaques de se contracter de manière synchronisée [18]. La transmission des forces entre l'ECM et une cellule se fait via ses *adhérences focales* (FA), qui sont des complexes protéiques transmembranaires jouant un rôle majeur dans la mécanotransduction (figure 1). Elles sont composées d'intégrines, protéines transmembranaires capables de se lier à l'ECM, dont la partie cytoplasmique se lie directement ou indirectement à de nombreux ligands. Parmi ces ligands se trouvent les protéines adaptatrices *vinculine* et *taline* qui relient les intégrines aux fibres de stress d'actine. Plus précisément, une taline peut se lier à la sous unité β d'une

intégrine et au cytosquelette d'acto-myosine, qui a tendance à générer des forces de traction. Lorsque c'est la cas, la force est transmise à travers la taline et l'intégrine jusqu'à l'ECM, qui résiste mieux à la déformation si l'ECM est rigide. C'est alors la taline qui se déforme le plus [19], en s'ouvrant et en découvrant des *sites cryptiques* auxquelles des vinculines peuvent se lier [20, 21]. Ces vinculines peuvent à leur tour se lier à de nouveaux filaments d'actine, renforçant la transmission des forces entre l'ECM et le cytosquelette d'actomyosine [22]. Les intégrines sont aussi capables de recruter des protéines de signalisation et activer des voies de signalisation [23]. La *paxiline*, en se liant à une intégrine, recrute des kinases d'adhérence focale (FAK) ainsi que des tyrosines kinases *Src* (voir page 54 pour le fonctionnement de ces protéines). Lorsque ces dernières phosphorylent la paxiline, d'autres protéines se lient à la paxiline et sont à leur tour phosphorylées par *Src* [24]. L'ensemble de ces molécules permet alors d'activer la voie de signalisation *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) [25] qui module l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation [26]. Des mécanismes similaires ont lieu au niveau des *jonctions d'adhérence* (JA). Ces JA sont, comme les FA, des complexes moléculaires transmembranaires qui permettent aux cellules d'adhérer non pas à l'ECM comme c'est le cas pour les FA, mais aux cellules voisines en se liant à leurs JA (figure 1). Ces JA sont composées de cadhérines, des protéines transmembranaires qui se lient aux cadhérines des cellules voisines lorsqu'elles sont rigidifiées en présence de Ca^{2+} , d'où le nom. Similairement aux intégrines, la partie cytoplasmique des cadhérines peut se lier à un nombre important de ligands, comme la protéine adaptatrice β -caténine, sur laquelle se lie l' α -caténine [27]. Cette dernière est une longue molécule repliée sur elle-même en absence de force de traction qui se lie à un filament d'actine à son extrémité. Lorsque le filament exerce une force de traction, comme la taline, l' α -caténine se déplie et expose des sites cryptiques auxquels vont se lier des vinculines, qui lient de nouveaux filaments d'actine, renforçant la JA [28, 29]. Ces filaments d'actine sont par ailleurs aussi des mécanosenseurs, puisqu'une force de compression entre les extrémités d'un filament provoque son flambage (torsion), qui confère au réseau d'actine une résistance à la compression, ou qui promeut la disruption des filaments [30, 31, 32]. Les changements de la structure du filament lors de la déformation modifie son affinité avec les protéines régulatrices de l'actine [33], et certaines de ces protéines sont connues pour être elles-mêmes mécanosensibles. C'est le cas par exemple de la formine, un homodimère ancré à la membrane qui allonge les filaments d'actine. Lorsque le filament est sous tension, la conformation de la formine lui permettant d'ajouter un monomère est favorisée, et la vitesse d'élongation du filament d'actine augmente [34].

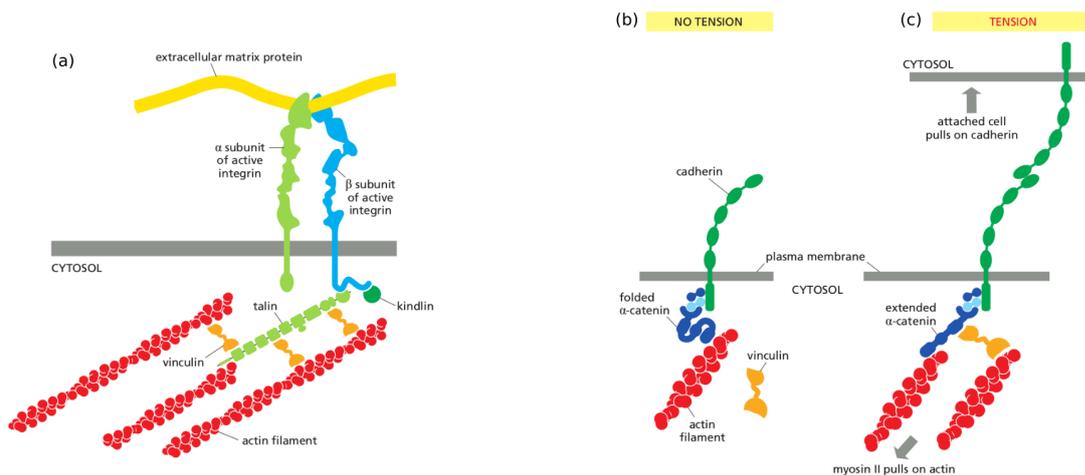


FIGURE 1 – Mécanotransduction au niveau des jonctions d'adhérence et des adhérences focales. (a) Le complexe intégrine / taline / vinculine relie l'ECM au filaments d'actine. (b) le complexe cadhérine / β -caténine / α -caténine relâché et (c) sous tension. Adapté de [35]

Le phénomène de réponse à un signal mécanique concerne aussi les plantes [36] et les bactéries [37], il prend effet à l'échelle des molécules jusqu'aux organes, et correspond à des réactions quasi-instantanées pour la déformation mécanique des protéines, ou qui s'étendent de la seconde pour la signalisation cellulaire à l'heure voire au jour pour des modifications à l'échelle d'un tissu ou d'un organisme [38]. Nous

venons de voir que différents mécanismes sont impliqués, comme le changement de conformation ou la modification chimique par (dé)phosphorylation d'une protéine, entraînant une cascade de signalisation pouvant modifier l'expression de gènes.

Il apparaît de plus en plus clair pour la communauté scientifique que les paramètres spatiaux et temporels des signaux mécaniques jouent un rôle déterminant dans la mécanotransduction, et que la réponse des cellules dépend de la coordination précise dans le temps et dans l'espace de l'activité des protéines impliquées dans la signalisation. TSUKADA *et al.* ont par exemple développé un algorithme pour quantifier la morphodynamique des cellules [39], c'est-à-dire les mouvements de leur membrane et leurs changements de forme. En utilisant des biosenseurs d'activité de 3 GTPases Rac1, Cdc42 et RhoA, ils ont pu établir des corrélations entre les mouvements locaux de membrane et l'activité locale de ces protéines. La coordination dans le temps et dans l'espace entre ces GTPases a elle été étudiée en détail par MACHACEK *et al.* [40] en observant simultanément l'état d'activité de deux protéines. Ils ont développé une méthode pour établir les relations entre activités de protéines observées lors d'expériences différentes. La coordination de l'activité des ces 3 protéines a ainsi pu être établie à l'échelle de la seconde et du micron au niveau des protrusions membranaires. Des vagues d'activité de Rac, une petite protéine G, ont aussi été observées [41]. Ces vagues d'activité se propageaient du front vers l'arrière de neutrophiles dont la migration était induite par chimiotaxie, et induisaient des oscillations locales d'activité de période temporelle définie. Grâce à la combinaison de l'optogénétique [42] et des biosenseurs FRET, il est maintenant possible d'observer le "flux d'information dans le réseau de signalisation" [43], et de perturber des nœuds de ce réseau de manière dynamique pour révéler la réponse des nœuds de signalisation en fonction de l'encodage spatial et temporel de l'information.

Pour étudier la mécanotransduction et l'influence de l'encodage spatiotemporel des signaux mécaniques sur la réponse des cellules, nous avons donc besoin de contrôler dans le temps et dans l'espace la stimulation mécanique, et de lire la réponse mécanique et biochimique en différents points du temps et de l'espace. Cette thèse s'articule donc en 2 grandes parties. La première partie de ma thèse décrit les substrats actifs qui nous permettent de stimuler mécaniquement les cellules. Cette stimulation est réalisée au moyen de micropiliers en fer doux intégrés dans un élastomère peu rigide (PDMS) et manipulés par deux électroaimants. Ces substrats nous permettent aussi de lire la réponse mécanique des cellules par microscopie de force de traction (TFM). La TFM est réalisée en observant le déplacement de billes micrométriques fluorescentes incrustées à la surface des substrats. C'est lors de ma 1^{ère} année de thèse que j'ai soutenu Cécile Bidan, alors en post-doctorat dans l'équipe, dans le développement de ces substrats actifs. J'ai notamment travaillé sur la méthode pour incorporer des billes micrométriques fluorescentes à la surface des substrats, sur une méthode pour fixer des protéines d'adhérence selon des motifs micrométriques sur cette même surface, et sur l'interfaçage entre l'ordinateur, le microscope, le laser et la caméra. J'aborderai aussi l'étude des ultrasons pour stimuler les cellules à des fréquences plus hautes que ce que nous permettent les substrats actifs. J'ai mené ce projet très exploratoire en fin de 1^{ère} année, lorsque je portais le code d'analyse des images de fluorescence de Matlab vers Python. La seconde partie représente l'aboutissement de mes travaux de 2^{ème} et 3^{ème} années, qui ont été consacrées à la mise au point d'une technique de FRET quantitatif qui, alliée à l'utilisation de biosenseurs, nous permet d'étudier la réponse biochimique des cellules. Dans cette dernière partie, une nouvelle méthode de détermination des facteurs de correction est développée et comparée à une autre méthode. Enfin, l'influence des paramètres de traitement des données sur les facteurs de correction et les valeurs d'efficacité de FRET est étudiée pour ces 2 méthodes.

Première partie

Stimulation mécanique des cellules

Chapitre 1

Susbtrats actifs

1.1 Présentation de la publication

Brève revue des systèmes de stimulation mécanique

L'étude de la mécanotransduction a commencé en employant des substrats de différentes rigidité, mais de rigidité constante pour chaque substrat. Ce type d'expérience a permis d'étudier l'influence qu'un signal mécanique constant comme la rigidité de l'environnement pouvait avoir sur la locomotion des cellules et la dynamique de leurs adhérences focales (FA) [44], leur surface d'étalement [45], l'organisation de leur cytosquelette [46] ou encore la différenciation cellulaire de cellules souches mésenchymateuses (MSC) [2]. Des substrats dont la rigidité variait à une échelle sub-cellulaire ont eux permis de mettre en évidence le phénomène de durotaxie, c'est-à-dire la migration des cellules préférentiellement vers les zones de plus haute rigidité [1]. Des substrats de rigidité homogène ont alors été étirés pour étudier la réponse des cellules à un signal mécanique variant temporellement. Ce type de système a par exemple permis d'observer l'activation des kinases MAP dépendant des intégrines β_1 [47]. Ce type de système permet donc de délivrer une stimulation mécanique dynamique aux cellules, mais cette stimulation est globale : les cellules sont en effet uniformément déformées. Pour déformer localement les cellules, des pointes de microscopes à force atomique (AFM) ont été employées pour indenter la membrane d'ostéoblastes et observer un influx de calcium [48]. Des billes micrométriques sur lesquelles étaient greffées des protéines d'adhérence et manipulées par des pinces magnétiques ou optiques se sont révélées utiles pour étudier les protéines d'adhérence comme les intégrines β_1 et leur importance dans la formation des FA en réponse à une contrainte produite par l'environnement mécanique des cellules [49]. Si ces expériences se sont révélées cruciales pour la compréhension des interactions moléculaires au niveau de la membrane cellulaire, la très haute rigidité et la forme particulière des objets utilisés pour stimuler mécaniquement les cellules éloignaient de manière importante les conditions expérimentales des conditions physiologiques. KRISHNAN *et al.* proposèrent alors d'indenter non pas les cellules, mais le substrat sur lequel elles adhéraient [50]. Ils ont ainsi pu étudier la fluidisation des cellules suite à une stimulation mécanique comme mécanisme compensatoire au renforcement, ce qui permet aux cellules de maintenir leur homéostasie. Ils ont pu observer par ailleurs que la non-homogénéité de la déformation des cellules était essentielle à leur renforcement après leur fluidisation, alors qu'après une déformation homogène les cellules recouvraient leur niveau basal de contractilité. Enfin, des substrats composés de piliers en PDMS ou en PAA dont le déplacement était contrôlé par le couple ou le gradient de champ magnétique ont été proposés pour étudier la mécanotransduction. Ces piliers contenaient des nano-fils de cobalt [51], des nano-billes ferromagnétiques [52] ou une préparation de colloïdes super-paramagnétique [53]. Bien que ces outils permettent d'appliquer des déformations qui diffèrent au sein même de l'aire d'étalement d'une cellule, ces substrats présentent une surface discrète qui confine les adhérences et dont la topographie représente en soi un signal mécanique constant. Ce signal est connu notamment pour déclencher une réponse biochimique par la voie de signalisation de la kinase d'adhérence focale (FAK) [54].

Cahier des charges de nos substrats

Pour stimuler mécaniquement les cellules, nous voulions donc un système qui réponde à différents critères :

- La stimulation doit se faire via les adhérences focales naturellement produites par les cellules, et non par des adhérences créés par une bille rigide fonctionnalisée. La stimulation doit donc se faire par le substrat sur lequel elles adhèrent.
- La stimulation peut être contrôlée dynamiquement et modulée en amplitude.
- La stimulation est spatialement localisée à l'échelle de la cellule, c'est-à-dire qu'on peut stimuler une région de la cellule sans stimuler (ou très peu) une région voisine, ceci afin d'observer la propagation de l'information biochimique au sein des cellules.
- Ces 2 précédents points impliquent une surface plane du substrat pour éviter que la topographie ne produise un signal mécanique particulier constant et variant spatialement, qui confinerait ou favoriserait les adhérences dans des régions particulières par exemple.
- Le substrat doit être relativement peu rigide (50 kPa maximum), de sorte que sa rigidité ne soit un signal mécanique trop fort, et afin qu'il puisse aussi être déformé facilement par nous pour stimuler les cellules, et par les cellules pour que l'on puisse étudier leur réponse mécanique par TFM. Pour réaliser la TFM, il doit aussi être très peu visqueux.
- Enfin, le substrat doit être compatible avec la microscopie de fluorescence afin que l'on puisse étudier la réponse biochimique des cellules au moyen de biosenseurs FRET.

Le premier matériau envisagé a été le polyacrylamide (PAA), un hydrogel dont les faibles rigidités atteignables (environ 4 kPa) et sa compatibilité avec la microscopie de fluorescence en font un matériau de choix pour les expériences de mécanique cellulaire. L'expertise est par ailleurs présente dans notre équipe, nos collaborateurs maîtrisant le patronage micrométrique (micro patterning) de protéines d'adhérence et la microscopie de force de traction (TFM) qui permet de calculer les forces de traction exercées par les cellules sur un matériau élastique [55].

La Microscopie de Forces de Traction (TFM)

Pour mesurer des forces, il faut mesurer des déplacements. C'est le cas par exemple en une dimension lorsqu'un ressort est allongé : si on connaît sa constante de rigidité d'après une expérience de calibration, nous sommes en mesure de calculer la force à l'origine de l'élongation du ressort. La TFM repose ainsi sur des marqueurs fluorescents, tels que des billes micrométriques, qui sont inclus dans le substrat et dont la position est un indicateur de la déformation du substrat. Des images successives de ces marqueurs sont enregistrées, et le déplacement de chaque marqueur est déterminé par *Particle Image Velocimetry* (PIV). Une carte des déplacements peut être alors relativement facilement générée, la détermination des forces de traction à l'origine de ces déplacements est quant à elle un problème plus délicat. Pour un substrat dont l'épaisseur est suffisante (généralement 100 μm), le substrat est considéré comme un milieu élastique homogène isotrope semi-infini. La solution analytique de Boussinesq [56], qui permet de calculer le déplacement de la surface suite à une force ponctuelle exercée à cette surface, peut alors être utilisée. Les déplacements $\mathbf{d}(\mathbf{x})$ aux points \mathbf{x} dus aux forces $\mathbf{F}(\mathbf{x}')$ exercées aux points \mathbf{x}' sont donnés par :

$$\mathbf{d}(\mathbf{x}) = \int \mathbf{G}(\mathbf{x}, \mathbf{x}') \mathbf{F}(\mathbf{x}') \quad (1.1)$$

où \mathbf{G} est la fonction de Green qui caractérise la réponse mécanique de la surface à une force ponctuelle. Sur une grille discrétisant l'espace, l'équation s'écrit :

$$\mathbf{d}_i = \sum_j \mathbf{G}(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j) \mathbf{F}(\mathbf{x}_j) \quad (1.2)$$

Ici \mathbf{d} est mesuré grâce aux billes fluorescentes, et nous souhaitons connaître \mathbf{F} , il nous faut donc "inverser le problème". Ce produit de convolution devient une simple multiplication dans l'espace de Fourier, l'inversion est alors facilitée, et l'équation (1.2) devient :

$$\tilde{\mathbf{d}}(\mathbf{k}) = \tilde{\mathbf{G}}(\mathbf{k}) \times \tilde{\mathbf{F}}(\mathbf{k}) \quad (1.3)$$

où \mathbf{k} est un vecteur d'onde. Les forces de traction dans l'espace de Fourier peuvent alors être calculées selon

$$\tilde{\mathbf{F}}(\mathbf{k}) = \tilde{\mathbf{G}}(\mathbf{k})^{-1} \times \tilde{\mathbf{d}}(\mathbf{k}) \quad (1.4)$$

Le bruit de mesure sur les déplacements est amplifié dans l'espace de Fourier et peut devenir prépondérant, le problème devient *mal posé* (ill-posed) [57]. Pour y remédier, on peut régulariser le problème en coupant les hautes fréquences lors de l'analyse. En calculant la transformée de Fourier inverse de $\tilde{\mathbf{F}}(\mathbf{k})$ nous obtenons finalement les forces \mathbf{F} . En pratique nous avons adapté ce protocole pour réaliser de la TFM sur des cellules vivantes pendant leur stimulation mécanique. Nous avons pu suivre dans le temps les forces de traction exercées par une cellule seule, ou par un pilier seul. En revanche, le calcul des forces exercées à la fois par une cellule et par un pilier est un problème plus complexe sur lequel nous travaillons actuellement.

Développement des substrats magnéto-actifs

Avant la polymérisation du PAA, des billes micrométriques magnétiques sont mélangées avec la solution base + réticulant de PAA pour pouvoir déformer la surface du substrat, et des billes micrométriques fluorescentes sont ajoutées pour mesurer les déformations de la surface du substrat pour la TFM. Un aimant est placé sous le substrat pour que les billes magnétiques s'alignent selon les lignes de champ magnétique lors de la polymérisation du PAA. Lors de l'expérience, un électroaimant est utilisé pour générer un gradient de champ magnétique dans le but de déplacer les billes, qui déformeront alors la surface du substrat. Cependant ce système ne fonctionne pas, la force exercée sur les billes dépend de leur volume, qui est extrêmement faible, si bien que leur déplacement est imperceptible.

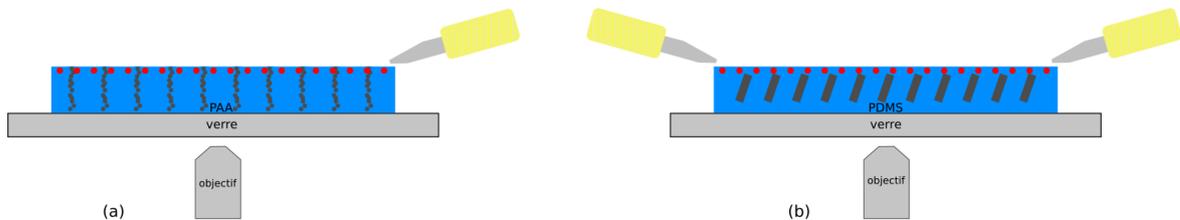


FIGURE 1.1 – (a) : Premier type de substrat en PAA contenant des billes fluorescentes (rouge) et des billes magnétiques (gris). Le gradient de champ magnétique généré par l'électroaimant ne suffit pas à déplacer les billes. (b) : substrats final en PDMS contenant des piliers ferromagnétiques. Le couple exercée par les 2 électroaimants permet de déplacer les piliers.

Nos collaborateurs Thibaut Devillers et Nora M. Dempsey à l'Institut Néel ont alors réalisé des micropiliers en fer doux, objets bien plus gros et ferromagnétiques que nous pouvions déplacer en utilisant non pas le gradient de champ magnétique, mais le couple que le champ magnétique exerce sur ces objets anisotropes. Cependant le réticulant du PAA oxydait fortement les piliers, et le PAA présentait quelques inconvénients pratiques comme la contrainte de devoir le conserver dans une solution tampon aqueuse, ou plus problématiques comme l'altération des propriétés mécaniques du substrats avec le temps. Nous avons donc opté pour un autre matériau, le polydiméthylsiloxane (PDMS), un polymère de la famille des silicones compatible avec la microscopie de fluorescence et pouvant atteindre de faibles rigidités (environ 10 kPa), bien que plus importantes que celles atteignables avec le PAA. Si les billes micrométriques fluorescentes dans la solution de PAA migraient aux interfaces, rendant le marquage de la surface du substrat aisé, les billes en solution dans le PDMS ne migraient pas du tout et restaient en volume,

rendant l'observation à travers le substrat impossible. Nous avons donc dû polymériser le PDMS sur une feuille de plastique sur laquelle des billes fluorescentes étaient déjà réparties. Différentes combinaisons de groupements chimiques à la surface des billes et de solutions pour les resuspendre ont été testées pour obtenir une répartition la plus homogène possible pour pouvoir réaliser la TFM. Finalement, ce sont des billes portant des groupements carboxyles dans une solution d'isopropanol qui ont donné les meilleurs résultats et qui sont employées dans la publication qui suit (figure 1.2).

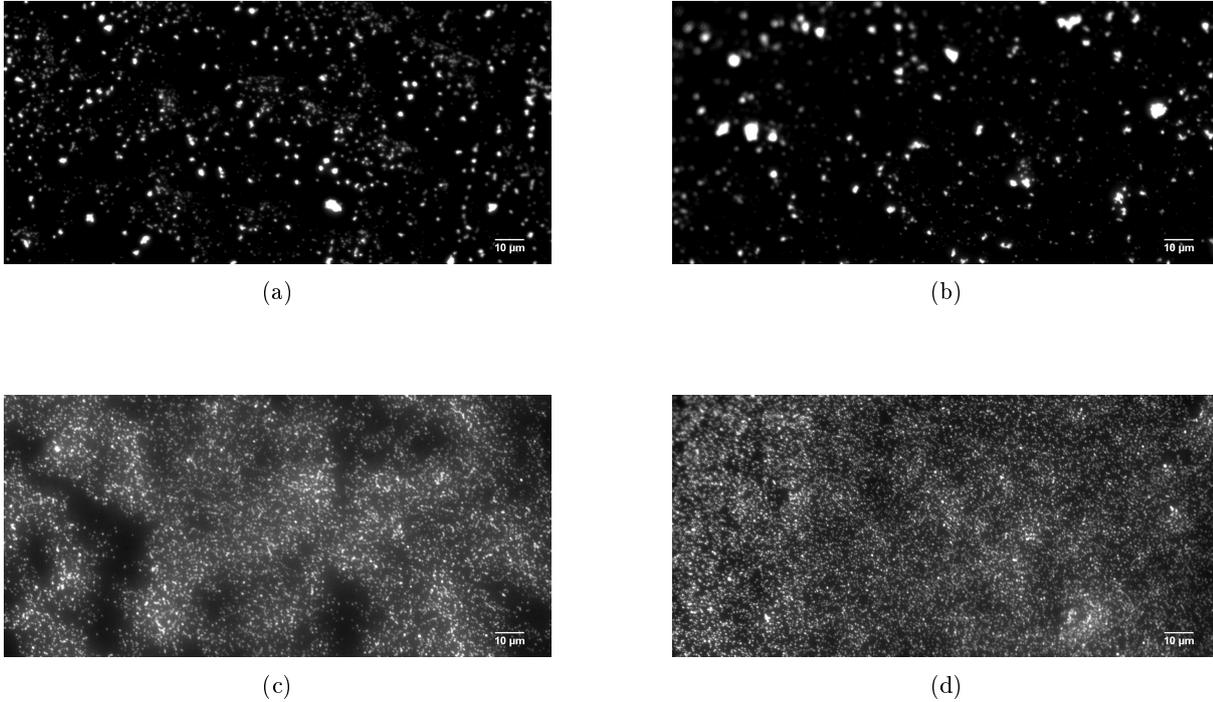


FIGURE 1.2 – Répartition spatiale de billes micrométriques fluorescentes portant différents groupements chimiques et resuspendues dans différentes solutions. 1^{ère} ligne : Billes portant des groupes amines incrustées à la surface d'une couche de PDMS après avoir été dispersées dans une solution d'éthanol (a) et d'isopropanol (b). 2nde ligne : Billes portant des groupes carboxyles incrustées à la surface d'une couche de PDMS après avoir été dispersées dans une solution d'éthanol (c) et d'isopropanol (d).

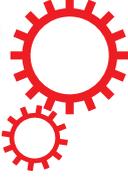
Cet article est un article de méthode, dans lequel nous présentons les substrats actifs et le protocole pour les réaliser. Cécile Bidan a eu une contribution majeure dans le travail qui va suivre, concernant notamment le concept, les nombreux essais, l'étude rhéologique et les expériences de biologie. J'ai pour ma part contribué à l'incrustation des billes fluorescentes à la surface de PDMS pour réaliser la TFM, à l'interfaçage entre les composants d'acquisition (programme LabVIEW et synchronisation caméra / laser / électroaimants), aux phases finales de l'assemblage PDMS + billes + piliers et à l'analyse de données. La fabrication de micropiliers et du patron magnétique ainsi que les simulations magnéto-mécaniques ont elles été réalisées par nos collaborateurs à l'Institut Néel.

Ces substrats remplissent le cahier des charge que nous nous étions fixé : ils permettent de déformer une surface continue et relativement peu rigide sur laquelle adhèrent des cellules, et cela de manière dynamique et locale, puisque l'amplitude de la déformation varie au sein d'une même cellule. Ils sont de plus compatibles avec la microscopie de fluorescence, et si les zones où se trouvent les piliers ne peuvent pas être imagées en fluorescence, cela ne pose pas de réel problème puisque au dessus des piliers la rigidité du PDMS augmente de manière importante, nous souhaitons donc observer des cellules qui se trouvent seulement à proximité de ces piliers.

Comme preuve de concept l'article présente des cellules que nous pouvons stimuler en traction ou en compression, et nous mesurons l'impact d'une telle stimulation sur les forces de traction exercées par une cellule sur le substrat. Nous observons enfin l'augmentation de l'activité protrusive pour une partie de la population de cellules stimulées mécaniquement.

1.2 Publication

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Magneto-active substrates for local mechanical stimulation of living cells

Cécile M. Bidan¹, Mario Fratzl^{2,3}, Alexis Coullomb¹, Philippe Moreau¹, Alain H. Lombard¹, Irène Wang¹, Martial Balland¹, Thomas Boudou¹, Nora M. Dempsey², Thibaut Devillers² & Aurélie Dupont¹

Received: 4 April 2017

Accepted: 27 December 2017

Published online: 23 January 2018

Cells are able to sense and react to their physical environment by translating a mechanical cue into an intracellular biochemical signal that triggers biological and mechanical responses. This process, called mechanotransduction, controls essential cellular functions such as proliferation and migration. The cellular response to an external mechanical stimulation has been investigated with various static and dynamic systems, so far limited to global deformations or to local stimulation through discrete substrates. To apply local and dynamic mechanical constraints at the single cell scale through a continuous surface, we have developed and modelled magneto-active substrates made of magnetic micro-pillars embedded in an elastomer. Constrained and unconstrained substrates are analysed to map surface stress resulting from the magnetic actuation of the micro-pillars and the adherent cells. These substrates have a rigidity in the range of cell matrices, and the magnetic micro-pillars generate local forces in the range of cellular forces, both in traction and compression. As an application, we followed the protrusive activity of cells subjected to dynamic stimulations. Our magneto-active substrates thus represent a new tool to study mechanotransduction in single cells, and complement existing techniques by exerting a local and dynamic stimulation, traction and compression, through a continuous soft substrate.

Living cells have a sense of touch, which means that they are able to feel, respond and adapt to the mechanical properties of their environment. The process by which cells convert mechanical signals into biochemical signals is called mechanotransduction. Defects in the mechanotransduction pathways are implicated in numerous diseases ranging from atherosclerosis and osteoporosis to cancer progression and developmental disorders^{1,2}. Since the 1990s, different static studies focused on mechanosensing have shown that cells can migrate along the rigidity gradient direction³ and that stem cells can differentiate *in vitro* according to their substrate's stiffness⁴ and geometry⁵. The interplay between a mechanical force and the reinforcement of cell adhesion has also been documented^{6,7}. In their natural environment, cells face a complex and dynamic mechanical environment. Cyclic strain can induce reorientation of adherent cells and affect cell growth depending on the temporal and spatial properties of the mechanical stimulation^{8–11}. The relevant timescales span from the milli-second for the stretching of mechanosensitive proteins, minutes for mechanotransduction signalling to hours for global morphological changes and even longer for adapting cell functions¹². Taken together, previous works have shown that cells are sensitive to both the spatial and temporal signatures of mechanical stimuli. In order to study mechanotransduction, it is thus essential to stimulate cells with mechanical cues controlled both spatially and temporally.

To address this topic, various methods have been proposed to exert experimentally controlled mechanical stimuli on adherent cells¹³. For instance, local stimuli were applied by direct contact with an AFM tip¹⁴, or with microbeads adhering on the cell membrane and actuated by magnetic¹⁵ or optical tweezers¹⁶. Although local enough to address the subcellular mechanisms of mechanotransduction, these methods involve intrinsic perturbations of the cell structure through mechanical interactions with a stiff object of fixed geometry. Cell stretchers were developed to induce mechanical stimulation via substrates of tunable substrate rigidity^{8,17}. Despite being more physiological and less invasive, such approaches only enable global deformation at the cellular scale. To

¹University Grenoble Alpes, CNRS, LIPhy, 38000, Grenoble, France. ²University Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, Institut Néel, 38000, Grenoble, France. ³University Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, G2Elab, 38000, Grenoble, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.D. (email: thibaut.devillers@neel.cnrs.fr) or A.D. (email: aurelie.dupont@univ-grenoble-alpes.fr)

get around this limitation, different geometries of vertical indenters were used to impose various deformation patterns on soft continuous cell substrates¹⁸. Surfaces made of micropillars that can be actuated with a magnetic field were proposed to apply local and dynamic mechanical stimuli^{19–21} but such discrete surfaces can affect the cellular behaviour^{22,23}.

Interestingly, only one of these systems was used to apply compression on single cells²¹. Yet, compressive stress is present in healthy tissue such as cartilage^{24,25} and is crucial during embryonic development²⁶. A compressive stress has also been shown to alter tumour growth and shape *in vitro*^{27–29} which seems relevant *in vivo* where tumours have to grow against surrounding tissue. Most of the studies on compressive stress have been carried out at the tissue or multicellular level. There is currently a lack of studies at the single cell scale, required to understand the possible differences in the mechanotransduction response between traction and compression stresses.

In this article, we propose a new method to produce deformable substrates that enable local and dynamic mechanical stimulation of cells plated on a continuous surface. These substrates consist of iron micro-pillars spatially arranged in a soft elastomer and locally actuated using a magnetic field generated by two electromagnets. Localized deformation of the substrate is controlled through the current input to the coils of the electromagnet and is quantified by tracking fluorescent markers incrusting under the surface of the elastomer. Traction force microscopy (TFM) is used to estimate the magnitude of stress generated by the pillar on the surface, which is in the range of the typical stress applied by contractile cells. Stress variation graphs demonstrate that cells spread on the magneto-active substrates can be mechanically stimulated both in tension and in compression. Live TFM of an exemplary cell stimulated by a magnetic pillar is also demonstrated. Finally, a proof of principle experiment on living cells is presented, showing increased protrusive activity of fibroblasts after a period of mechanical stimulation.

The present approach allows the stimulation of living cells with deformation patterns controllable in space and time. The magneto-active substrates can be deformed continuously at the single cell scale both in traction and compression while the inherent coupling with TFM allows to map the corresponding stresses. Thanks to their compatibility with standard fluorescence techniques, these magneto-active substrates pave the way to quantitative studies of intracellular biochemical responses resulting from controlled mechanical stimulations.

Methods

The active substrates developed in this work consist of an array of magnetic micro-pillars embedded in a continuous layer of soft polydimethylsiloxane (PDMS). Upon application of a magnetic field generated by two electromagnets, the micro-pillars are slightly tilted, resulting in the local deformation of the surface of the PDMS. This section describes the methods used to produce and characterize the micro-pillars and the substrates as well as the protocols to actuate the magneto-active substrates for live-cell experiments (Fig. 1).

Microfabrication of magnetic micro-pillars and magnetic templates. The micro-pillars consist of cylindrical silicon cores coated with a shell of soft magnetic iron (Fe). The silicon pillars were produced by etching the surface of a silicon wafer according to the following procedure. A network of 10 μm diameter disks of S1818 resin was produced on a silicon wafer by standard optical lithography. The silicon wafer was then etched over 30 μm using deep reactive ion etching (DRIE) following the Bosch process. The resin acts as a mask, as the much higher rate of etching of the silicon compared to the resin results in the formation of a dense array of silicon pillars which are 30 μm in height and 10 μm in diameter (Fig. 1A). The remaining resin is then dissolved in acetone, and the substrate cleaned with an O_2 plasma to remove residual organic traces.

The entire wafer surface was covered with a trilayer of Ta(100 nm)/Fe(10 μm)/Ta(100 nm) deposited by triode sputtering at room temperature under a base pressure of 10^{-6} mbar according to a procedure described elsewhere³⁰. The role of the tantalum (Ta) is to protect the iron from oxidation. The deposition by triode sputtering is relatively directive, so that the layer deposited on the top of the pillar and on the substrate between pillars is thicker than the layer deposited on the sidewalls of the pillars, as shown in the focused ion beam cut of a pillar in Fig. 1A. The pillars were mechanically detached from the substrate by swiping the surface of the patterned substrate with a glass coverslip within a bath of absolute ethanol. The micro-pillars from a known surface area were then air dried and stored in 5 mL tubes for later use.

Using the magnetic field gradient force, it is possible to organize the magnetic micro-pillars inside PDMS, to favour a particular spatial arrangement³¹. For this purpose, we produced a magnetic template using the approach described above (patterning of a Si substrate using DRIE followed by film deposition). As a template, 50 μm wide Si stripes separated by 500 μm were produced at the surface of a Si substrate and Ta(100 nm)/Fe(10 μm)/Ta(100 nm) was deposited on the substrate using triode sputtering. The application of an external magnetic field, produced by a macroscopic permanent magnet positioned below the template, served to magnetize the Fe micro-stripes. The strong magnetic field gradients produced by the micro-stripes of the template attract the magnetic micro-pillars, inducing an organization of the pillars along parallel lines in the PDMS. The stray field of the bulk magnet serves to align the long axis of the micro-pillars out of the plane of the substrate.

Magneto-active substrate fabrication. PDMS base and crosslinker from a standard kit (Sylgard 184, Dow Corning) were mixed in the respective mass proportions 40:1. To reach a softer but non-sticky matrix, 8 parts of silicone oil (50 cSt, 378356, Sigma) were added. After stirring thoroughly, the mixture was degassed for 20 min and then 1 mL of the mixture was added into tubes containing about $8 \cdot 10^4$ pillars. After stirring thoroughly in each tube, the PDMS/pillar mixtures were degassed for 1 h. Carboxylate-modified fluorescent beads (dark red FluoSpheres[®] 660/680, 0.2 μm , Life Technologies) were diluted 1:500 in isopropanol and sonicated for 3 minutes. 50 μL of bead solution were spread with a pipette tip on 35×35 mm squares of 50 μm thick polypropylene sheet (PP301351/1, Goodfellow), the excess was removed and the isopropanol was then air dried.

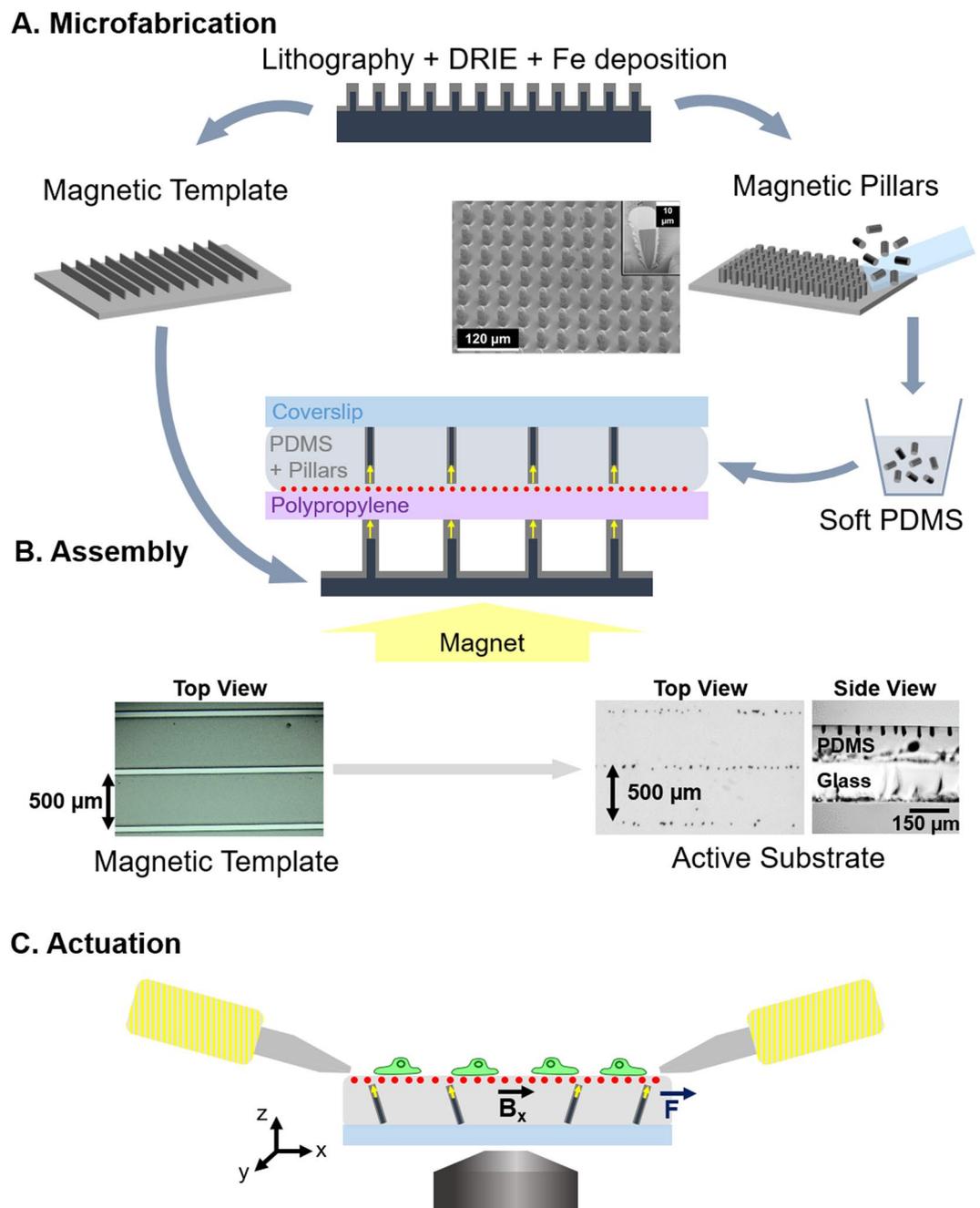


Figure 1. Experimental workflow. (A) Magnetic micro-pillars and template are made by optical lithography followed by deep reactive ion etching (DRIE) and iron deposition by sputtering. The magnetic pillars are mechanically detached from the wafer and mixed with soft PDMS prior to casting between a sheet of polypropylene coated with fluorescent beads and a coverslip. (B) The resulting sandwich structure is positioned on a magnetic template laid on a large permanent magnet, so as to align the pillars vertically (side view) and organize them according to the pattern of the template (top view). (C) After peeling off the polypropylene sheet, coating the surface with proteins and plating cells on the top, the substrates are placed in the magnetic field generated by two electromagnets so as to actuate the pillars via a magnetic torque. The actuation setup is mounted on a microscope to quantify the local deformation of the surface by tracking the fluorescent beads and to follow the response of the cells to the mechanical stimulation.

To assemble the magneto-active substrate, 120 μL of PDMS/pillar mixture was poured on each polypropylene square and carefully covered with a 32 mm coverslip to avoid the inclusion of bubbles. To orient and organize the micro-pillars in the substrate, the stack was positioned over the magnetic template on a large permanent magnet (60 mm diameter, Supermagnete) as shown in Fig. 1B. The ensemble was kept at 65 $^{\circ}\text{C}$ overnight to cure the PDMS and then the magneto-active substrates were stored at room temperature in the dark. Before use for cell

culture, the polypropylene sheet was carefully removed and a 26 mm silicone ring activated with O₂ plasma was stuck on the PDMS surface to confine cells and culture medium.

Magnetic field source for actuation on the microscope stage. A pair of electromagnets were made by winding 1 mm diameter copper wire around 10 cm long aluminium tubes, i.e. 250 turns over 2.5 layers. Magnetically soft iron pole pieces were used to focus the magnetic field 2 cm away from the coil and their tips were shaped as a bevel (30° on one side, 13° on the other side). The coils were plugged in series on a current generator ($I_{\max} = 9$ A). The pair of electromagnets was mounted on the stage of an epifluorescence microscope equipped with a chamber maintained at 37 °C to enable live cell imaging. Before cell experiments, the tips of the electromagnet pole pieces were wrapped in a thin film of Teflon to prevent sticking on the surface of the substrate and rusting of the pole pieces (soft iron).

Characterization methods. The magnetic field generated in between the electromagnets was estimated macroscopically with a Hall probe (Allegro A1302, Microsystem Inc.). The magnetic moment of individual pillars was calculated from the magnetic moment of a population of about $8 \cdot 10^4$ pillars measured using an extraction magnetometer.

The average dimensions of the magnetic pillars after collection were estimated from the measurement of 39 pillars with a bright field microscope.

The average thickness of the substrate was measured optically on samples containing fluorescent beads at both interfaces of the PDMS. To assess the local mechanical properties of the magneto-active substrates, force-indentation profiles were performed in 1% Pluronic diluted in PBS at a frequency of 1 Hz using an atomic force microscope BioCatalyst (Bruker) equipped with borosilicate sphere-tipped cantilevers of radius $R = 2.5$ μm (Novascan Technologies) and a spring constant of 0.4 N/m. Young's moduli were calculated by least-square fitting of the experimental force indentation curves using NanoScope Analysis (Bruker). Soft PDMS patches of 20 mm diameter and 2 mm thickness were also produced to measure the global viscoelastic properties (shear storage modulus G' and loss modulus G'') of the substrate with a rheometer (Bohlin) used in parallel plane geometry at deformation amplitudes γ varied between 0.01% and 20% of shear and frequencies varied between 0.01 Hz and 10 Hz.

Numerical modelling. In a simple approximation, the present system can be considered as a network of elongated magnets which experience a torque due to the application of a transverse (in-plane) magnetic field. Numerical modelling was performed using COMSOL Multiphysics 5.0 (COMSOL Group, Stockholm, Sweden) in order to define the limits of this simplistic approach and understand the parameters which are relevant to the dimensioning of the system. All simulations were performed on a Dell OptiPlex 9020 (Dell Inc., Round Rock, TX.) powered with an Intel Core i5 4th generation/3.3 GHz (Intel Corporation, Santa Clara, Ca.).

In a first simulation, the magnetic field distribution produced by the electromagnets was modelled in 2D (i.e. in the x-z plane bisecting the electromagnets' pole pieces, where x is in the plane of the substrate and z is out of the substrate plane – see Fig. 1C). As the magnetic field source, we considered the magnetic pole pieces of the electromagnets, and used as input their real geometry with a distance of 6 mm between the poles' apex. To reduce the computational load, the electromagnets were modelled as permanent magnets, homogeneously magnetized along their axis. Their magnetization was adjusted in such a way that the theoretical value of the generated field's projection along the horizontal direction (B_x) matches the experimental values measured in the centre of the system for a current of 5 A.

A second model was developed to analyse quantitatively the magnetic and mechanical response of a single pillar in PDMS when exposed to an external magnetic field. In this 3D magneto-mechanical model, the pillar was represented as a cylinder of silicon, with a diameter of 10 μm and a height of 25 μm. The Fe shell is 2 μm thick on the sidewalls and 10 μm thick on the top of the pillar. The relative permeability of iron was taken as $\mu_r = 5000$. The PDMS film is 115 μm thick, with the top of the pillar being 1 μm below the PDMS surface. The top surface of PDMS is described as a free surface while the bottom one is mechanically attached to the glass substrate. The PDMS was approximated as a linear elastic material, with a Young's modulus $E = 20.3$ kPa and a shear modulus $G = 7.1$ kPa as estimated experimentally.

Cells. The magneto-active substrates were sterilized in 70% ethanol for at least 20 min and rinsed with PBS before use. The surface was then incubated for 1 h in 20 μg/mL fibronectin (Sigma) solution diluted in PBS, a disk of Teflon was used to spread the fibronectin drop on the hydrophobic surface. The substrate was rinsed with PBS and conditioned with culture medium at 37 °C for at least 30 min.

These substrates were tested with wild type NIH3T3 fibroblasts as well as NIH3T3 cells expressing vinculin-eGFP (kindly provided by K. Miroshnikova and C. Albiges-Rizo, Institute for Advanced Biosciences INSERM U823/ERL CNRS 3148, Grenoble) previously cultured at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator with Dulbecco Modified Essential Medium D-GlutaMAX (Gibco) supplemented with 1% Penicillin Streptomycin (Sigma) and 10% fetal bovine serum (Gibco). The cells were seeded at low density on the magneto-active substrates coated with fibronectin (around $3 \cdot 10^3$ cells/cm²). The magneto-active substrates and the fluorescent cells were imaged on an epifluorescence microscope (Olympus IX83) equipped with a white laser (Fianium) to excite the fluorescent beads and the eGFP.

Cell response was assessed by imaging the eGFP fluorescence and the dark-red fluorescent beads every 4 s, during a 30 min experimental procedure, which consists of a 10 min rest, followed by a 5-minute dynamic stimulation with a 0.25 Hz rectangular signal of 5 A current input in the electromagnets, and a final 15 min rest. The protrusive activity was analysed on 16 cells deformed by the displacement of a magnetic pillar in their close

vicinity and 14 control cells, which were exposed to the same magnetic field but no deformation due to the absence of pillars in their surroundings. In both cases, cells with a sufficient cytosolic eGFP-Vinculin signal were chosen to allow for an automatic tracking of their boundary. Cell culture and experiments were carried out in accordance with the relevant guidelines and regulations.

Image analysis. *Cell traction and pillar-induced deformation measurement.* Cell traction force microscopy (TFM)³² and quantification of the deformation induced by pillar actuation were performed with the same algorithm. Surface displacements were determined from images of the fluorescent beads: in the case of the pillars, the images with and without application of the magnetic field were compared, while in the case of cell traction measurements, the bead images in the presence of cells were compared to the reference image obtained after washing the cells away. After correction for experimental drift, the images were divided into 256×256 pixel square sub-images ($34 \times 34 \mu\text{m}^2$). First, cross-correlation was used to yield the average displacement on each pair of sub-images, which were shifted accordingly. The fluorescent beads were then tracked with high accuracy (20 nm) to obtain a displacement map with high spatial resolution³³. The final displacement was obtained on a square grid with $1 \mu\text{m}$ spacing using linear interpolation. Force reconstruction was carried out under the assumption that the substrate is a linear elastic half space considering in-plane stress only, using Fourier Transform Traction Cytometry with zeroth-order regularization³⁴. The problem of calculating the stress field (T_x and T_y) from the displacement was solved in Fourier space, then inverted back to real space. The final stress magnitude $\sqrt{T_x^2 + T_y^2}$ was obtained on a grid with $1 \mu\text{m}$ spacing. To distinguish clearly the regions undergoing traction and those under compression, the derivative of the stress was calculated with respect to each direction using the central difference method, and the sign of $\frac{dT_x}{dx} + \frac{dT_y}{dy}$ gives the type of stress applied on the PDMS surface. Positive stress variations correspond to tensile stress whereas negative ones correspond to compressive stress.

To monitor the effect of a sequence of actuation on cell traction, images of fluorescent beads were recorded every 4 seconds for 30 min starting with 10 min of rest, followed by 5 min of mechanical stimulation, after which the cells were again at rest for 15 min. Finally the cells were washed away with 0.2% SDS to capture the reference bead image without any magnetic field. The traction stress map was calculated for each frame. The strain energy, which is the mechanical energy transferred from the cell to the substrate, was calculated as

$$E = \frac{1}{2} \int_{cell} \mathbf{T}(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{u}(\mathbf{r}) d^2\mathbf{r}$$

where $\mathbf{T}(\mathbf{r})$ is the stress vector and $\mathbf{u}(\mathbf{r})$ the displacement vector. To highlight the change in traction spatial distribution, we subtracted the traction map averaged over 100 frames after stimulation (corresponding to a time period of $6'40''$), from the stress map averaged over the same period immediately before stimulation. This difference map shows positive areas corresponding to traction reinforcement and negative ones corresponding to traction relaxation. All calculations and image processing were performed with Matlab R2015b and figure generation was done with Python.

Protrusion activity of the cells. eGFP-Vinculin Images were first Gaussian filtered to reduce noise and thresholded to obtain a mask of the cell. The contour velocity was evaluated using a previously described method^{35,36}. The normal velocity $v(x,y,t)$ was estimated as

$$v(x, y, t) = \frac{[I(x, y, t + \Delta t) - I_0] - [I(x, y, t - \Delta t) - I_0]}{|\nabla I(x, y, t)|}$$

where $I(x, y, t)$ is the grey level at position (x, y) and time t , I_0 is the same threshold as the one used to obtain the masks, $|\nabla I(x, y, t)|$ is the local gradient magnitude, and Δt is a number of frames (here 10 frames i.e., 40 s).

For each cell, a velocity map was derived by (i) averaging velocity values of each boundary pixel of the cell and its 12 nearest neighbours and (ii) sorting these resulting values as a function of the normalized position along the perimeter of the cell at a given time. The color-coded smoothed velocities along the normalized perimeter were then displayed as a function of time throughout the experiment. To obtain a unique value for each cell, we extracted and averaged the 5% highest velocity values for each frame (see Supplementary Fig. S8). The ratio between the average maximum velocity of a 5-minute period after and that of the 5-minute period before mechanical stimulation was then calculated.

Data availability. The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding authors on reasonable request.

Results and Discussion

Magneto-active substrates were fabricated by incorporation and organization of magnetic micro-pillars in a continuous layer of soft elastomer (Fig. 1). The elements involved in the fabrication and actuation of the magneto-active substrates were characterized, before plating cells on their surface and measuring their protrusive activity after stimulation, to demonstrate the potential of this technology for mechanobiology studies.

Physical properties of the pillars. Since the aim is to produce a torque on the soft magnetic element embedded in the elastomer, the element needs to be anisotropic in shape (if it were magnetically soft but isotropic in shape, the magnetic moments would simply rotate to align with the applied field, resulting in no tilting of the object itself). The considered micro-pillars consist of a core shell structure, based on a silicon cylindrical

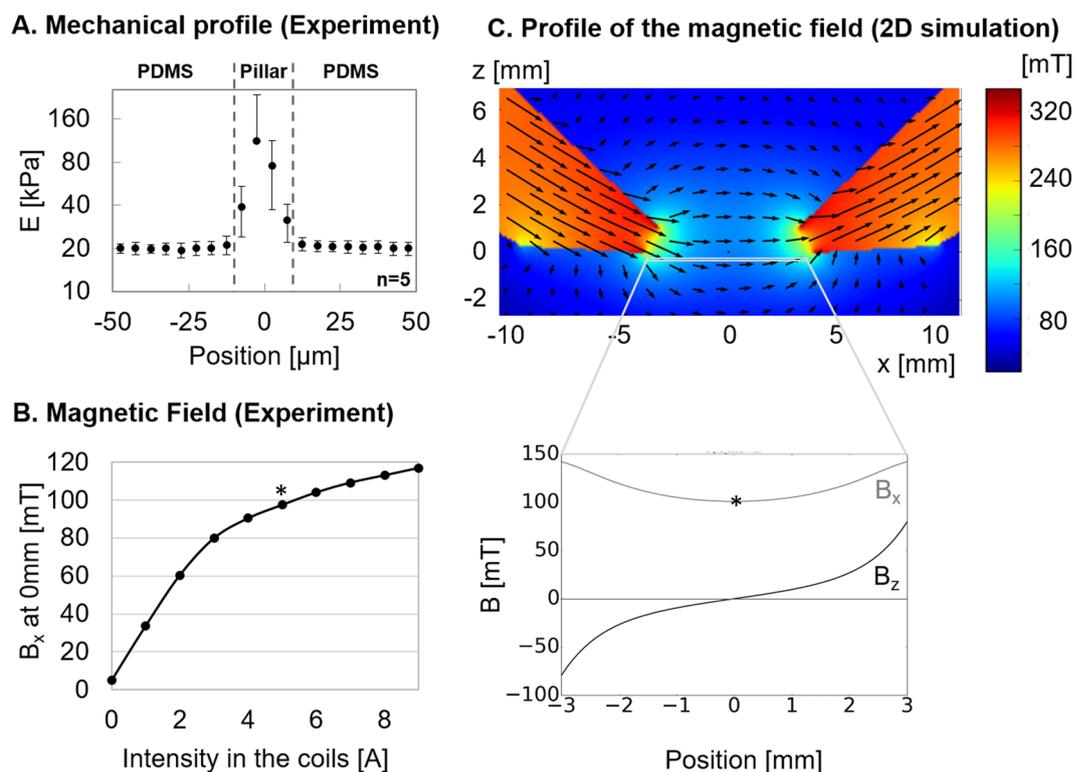


Figure 2. Characterization. (A) Mechanical profiles of the magneto-active substrate measured around 5 pillars by atomic force microscopy reveal homogeneous PDMS substrates with local increases of the Young modulus above the pillars. (B) The horizontal component of the magnetic field B_x increases with the current input to the electromagnets and reaches 100mT for 5 A (*) at the mid-position between the two pole pieces. (C) A numerical model in 2D evaluates the distribution of the horizontal and vertical components of the magnetic field (B_x and B_z respectively) between the bevel shaped pole pieces of the electromagnets.

core coated with an iron shell, produced by lithography, DRIE and Fe deposition (Fig. 1A). After collection, the dimensions of 39 pillars were measured to be $33.5 \pm 2.5 \mu\text{m}$ in height and $15.7 \pm 1.2 \mu\text{m}$ large. This indicates that the micro-pillars are broken roughly $10 \mu\text{m}$ above their base, which corresponds to the thickness of Fe deposited between the pillars. The saturation magnetic moment of about $8 \cdot 10^4$ pillars was estimated to be $3.3 \cdot 10^{-2} \text{ A} \cdot \text{m}^2$, i.e., $4.1 \cdot 10^{-9} \text{ A} \cdot \text{m}^2$ per pillar. Considering that the saturation magnetization of iron is $1.7 \cdot 10^6 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1}$, the volume of iron deposited on a given pillar is estimated to be around $2400 \mu\text{m}^3$, which matches the order of magnitude obtained from a geometrical estimation.

The protocol of assembly established in the methods section produces magneto-active substrates containing magnetic micro pillars arranged in a layer of soft PDMS according to the chosen magnetic template (see Fig. 1B). To better control the position of the pillars, we tried using template arrays of magnetic islands that could trap individual magnetic micro-pillars at regular distances. However, trapping one pillar per island proved difficult. It is important to mention that organizing the pillars using a stripe-template does not affect their ability to locally deform the substrate, provided that the pillar density is kept low enough to prevent magnetic and mechanical interactions between pillars.

Mechanical properties of the substrate. PDMS is a biocompatible elastomer widely used as a cell substrate. We first observed that standard Sylgard 184 used in a ratio base to crosslinker of 40:1, leads to a substrate with a Young's modulus of 40kPa and a sticky surface. We found that adding 8 parts of silicone oil to the Sylgard mixture reduced both the rigidity, to a suitable range to be deformed by cells so as to probe their contractile forces, and the stickiness of the surface, to facilitate handling of the samples. The mechanical properties measured on 3 samples of soft PDMS with a rheometer indicate that both the shear storage modulus G' and the shear loss modulus G'' are independent of the amplitude of deformation γ between 0.01% and 20% of shear when deformed at 1 Hz (see Supplementary Fig. S1), with $G' = 6756 \text{ Pa}$ and $G'' = 1117 \text{ Pa}$. However, varying the frequency between 0.01 Hz and 10 Hz of a 10% shear reveals that below 0.2 Hz, G'' becomes an order of magnitude inferior to G' which is about 6000 Pa. The material's behaviour is thus dominated by elasticity as indicated by the phase angle $\delta = \text{Arc tan}\left(\frac{G''}{G'}\right)$, which remains close to 0 at the frequencies of interest (see Supplementary Fig. S1). For homogeneous isotropic linear elastic materials, Young's modulus can be derived as $E = 2 \cdot (1 + \nu) \cdot G'$. Since Poisson's modulus of our PDMS is $\nu = 0.418^{37}$, we estimate $E = 19.2 \text{ kPa}$ when deformed at 1 Hz. This global value matches the results of 5 mechanical profiles obtained by atomic force microscopy, as the local Young's modulus obtained away from a pillar is $E = 20.3 \pm 2 \text{ kPa}$ (Fig. 2A). The PDMS mixture used in this study leads to a soft

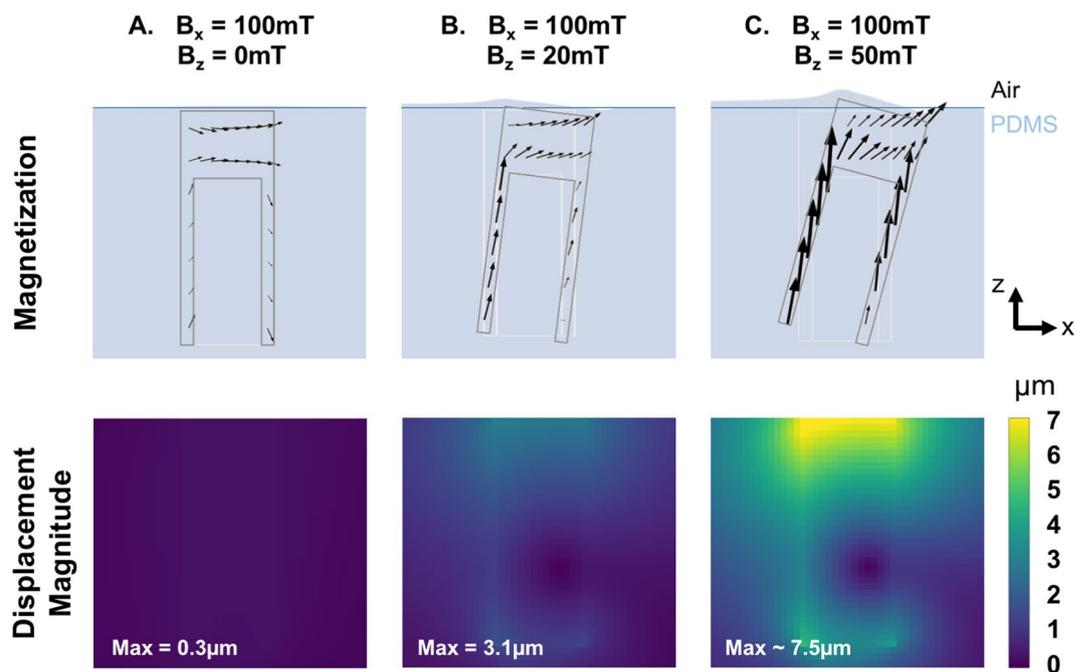


Figure 3. Contribution of B_z . The magnetization of the iron pillar induced by a purely horizontal magnetic field (A), a magnetic field with a slight (B) or large (C) vertical component B_z and the subsequent magnitude of displacement in the substrate have been predicted with the magneto-mechanical model. In each case, the undeformed positions of the PDMS free surface and the pillar are represented by blue and light grey lines, respectively.

substrate with negligible viscosity at the frequencies of interest, and thereby allows us to use the TFM algorithm and derive force field from the displacement field of the fluorescent beads.

As expected, the rigidity sharply increases by an order of magnitude when indenting above the pillars (Fig. 2A), which leads us to avoid analysing cells lying above pillars.

The layer of soft PDMS is $115.5 \pm 12.5 \mu\text{m}$ thick, as measured in 9 points of 3 different samples. As shown in Fig. 1B, this layer is thick enough to neglect the effect of the glass coverslip on the mechanical properties of the substrate and on the pillar displacement close to the surface, while thin enough to have optical properties compatible with fluorescence imaging. Of note, the fluorescent beads embedded under the surface of the soft PDMS are homogeneously dispersed in a single plane with an average density of $0.2 \text{ beads}/\mu\text{m}^2$, including above the pillars, as verified from images taken on a substrate positioned upside-down (see Supplementary Fig. S2). This density of beads is low enough to neglect their influence on the mechanical behaviour of the soft substrate^{38,39} and allows automated tracking of the displacement with high accuracy (20 nm) and spatial resolution ($<5 \mu\text{m}$). This reproducible method of bead incorporation is thus particularly suited to improve TFM on a soft elastomer⁴⁰ and widens the range of soft substrates that can be used to study cell contractility.

Generation of the magnetic field. To actuate the magnetic micro-pillars, two electromagnets have been designed to generate a predominantly in-plane magnetic field (Fig. 1C). While the iron pole pieces have been designed to focus the field at the surface of the magneto-active substrate, the dimensions and the position of the electromagnets were determined by the geometrical constraints related to the microscope and the cell culture dishes.

The B_x component of this field was measured as a function of current input into the coils with a Hall probe positioned at the mid-point between the two pole pieces (Fig. 2B). We restricted the current input to a maximum intensity of 5 A for the rest of the experiments, which corresponds to a magnetic field of 100 mT.

The magnetic field distribution calculated within the actuation zone is represented in Fig. 2C. This simulation indicates that the B_x component of the magnetic field is relatively homogeneous in-between the electromagnets, while the vertical component (B_z) varies symmetrically with respect to the centre, where it vanishes. In the plane of the pillars and roughly $70 \mu\text{m}$ below the electromagnets, if B_x is set to $\sim 100 \text{mT}$ in the middle, as generated with 5 A in the coils, then B_z varies from 0 mT (exactly mid-way between the electromagnets) to $\pm 70 \text{mT}$ (near the poles' apex). The important role of the out-of-plane component is discussed below.

Actuation of the substrate. *Influence of B_z .* The B_z component of the applied field serves to induce a vertical component of the magnetization of the micro-pillars. This in turn allows the B_x component of the applied field to produce a torque on the micro-pillars. The role of B_z in inducing a mechanical response of the substrate was assessed within the framework of the magneto-mechanical model, by varying B_z between 0 and 70 mT while fixing the horizontal field B_x at 100 mT and neglecting the B_y component. Figure 3A shows the vertical cut of a

pillar experiencing a purely horizontal magnetic field ($B_z = 0$). The magnetization of the pillar lies practically in the horizontal plane and there is no significant torque on the pillar. However, as soon as the pillar experiences a vertical field component B_z , even small compared to B_x , the magnetization in the sidewalls tends to align along the long axis, forming a non-zero angle with the applied field, and resulting in an effective torque on the pillar. Pillars experiencing a vertical magnetic field of 20mT are predicted to produce displacements of around 3.1 μm at the surface of the PDMS (Fig. 3B). These simulations show that a non-zero vertical component of the magnetic field B_z is essential to take advantage of the shape anisotropy of the iron shell to align the magnetization of the pillar along its long axis, and thereby generate a torque able to deform the surface of the substrate. Figure 3C indicates that this effect is modulated by the value of the vertical magnetic field, since for $B_x = 100\text{mT}$ and $B_z = 50\text{mT}$, the surface above the pillar is expected to experience in-plane displacements of over 7.5 μm . Note that the slight vertical distortion ($< 1\ \mu\text{m}$) expected close to the tilted pillar at high deformation was observed experimentally through a local defocusing of the fluorescent beads.

The magneto-mechanical model indicates that the displacement generated by a pillar decreases with increasing distance from the closest pole piece, which was observed experimentally (see Supplementary Fig. S3). Thus in a given experiment with cells spread across the substrate, the influence of different values of displacement on a given set of cells can be studied.

Experimental deformation. The magneto-mechanical simulation of a pillar placed at 1 mm from a pole piece was performed with $B_x = 119\text{mT}$ and $B_z = 27\text{mT}$, as estimated from the magnetic field distribution simulation of the experimental actuation system (Fig. 2C). A top view of the displacement field in the xy plane was used to estimate the stress magnitude of the surface using the traction force microscopy algorithm, and the stress variations. These numerical estimations agree with experimental measurements performed on 5 pillars significantly actuated by electromagnets powered with 5 A ($B_x \sim 100\text{mT}$, $B_z \sim 70\text{mT}$). Indeed, such actuation generates a displacement field that decays sharply by 50% within 20 μm (Fig. 4A), which corresponds to the cellular length scale. The resulting deformation of the surface is qualitatively symmetric with respect to the pillar.

The displacements induced by a series of 15 pillars aligned about 1.5 mm away from the pole piece tip ($B_z \sim 20\text{mT}$) and experiencing an incremental actuation (from 0 to 5 A in the coils) was systematically measured to estimate the variability of the actuation between pillars (see Supplementary Fig. S4). The broad distribution of maximum displacements, which increases with the current input, can be explained by the influence of pillar geometry on the resulting actuation. 3D magneto-mechanical simulation was performed on core-shell pillars with different shapes (cylinder and cone of different heights), and positioned with the iron cap either towards the surface (up) or towards the coverslip (down) (see Supplementary Fig. S5). We found that cylinders are insensitive to the up/down orientation whereas conical pillars are sensitive to it, showing a 50% displacement increase when placed upside down. Hence, a conical pillar with iron cap up induces 25% less deformation than a cylindrical one, but when placed upside down the obtained deformation becomes larger than that of a cylindrical pillar. Regarding the influence of the pillar length, which can be affected during mechanical collection from the wafer, we found that a cylindrical pillar is expected to deform the surface about 22% less if reduced by 5 μm from its base, and up to 45% less if reduced by 10 μm .

Coupling the active substrates with TFM allows to measure the actual displacements and stresses induced by each pillar after removal of the cells. Hence, the variability of actuation amplitudes from pillar to pillar can be used to our advantage: a range of stimuli can be explored in one experiment, where the precise stress applied on each cell is known.

Deriving the stress magnitudes at the surface of the 20kPa PDMS reveals that the magneto-active substrates allow generating a stress within 30 μm around the pillars, up to 2.4kPa of stress amplitude in the close vicinity of the pillars (Fig. 4B). Such a value corresponds to the range of stress that cells are able to generate on their substrate^{41,42} and therefore supports the relevance of the present system in mimicking the mechanical coupling of neighbouring cells through their matrix⁴³. In terms of force, magneto-active substrates can locally transmit nN-forces to cell adhesions, if a typical adhesion surface of 1 μm^2 is considered, which also compares to forces generated by single adhesions^{44,45}. Moreover, the maps of stress variation show a clear localization of the mechanical stimulation in a 30 μm -radius around the pillars. This subcellular length scale confirms that the present magneto-active substrates are appropriate tools to investigate the spatiotemporal evolution of intracellular signals triggered by a local extracellular mechanical cue sensed at the focal adhesions.

Displaying the stress variation map also highlights the different modes of stimulation available with the magneto-active substrates. Indeed, the torque applied by the magnetic field on a pillar stresses the surface in tension on one side (positive stress variation) and in compression on the other side (negative stress variation). This feature offers the possibility to perform both stretching and compression experiments on the same setup and thus to propose rigorous comparisons of the differential response of stimulated cells. This is particularly relevant to investigate muscle cells, cell types sitting in weight bearing tissues^{25,46} but also stem cells, the differentiation of which is already known to be tuned by static mechanical cues of their environment such as stiffness¹² and geometry⁵ via mechanotransduction processes.

Control through the current input. Electromagnets rather than permanent magnets were chosen to facilitate dynamic control of the system. As expected from the evolution of the magnetic field measured experimentally (Fig. 2B), the deformation, stress and stress variation profiles progressively spread along the x direction up to 5 A and stabilize thereafter (see Supplementary Fig. S6). This observation supports our choice to limit the stimulations to 5 A for subsequent experiments. Cyclic stimulations manually performed between 0 and 5 A on 4 different pillars show that the temporal pattern of deformation is reproducible over several cycles of actuation (Fig. 4D). The residual deformation appearing after the first cycle can be explained by a slight defocusing of the surface around

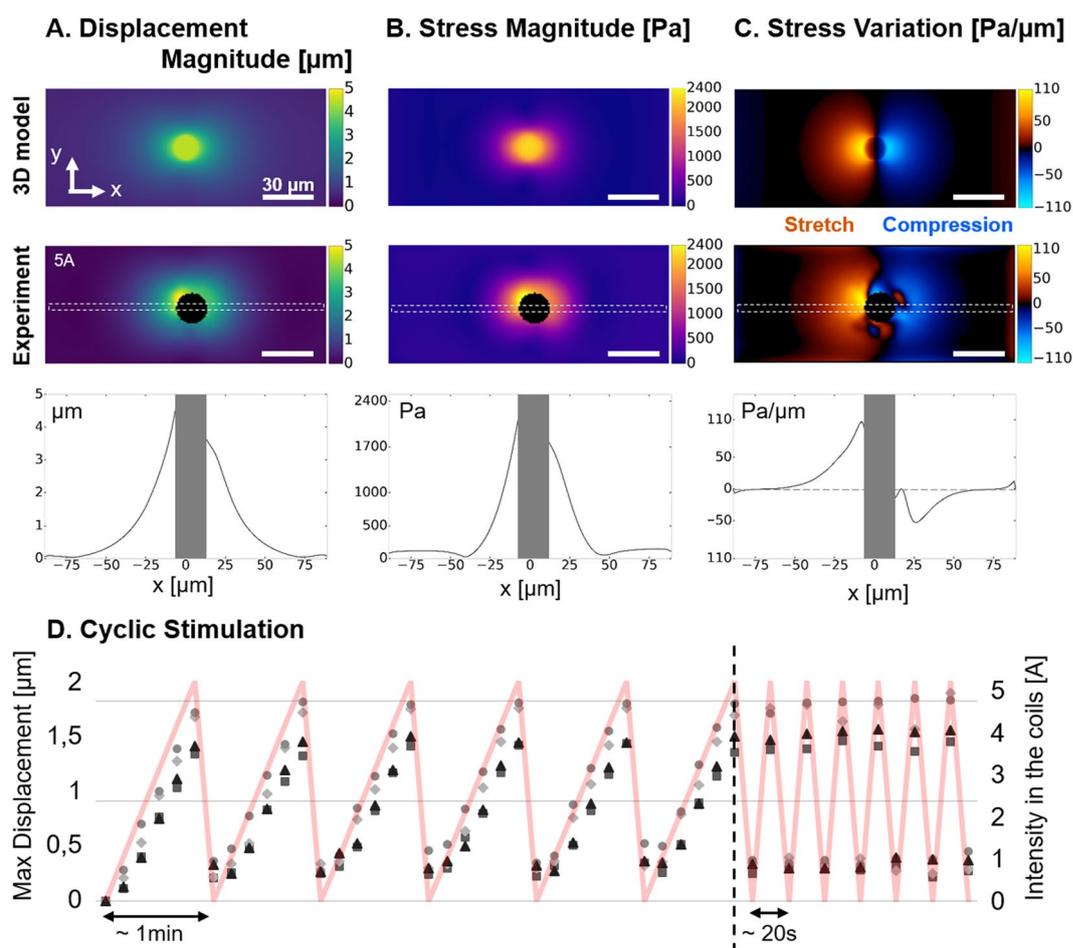


Figure 4. Actuation of the substrate. (A) The magnitude of displacement induced by a pillar positioned 1 mm away from the electromagnet and experiencing $B_x = 119\text{mT}$ and $B_z = 27\text{mT}$ was estimated with a 3D model and compared to the magnitude of displacement measured experimentally around 5 pillars stimulated by an electromagnet supplied with 5 A. (B) Maps of stress magnitude were derived from the displacement fields by Fourier Transform Traction Cytometry, and (C) maps of stress variation were calculated to distinguish the regions under traction and compression. Scale bar: $30\ \mu\text{m}$. Profiles corresponding to the dashed region of each map are also displayed. (D) Maximum magnitude of displacement measured on 4 different pillars undergoing cyclic stimulations applied by manually adjusting the intensity of the current input (red curve).

the pillar and/or a local micro-delamination at the interface between the soft PDMS and the pillar. Besides tuning the stress applied to the cell in a physiological range by varying the amplitude of the current, it is also possible to tune the temporal pattern of the stimulation with a function generator. Micrometric displacements of the pillars were detectable up to 10 Hz with our optical setup, which is comparable to current cell stretcher technologies⁸.

Application to cells. To test our system in relevant conditions for biological studies, a low density of NIH3T3 fibroblasts was plated on the magneto-active substrates after functionalization of the surface by adsorption of fibronectin. The cells adhered normally and homogeneously within 3 to 4 hours after seeding (Fig. 5A).

First, we investigated whether the stresses induced by a pillar in the vicinity of a cell can mimic the action of neighbouring cells, both in magnitude and spatial patterns. Figure 5B shows that a pillar positioned $\sim 1.5\text{mm}$ away from the tip of an electromagnet pole piece powered by 5 A, generates up to 1.5kPa stress in the absence of a neighbouring cell, and that NIH3T3 cells also generate up to 1.5kPa when lying close to the same pillar at rest. These values indicate that the forces imposed by the actuation of the magnetic pillar are comparable to the traction forces generated by the cells on the same substrate, which supports the relevance of the method. Furthermore, mapping the stress variations (Fig. 5C) both confirms the symmetric pattern of stretching and compression generated by the pillar and recalls that cells compress the surface they adhere on. Stress variations induced by the actuation of a pillar also appear very similar to those produced by a neighbouring cell, with the juxtaposition of regions that are highly compressed (blue) and regions that are highly stretched (yellow).

We show that the magneto-active substrates are fully compatible with fluorescence imaging techniques (Fig. 6A). As such, the precise location of a cell with respect to a pillar is obtained by combining the fluorescence images of dark red fluorescent beads with those of fibroblasts expressing eGFP vinculin. Supplementary Fig. S7

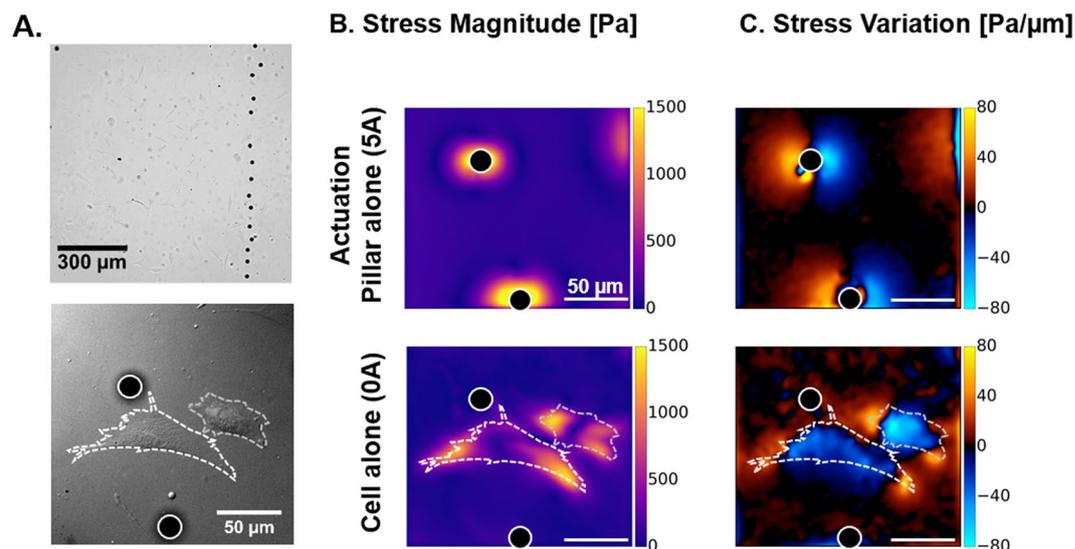


Figure 5. Cells on magneto-active substrates. (A) Bright field images of NIH3T3 fibroblast cells spread on a magneto-active substrate. Stress magnitude (B) and variation (C) experienced by the surface were measured under the action of a pillar without cell (5 A) and in the presence of contractile cells in the vicinity of a pillar at rest. Scale bar: 50 μm .

and Movie S9 reveal that increasing gradually the current in the electromagnets not only deforms the surface but also the adhering cell, and thus demonstrate the possibility to tune the amplitude of mechanical stimulation induced by the active substrate.

Then, we performed live-cell experiments and investigated the cellular response to a 5-minute dynamic stimulation at 0.25 Hz. Figure 6A shows the fluorescent image of a NIH3T3 fibroblast expressing Vinculin-eGFP (green) overlaid with the fluorescent signal from the beads used for TFM (red). Upon actuation of the magnetic pillar nearby (white circle), the cell was deformed with a local maximal displacement of 3.8 μm as illustrated by the different cell contours drawn in Fig. 6A (yellow outline). Shortly after the end of the stimulation period, a new protrusion appeared on the opposite side (Fig. 6A, magenta outline, Supplementary Movie S10). To quantify the overall increase of protrusive activity observed on several cells, we estimated the normal velocity of the cell boundaries using a method introduced by Döbereiner *et al.*³⁵. Velocity profiles along the normalized perimeter of the cell were represented as a function of time as in a kymograph (Fig. 6B). In this example, the cell rapidly develops and retracts a protrusion with velocities of +5 $\mu\text{m}/\text{min}$ and -5 $\mu\text{m}/\text{min}$, respectively, as shown by the red and blue streaks. The same protocol of mechanical stimulation and data analysis was applied to 16 different cells, and 14 control cells experiencing the same magnetic field but no mechanical stimulation. We compared the velocity of the most active border region before and after the mechanical stimulation (see Methods and Supplementary Fig. S8). The velocity ratios shown in Fig. 6B show different distributions between the control and the stimulated populations ($p < 0.05$, Mann-Whitney rank test). The response is nevertheless not clear as half of the cells increased significantly their protrusive activity after dynamic mechanical stimulation, while the rest of the population is comparable to the control cells. This observation is consistent with the results of Nagayama *et al.* where, after stimulating cells with discrete pillars, they observed two categories of responses, both in force and in cell area²¹.

To prove the inherent compatibility of our setup with time-resolved TFM, we show the mechanical response of an exemplary cell in Fig. 6C (see also Supplementary Movies 10). This cell showed a well-defined force dipole before the actuation (Fig. 6C 0 A) which was strongly perturbed when the pillar was displaced (Figs 5A and 6C). The traction maps were calculated for every frame of the movie and three regions of interest (ROI) were chosen to display the dynamic mechanical response. The first ROI, close to the pillar, showed the periodic stimulation corresponding to the pillar actuation and a fast and maintained reinforcement from about 400 Pa up to 650 Pa (see Fig. 6C, Supplementary Movies 10). In contrast, the second ROI, chosen on the other side of the cell, displayed a strong relaxation from about 500 Pa down to 300 Pa starting also from the very beginning of the stimulation. The third ROI was chosen at a place of high pre-tension and, although placed about 50 μm away from the pillar, the average stress in this ROI also showed an immediate response (see Supplementary Movies 10) and a sustained reinforcement (from 1400 Pa to 1500 Pa). We can speculate that the immediate mechanical response is the result of a direct mechanical transmission at a distance through the cytoskeleton and adhesion crosslinks⁴⁷. Overall, this cell showed no dramatic change in its strain energy, except during the mechanical stimulation where the periodic stress due to the pillar displacement was clearly visible. The strain energy being stable shows that this cell did not increase or decrease its contractility but rather redistributed the forces. To get a global view of the cell mechanical response, we compared the average stress maps obtained during about 6 minutes before and 6 minutes after the stimulation. The resulting traction difference map (Fig. 6C) reveals a heterogeneous response within the cell with alternating reinforcement and relaxed areas. Even if both relaxation and reinforcement seem more intense in the part of the cell directly displaced by the pillar, the traction difference map shows that this local

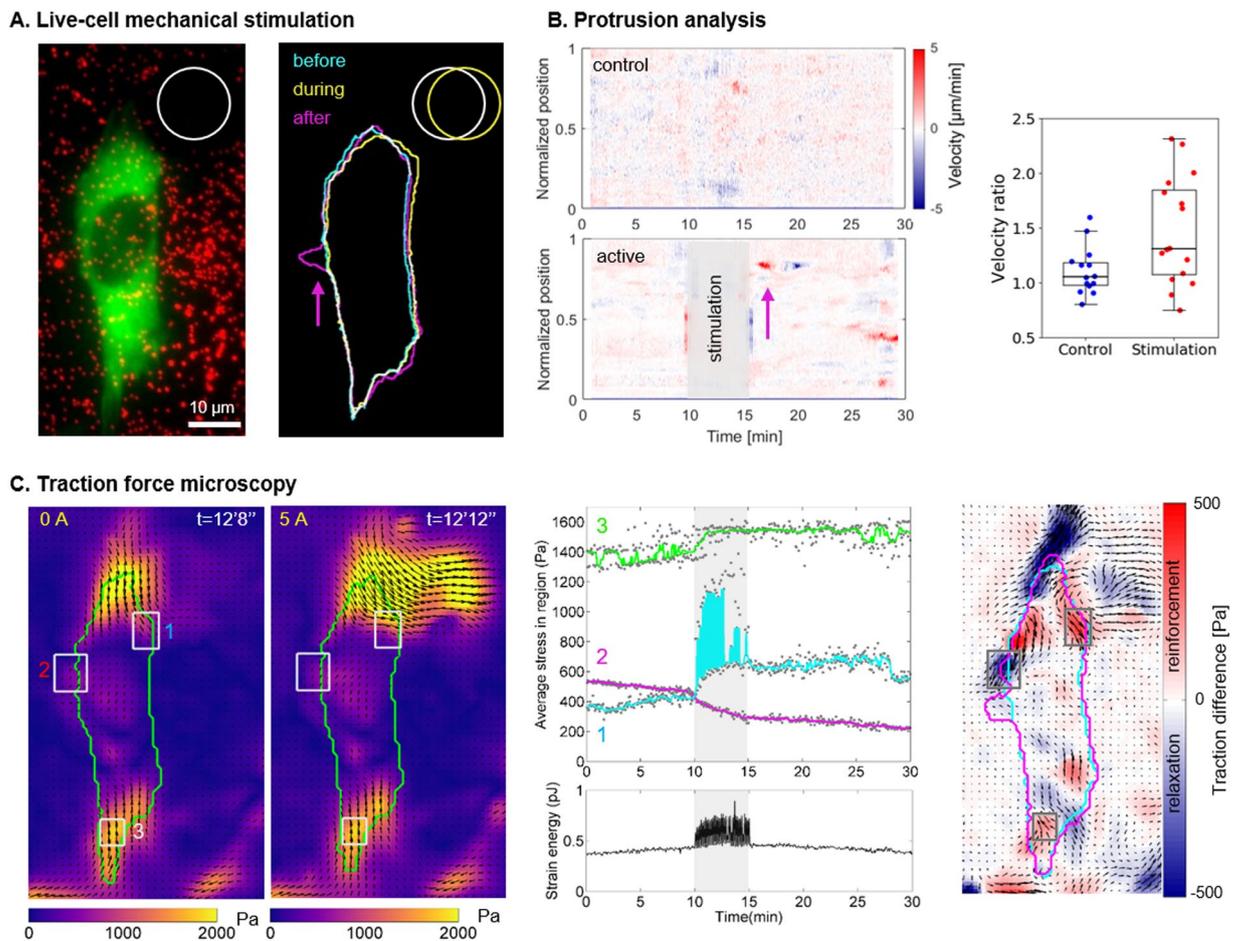


Figure 6. Cell response to stimulation. (A) Fluorescent images of a NIH3T3 vinculin-eGFP fibroblast (green) and the beads spread under the surface (red) were used to draw the contours of the cell and the pillar, respectively. The cell was deformed (yellow) when the pillar was displaced, and a new protrusion appeared (magenta) a few minutes later. Corresponding movie as supplementary material (Movies 10) (B) Protrusion analysis. Velocity profiles of the boundary of a control cell and the stimulated cell (A) along a normalized perimeter as a function of time. Positive values (red) represent protrusions whereas negative values (blue) represent retractions. On the stimulated cell, a protrusion is visible (magenta arrow) shortly after the end of the stimulation and followed by a retraction. Quantification of the cellular response for 16 stimulated cells and 14 control cells: ratio of velocity after and before the stimulation were calculated as detailed in Fig. S8 and plotted for each cell. Approximately half of the cell population showed an increased protrusion activity after the mechanical stimulation. (C) Stress maps of the cell and the pillar at rest (0 A) and during actuation (5 A). Such maps were derived every 4 s during the entire protocol and the average stress in the 3 regions of interest (grey rectangles) and the strain energy of the cell (green contour) were plotted as a function of time. Map representing the local differences in averaged traction values before and after 5 min stimulations: blue indicates a local relaxation of the cell, and red indicates a reinforcement of the traction forces. The corresponding movie is given in the supplementary materials (Movies 10).

mechanical stimulation induced a global reorganization of the cell tensions. Nevertheless, the TFM analysis of 10 stimulated cells did not reveal any clear trend on a cellular mechanical reaction to the dynamic deformation (see Supplementary Fig. S11) as also observed by Sniadecki *et al.*¹⁹ and Nagayama *et al.*²¹. The random positioning of the cells with respect to the magnetic pillars constitutes a current limitation of the system as it leads to different types of stimulation for each cell. Taken together with the heterogeneity of the mechanical response at the single cell scale, it makes it difficult and out of the scope of this paper to identify relevant readouts of a reproducible cellular mechanical response. This relative positioning of cells with respect to the pillars may explain as well the diversity in the protrusive activity response (Fig. 6B). Because a polarized cell may react differently if pulled at the front or at the back⁴⁸, or along different orientations, patterning adhesive islands on the substrate appears to be a relevant solution to normalize the experiments by normalizing cell shape and position with respect to the pillars. Other magnetically actuated systems proposed previously were designed to stimulate cells with discrete surfaces either at a subcellular scale^{19,21} or in large cell migration chips⁴⁹. The present method addresses length scales from subcellular to cellular levels, with displacements spanning continuously over larger distances (see Fig. 5B). A specificity of the magneto-active substrates is to provide a continuous adhesive surface thereby not restricting

the adhesion dynamics and distribution and allowing the cells to freely respond to the stimulation. As such, force dynamics and distribution can be quantified continuously using traction force microscopy.

Conclusion and Outlook

The magneto-active substrates developed here complement the current cell stretching technologies used to establish that cells change contractility, spreading phenotype, fibre formation and proliferation differently for different mechanical stimulation patterns^{8,17–19}. Indeed, the present work demonstrates that magneto-active substrates made of soft magnetic micro-pillars embedded in a soft elastomer uniquely combine advantages that were not associated so far. The magneto-active substrates (i) have been designed to meet criteria relative to biocompatible materials and optical compatibility with high-resolution fluorescence microscopy, (ii) enable to apply a local and controlled mechanical stimulation on single cells spread on a continuous surface, and (iii) have an additional potential to quantify cellular mechanical responses via time-resolved traction force microscopy. Live-cell experiments including a period of dynamic deformation via the magneto-active substrates further support the relevance of this new tool in the study of cell response to mechanical stimulation.

Alternative approaches to micro-pillar fabrication (e.g. electro-deposition in patterned moulds) and template preparation (e.g. electro-deposition in patterned moulds or chemical etching of foils) can be explored to improve the reproducibility of actuation from pillar to pillar. The use of hard magnetic micro-pillars, which would be permanently magnetized in a given direction, could also be studied.

Patterning adhesive islands on the surface, as done in^{32,50}, would overcome the limitations related to the positioning and orientation of the cells with respect to the pillars. A strategic functionalization of the magneto-active substrate would then guarantee the repeatability of cell experiments by controlling the degree of spreading and the geometry of the cell. Most importantly, patterning would enable to choose the mode of stimulation (stretching, compression or shear) and the distance to the pillar. This improvement would also constitute a first step towards high throughput experiments. In the long term, we believe that magneto-active substrates have potential to become a standard tool to investigate single cell or multicellular response to dynamic mechanical stimulation and thus improve our quantitative understanding of mechanotransduction.

References

1. Jaalouk, D. E. & Lammerding, J. Mechanotransduction gone awry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 63–73 (2009).
2. Chin, L., Xia, Y., Discher, D. E. & Janmey, P. A. Mechanotransduction in cancer. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **11**, 77–84 (2016).
3. Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. & Wang, Y. L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* **79**, 144–152 (2000).
4. Engler, A. J. *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677–89 (2006).
5. Ruiz, S. A. & Chen, C. S. Emergence of Patterned Stem Cell Differentiation Within Multicellular Structures. *Stem Cells* **26**, 2921–2927 (2008).
6. Riveline, D. *et al.* Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* **153**, 1175–1186 (2001).
7. Grashoff, C. *et al.* Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* **466**, 263–6 (2010).
8. Cui, Y. *et al.* Cyclic stretching of soft substrates induces spreading and growth. *Nat. Commun.* **6**, 6333 (2015).
9. Jungbauer, S., Gao, H., Spatz, J. P. & Kemkemer, R. Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates. *Biophys. J.* **95**, 3470–3478 (2008).
10. Livne, A., Bouchbinder, E. & Geiger, B. Cell reorientation under cyclic stretching. *Nat. Commun.* **5**, 3938 (2014).
11. Sears, C. & Kaunas, R. The many ways adherent cells respond to applied stretch. *J. Biomech.* **49**, 1347–1354 (2016).
12. Sweeney, H. L., Discher, Engler, A. J. & S. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* (2006).
13. Kim, D.-H., Wong, P. K., Park, J., Levchenko, A. & Sun, Y. Microengineered platforms for cell mechanobiology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **11**, 203–233 (2009).
14. Haase, K. & Pelling, A. E. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *J. R. Soc. Interface* **12**, 20140970 (2015).
15. Wang, N., Butler, J. P. & Ingber, D. E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* **260**, 1124–1127 (1993).
16. Hénon, S., Lenormand, G., Richert, A. & Gallet, F. A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys. J.* **76**, 1145–51 (1999).
17. Quinlan, A. M. T., Sierad, L. N., Capulli, A. K., Firstenberg, L. E. & Kristen, L. Combining Dynamic Stretch and Tunable Stiffness to Probe Cell Mechanobiology *In Vitro*. **6** (2011).
18. Krishnan, R. *et al.* Reinforcement versus fluidization in cytoskeletal mechanoresponsiveness. *PLoS One* **4**, e5486 (2009).
19. Sniadecki, N. J. *et al.* Magnetic microposts as an approach to apply forces to living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 14553–8 (2007).
20. Digabel, J. *et al.* Magnetic micropillars as a tool to govern substrate deformations. *Lab Chip* **11**, 2630 (2011).
21. Nagayama, K., Inoue, T., Hamada, Y. & Matsumoto, T. A novel patterned magnetic micropillar array substrate for analysis of cellular mechanical responses. *J. Biomech.* **65**, 194–202 (2017).
22. Cavalcanti-Adam, E. A. *et al.* Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys. J.* **92**, 2964–74 (2007).
23. Frey, M. T., Tsai, I. Y., Russell, T. P., Hanks, S. K. & Wang, Y.-L. Cellular responses to substrate topography: role of myosin II and focal adhesion kinase. *Biophys. J.* **90**, 3774–3782 (2006).
24. Roberts, S. R., Knight, M. M. & Lee, D. a & Bader, D. L. Mechanical compression influences intracellular Ca²⁺ signaling in chondrocytes seeded in agarose constructs. *J. Appl. Physiol.* **90**, 1385–1391 (2001).
25. Szafranski, J. D. *et al.* Chondrocyte mechanotransduction: Effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis. *Osteoarthr. Cartil.* **12**, 937–946 (2004).
26. Desprat, N., Supatto, W., Pouille, P.-A., Beaupaire, E. & Farge, E. Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior midgut differentiation in *Drosophila* embryos. *Dev. Cell* **15**, 470–7 (2008).
27. Cheng, G., Tse, J., Jain, R. K. & Munn, L. L. Micro-Environmental Mechanical Stress Controls Tumor Spheroid Size and Morphology by Suppressing Proliferation and Inducing Apoptosis in Cancer Cells. *PLoS One* **4**, e4632 (2009).
28. Montel, F. *et al.* Stress clamp experiments on multicellular tumor spheroids. *Phys. Rev. Lett.* **107**, 1–4 (2011).
29. Tse, J. M. *et al.* Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 911–916 (2012).
30. Kustov, M. *et al.* Magnetic characterization of micropatterned Nd-Fe-B hard magnetic films using scanning Hall probe microscopy. *J. Appl. Phys.* **108**, 63914 (2010).

31. Dempsey, N. M. *et al.* Micro-magnetic imprinting of high field gradient magnetic flux sources. *Appl. Phys. Lett.* **104**, 262401 (2014).
32. Tseng, Q. *et al.* A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels. *Lab Chip* **11**, 2231–2240 (2011).
33. Crocker, J. & Grier, D. Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *J. Colloid Interface Sci.* **179**, 298–310 (1996).
34. Sabass, B., Gardel, M. L., Waterman, C. M. & Schwarz, U. S. High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances. *Biophys. J.* **94**, 207–20 (2008).
35. Döbereiner, H. G. *et al.* Lateral membrane waves constitute a universal dynamic pattern of motile cells. *Phys. Rev. Lett.* **97**, 10–13 (2006).
36. Barry, D. J., Durkin, C. H., Abella, J. V. & Way, M. Open source software for quantification of cell migration, protrusions, and fluorescence intensities. *J. Cell Biol.* **209**, 163–180 (2015).
37. Babu, A. R. & Gundiah, N. Role of Crosslinking and Entanglements in the Mechanics of Silicone Networks. *Exp. Mech.* **54**, 1177–1187 (2014).
38. Plotnikov, S. V., Sabass, B., Schwarz, U. S. & Waterman, C. M. High-resolution traction force microscopy. *Methods in cell biology* **123**, (Elsevier Inc., 2014).
39. Holenstein, C. N., Silvan, U. & Snedeker, J. G. High-resolution traction force microscopy on small focal adhesions - improved accuracy through optimal marker distribution and optical flow tracking. *Sci. Rep.* **7**, 41633 (2017).
40. Das, T., Maiti, T. K. & Chakraborty, S. Traction force microscopy on-chip: shear deformation of fibroblast cells. *Lab Chip* **8**, 1308–18 (2008).
41. Han, S. J., Oak, Y., Groisman, A. & Danuser, G. Traction microscopy to identify force modulation in subresolution adhesions. *Nat. Methods* **12**, 653–656 (2015).
42. Butler, J. P., Tolić-Nørrelykke, I. M., Fabry, B. & Fredberg, J. J. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C595–605 (2002).
43. Kollmannsberger, P., Bidan, C. M., Dunlop, J. W. C. & Fratzl, P. The physics of tissue patterning and extracellular matrix organisation: how cells join forces. *Soft Matter* **7**, 9549–9560 (2011).
44. Balaban, N. Q. *et al.* Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* **3**, 466–472 (2001).
45. Trichet, L. *et al.* Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 6933–6938 (2012).
46. Shoham, N. & Gefen, A. The influence of mechanical stretching on mitosis, growth, and adipose conversion in adipocyte cultures. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **11**, 1029–1045 (2012).
47. Na, S. *et al.* Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 6626–6631 (2008).
48. Goehring, N. W. & Grill, S. W. Cell polarity: Mechanochemical patterning. *Trends in Cell Biology* **23**, 72–80 (2013).
49. Khademolhosseini, F. Magnetically actuated microstructured surfaces can actively modify cell migration behaviour. *Biomed. Microdevices* 1–11, <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0033-7> (2016).
50. Segerer, F. J. *et al.* Versatile method to generate multiple types of micropatterns. *Biointerphases* **11**, 11005 (2016).

Acknowledgements

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, grant n° ANR-13-PDOC-0022-01), and supported by the CNRS and the Université Grenoble Alpes (UGA, AGIR-POLE program 2015, project ACTSUB). The authors are grateful to Dr. H. Maiato (University of Porto) for providing the NIH3T3 cells, to Dr. K. Miroshnikova (IAB, Grenoble) and K. Hennig (LIPhy, Grenoble) for the stable transfection with Vinculin-eGFP, Dr. S. Lecuyer and Dr. C. Verdier for their help with the rheology measurements and discussions, and finally the team of C. Albiges-Rizo (IAB, Grenoble) and D. Riveline (IGBMC, Université de Strasbourg) for support and fruitful discussions. C.M.B., A.C., M.B., T.B. and A.D. are part of the GDR 3070 CellTiss. Deep RIE was carried out at the PTA-Grenoble cleanroom facility. The authors are grateful to R. Haettel and J.-F. Motte of Institut NEEL for the development of a custom built substrate holder for the sputtering system and for FIB cutting, respectively.

Author Contributions

M.B. and A.D. contributed to the concept of the magneto-active substrates. C.B., P.M., N.D., T.D., and A.D. designed the experimental setup. M.F., N.D., T.D. implemented the magneto-mechanical models and generated the numerical data. T.D. produced and characterized the magnetic templates and pillars. C.B. established the protocols, C.B. and A.L. performed the experiments. C.B. and T.B. performed the mechanical characterisation. C.B., A.C., A.L., I.W. and A.D. contributed to the data analysis. C.B., M.F., N.D., T.D. and A.D. drafted the work. All authors approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19804-1>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

1.3 Discussion

Comme il est mentionné dans la partie *Conclusion and Outlook*, il est possible d'améliorer la reproductibilité des piliers en modifiant le protocole de fabrication. Nous envisageons aussi de réessayer les substrats en PAA, et bien que les piliers actuels ne soient pas oxydés par l'agent de réticulation, nous devons maintenant résoudre des problèmes d'homogénéisation et de manipulation de la préparation de piliers dans la solution de PAA non polymérisé. Cependant, l'amélioration la plus importante reste l'ajout du micro patronage de protéines d'adhérence (comme la fibronectine) à la surface du substrat pour contrôler la géométrie des cellules et leur position relative aux piliers. Cela nous permettrait de réaliser des statistiques sur les réponses mécaniques et biochimiques des cellules dont les conditions expérimentales seraient comparables. Le micro patronage nous permettrait aussi de choisir le mode de stimulation des cellules par les piliers : en étirement, en compression, ou en cisaillement.

Une méthode pour contrôler spatialement le dépôt de protéine consiste à adsorber des polymères comme le PLL-PEG qui forment une brosse repoussant stériquement d'autres protéines. On expose ensuite l'échantillon aux UV profonds (200-300 nm) à travers un masque, ce qui a pour effet de détruire les polymères aux zones exposées. Les protéines d'intérêt peuvent ensuite s'adsorber à la surface [58]. Une méthode alternative consiste à exposer l'échantillon aux UV à travers un masque, et ce qui a pour effet d'activer les zones exposées [59], par changement d'hydrophobie, de charge électrique ou par la formation d'ozone ou d'espèces oxydantes réactives (ROS). Les protéines fonctionnalisées avec une biotine par exemple se greffent alors directement à la surface, et les protéines d'intérêt portant une streptavidine se lient aux protéines greffées [60]. Nous ne pouvions cependant pas employer ces méthodes car les UV photoblanchissaient les billes fluorescentes utilisées pour la TFM. Nous nous sommes alors tournés vers l'activation de la surface par plasma, mais cette technique forme une fine croûte de PDMS très rigide (figure 1.3). Cette croûte se forme similairement suite à l'exposition aux UV profonds, mais aussi suite aux différentes réactions qui activent la surface.

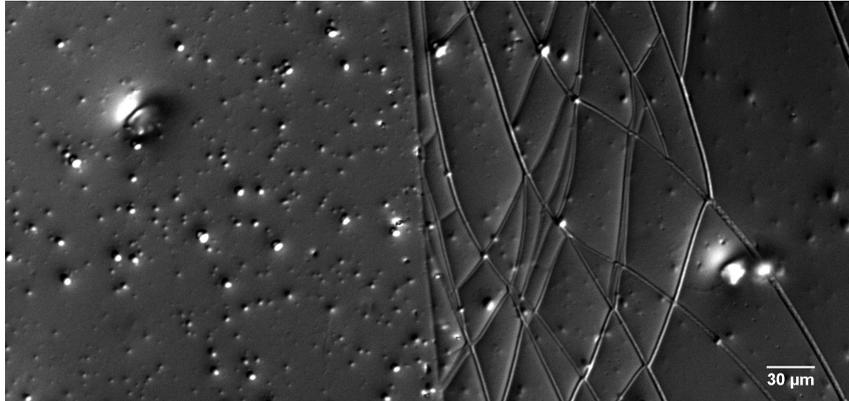


FIGURE 1.3 – Effet du plasma sur le PDMS. À gauche le PDMS n'a pas été exposé au plasma, à droite le plasma a formé une fine "croûte" de DPMS rigide.

J'ai alors essayé la méthode d'impression par micro contact (Micro Contact Printing, MCP [61]), dans laquelle les protéines d'intérêt sont adsorbées à la surface d'un tampon en PDMS rigide, que l'on vient plaquer contre la surface à "imprimer", la surface de PDMS peu rigide dans notre cas (voire le protocole en annexe A.2). Les résultats étaient encourageants, puisque des motifs d'adhérence en H ou en I étaient relativement bien formés, et que certaines cellules y adhéraient (figure 1.4). Le protocole restait toutefois à affiner pour obtenir un meilleur contraste d'adhésivité de la surface, et je me suis entre temps concentré sur le développement d'une technique d'analyse quantitative d'images de fluorescence (voir la Partie II).

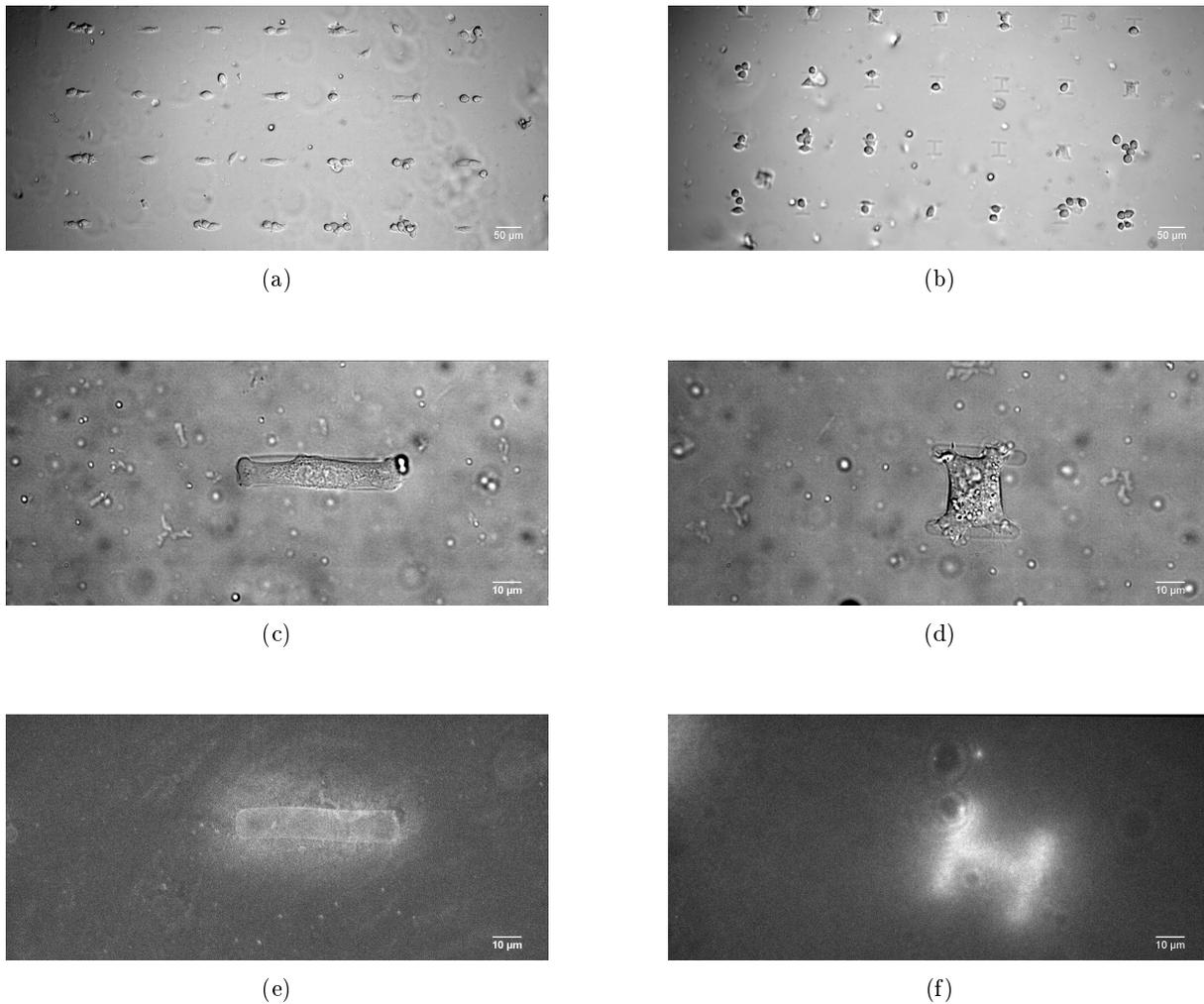


FIGURE 1.4 – Patronage micrométrique. Cellules MYF sur des motifs en I (a), ou en H (b) en plein champ. Zoom sur des cellules ayant adhéré à un motif en I (c) et en H (d). Fibrinogène fluorescent marquant le dépôt de fibronectine sur les 2 types de motifs (e & f). Le motif en (f) correspond à la même lamelle que celle du motif en (d), mais les positions sont différentes.

Enfin, outre la formation de motifs d'adhérence correctement formés et générant un contraste d'adhérence suffisant pour contrôler la forme des cellules, le positionnement des motifs d'adhérence relatif aux micropiliers doit être maîtrisé. Ce point reste une difficulté de taille, et une possibilité pour la surmonter serait la mise au point d'un logiciel qui acquerrait automatiquement les images en plein champ pour repérer la position des piliers relativement peu organisés spatialement. Ce logiciel contrôlerait une matrice de micro-miroirs (digital micromirror device, DMD) pour structurer spatialement le faisceau laser, ainsi que la platine de microscope pour illuminer automatiquement à la bonne position les zones où des protéines se grefferaient à la surface du substrat.

Chapitre 2

Un autre type de stimulation : les ondes acoustiques

2.1 Motivations, brève revue des effets des ultrasons

Nos substrats actifs nous permettent de stimuler mécaniquement des cellules via la surface sur laquelle elles adhèrent avec une fréquence temporelle de l'ordre de la seconde, et une étendue spatiale de l'ordre de la dizaine de microns. Pour augmenter la fréquence des stimulations, et éventuellement réduire leur étendue, nous avons essayé de mettre au point un dispositif qui nous permettrait de stimuler mécaniquement les cellules via des ultrasons à la surface du substrat. Ce projet résulte des observations préliminaires de billes de $3\ \mu\text{m}$ en solution, déposées sur une lamelle de verre, sur laquelle un transducteur piézoélectrique était fixé et émettait des ondes acoustiques (figure 2.1). On observait alors l'organisation des billes en bandes espacées d'environ $50\ \mu\text{m}$. L'hypothèse émise pour expliquer ce phénomène était que les ondes acoustiques formaient des ondes stationnaires à la surface de la lamelle, et que les billes s'agrégeaient au niveau des nœuds ou des ventres de ces ondes stationnaires. Si tel était le cas, nous pourrions alors observer l'effet de ces ondes stationnaires lorsque des cellules adhéraient à la surface. Si les longueurs d'onde étaient de l'ordre de la taille des cellules, celles-ci pourraient migrer vers les nœuds ou les ventres. Si les longueurs d'onde étaient plus petites que la taille des cellules, peut-être les composants internes des cellules iraient préférentiellement vers les nœuds ou les ventres selon le type et la taille des composants, ou bien des voies de signalisation s'activeraient à ces endroits là.

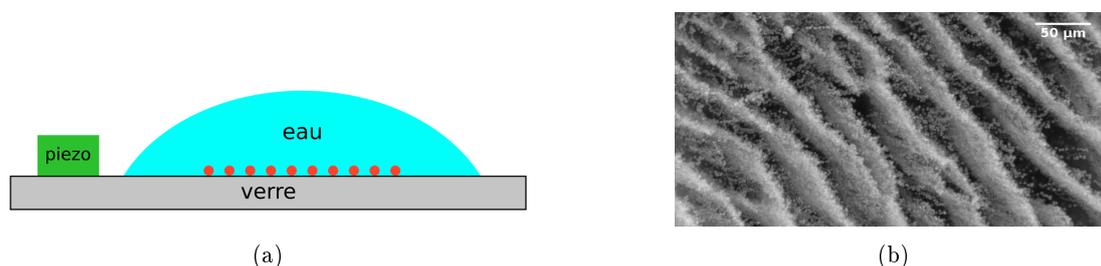


FIGURE 2.1 – (a) : Montage préliminaire où les bille micrométriques (rouge) sont déposées en solution à la surface d'une lamelle. (b) : Les billes forment des bandes espacées de $50\ \mu\text{m}$ environ lorsque la lamelle est excitée dans le kHz.

En effet les ultrasons sont connus pour avoir des effets en biologie qui diffèrent grandement selon leur puissance et leur mode d'application. Aux hautes puissances (plus de $2000\ \text{mW cm}^{-2}$), les ultrasons sont utilisés en médecine pour leurs effets thermiques sous la forme d'ultrasons focalisés à haute intensité (HIFU pour high-intensity focused ultrasound) pour l'ablation des tumeurs ou la désagrégation de caillots [62, 63]. Dans ce cas là un faisceau d'ultrasons est focalisé dans un volume de l'ordre du mm^3 , ce qui a pour effet d'augmenter la température au delà de $55\ ^\circ\text{C}$ et d'induire une nécrose des tissus.

Aux puissances plus modérées, l'augmentation de température due à la conversion directe de l'énergie acoustique en énergie thermique est de quelque dixièmes de degré à quelques degrés. Les ultrasons ont alors montré un effet favorable sur la réparation de fracture osseuse et la réparation de tissus mous [64]. De plus les ultrasons peuvent induire de la cavitation, c'est-à-dire qu'ils peuvent créer des bulles de gaz, dont le volume oscille avec la propagation de l'onde mécanique et les cycles de sur-pression / dépression. On distingue 2 types de cavitation : la cavitation inertielle et la cavitation non-inertielle. La première à lieu aux hautes puissances, une bulle est créée et son rayon augmente rapidement avec l'augmentation de la dépression induite par l'onde acoustique, jusqu'à ce que la bulle s'effondre sur elle même et produise une onde de choc. Cela produit une forte augmentation locale de la température et des flux rapides de liquide qui peuvent dégrader les solides alentours [65]. La cavitation non inertielle se produit à des puissances plus faibles, et les bulles créées sont plus stables et leur volume oscille autour de leur volume d'équilibre pendant plusieurs cycles. Ces oscillations peuvent produire une faible augmentation de température, un micro flux (micro-streaming) et des contraintes de cisaillement [66]. Les effets thermiques et les contraintes générés par la cavitation peuvent dégrader les biomolécules telles que l'ADN [67] et lyser les cellules [68].

Aux puissances encore plus faibles (moins de 1000 mW cm^{-2}), où il n'y a pas de cavitation, les ultrasons sont employés sous la forme d'ultrasons de faible intensité (LIUS pour Low Intensity UltraSound) et d'ultrasons pulsés de faible intensité (LIPUS pour Low Intensity Pulsed UltraSound). Parmi les effets remarquables, on peut noter l'utilisation des LIUS pour moduler l'activité des neurones in-vivo à travers le crâne de mammifères [69, 70]. Les LIPUS ont eux montré des effets bénéfiques in-vivo sur la réparation de fractures osseuse [71, 72], et de nombreuses études in-vitro ont mis en évidence leurs effets sur les cellules osseuses. Par exemple, les LIPUS favorisent la production par des ostéoblastes de facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), de facteurs de croissance de fibroblastes basiques (bFGF) et d'interleukine-8 (IL-8) [73], qui induisent la prolifération et la migration de cellules impliquées dans l'angiogenèse. Les LIPUS et les LIUS stimulent la différenciation de cellules souches mésenchymales (MSC) en chondrocytes [74, 75] ainsi que la production de collagène [74, 76, 77]. Les LIPUS favorisent la production d'alpha et beta intégrines [78, 79, 80], qui sont des mécanosenseurs membranaires, et induisent la formation d'adhérences focales par l'activation de la kinase Rac1 [81, 82]. Les intégrines et les récepteurs type I aux angiotensines II (ATI) [83] semblent essentiels à la réponses aux ultrasons, car ils permettent la phosphorylation de kinases d'adhérences focales (FAK) Erk1/2, PI3K et Akt [76, 84] qui vont ensuite augmenter l'expression des gènes codants pour des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la migration des ostéoblastes [85, 86]. Les LIPUS augmentent par ailleurs la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui peut augmenter la concentration intracellulaire de calcium [87, 88], qui est un messager secondaire important impliqué notamment dans la prolifération cellulaire et l'augmentation de protéoglycanes dans les chondrocytes après stimulation par LIPUS [89, 90]. Les LIPUS ont été par ailleurs utilisés pour compacter de l'ADN circulaire en le sur-enroulant [91], et ils ont montré un effet de fluidisation du cytosquelette d'acto-myosine et de modification de la morphologie des cellules [92, 93]. Plus récemment, KUMETA *et al.* ont montré que des ondes acoustiques aux fréquences audibles modifiaient l'expression de gènes impliqués dans la mécanotransduction ou connus pour avoir une plus grande expression après application de LIPUS [94]. Bien que les puissances acoustiques en jeu soient remarquablement importantes, on peut noter que la réponse varie avec le type cellulaire, et qu'elle dépend plus fortement de la forme de l'onde et de son amplitude que de la fréquence employée.

Les ultrasons semblent donc un moyen prometteur pour stimuler mécaniquement les cellules via leur substrat et observer leur réponse mécanique et biochimique.

2.2 Montages expérimentaux et limites

Nous souhaitons mettre au point un dispositif compatible avec l'observation en microscopie de fluorescence de cellules vivantes, et qui nous permettrait de stimuler mécaniquement ces cellules par des ondes acoustiques de surface, via leur substrat. Lors de ce projet nous avons collaboré étroitement avec des membres de l'équipe DYnamique des Fluides COMplexes et Morphogénèse (DYFCOM) au sein du

LIPhy, spécialistes des ultrasons et de la manipulation d'objets en solution par les ondes acoustiques. Nous avons tout d'abord simplement utilisé un transducteur provenant d'un buzzer que l'on disposait à la surface de PDMS mou (mélange réticulant :base 1 :40, de module d'Young $E = 20$ kPa, figure 2.2a). Les longueurs d'onde que l'on peut espérer observer selon la fréquence d'excitation du transducteur sont données par :

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (2.1)$$

où f est la fréquence des ondes (et du transducteur), et c est la célérité, donnée par :

$$c = \sqrt{\frac{\chi}{\rho}} \quad (2.2)$$

où ρ est la densité du milieu et χ est son coefficient d'élasticité, qui dépend du type d'onde considéré. Pour des ondes de volume, on remplace χ par E , le module d'Young du matériau, et pour des ondes de surface on choisit G le module de cisaillement. Nous avons utilisé les paramètres des expériences de nos collaborateurs pour calculer les fréquences à employer lors de nos expériences. Ils utilisaient un PDMS dur (mélange réticulant :base 1 :10) dont le module d'Young valait $E_1 = 1$ MPa, et observaient des ondes stationnaires à $\lambda_1 = 5$ mm et $f_1 = 5$ kHz, donc les ondes se propageaient à une vitesse de $c_1 = 25$ m s⁻¹. Comme notre PDMS a un module d'Young de $E_2 = 40$ kPa, la célérité des ondes était de $c_2 = 5$ m s⁻¹ et aux même fréquences d'excitation la longueur d'onde était de $\lambda_2 = 1$ mm. Pour observer des ondes dont $\lambda = 20$ μm, il fallait exciter le transducteur à $f \approx 250$ kHz. Cependant aucune formation de bandes de billes n'a été observée. De plus, il est apparu que les observations de bandes de billes lors de l'expérience préliminaire étaient dues à des instabilités de l'interface eau/air, qui par convection réorganisaient les billes micrométriques.

Nous avons donc décidé d'employer 2 transducteurs espacés d'au maximum 1 mm pour éviter que les ondes ne soient trop atténuée dans le PDMS et pour favoriser l'observation directe d'ondes stationnaires (figure 2.2b). L'observation directe des ondes stationnaires est réalisée par contraste de phase, et sur ce montage 2 transducteurs sont maintenus contre du PDMS mou par 2 plaques de plexiglas et une couche de PDMS dur pour assurer le contact mécanique. Les transducteurs sont commandés par un amplificateur capable de délivrer une tension sinusoïdale de 100 V crête à crête entre 250 kHz et 1 MHz. Malheureusement l'expérience n'a pas fonctionné, aucune onde sur le PDMS mou n'était visible par contraste de phase.

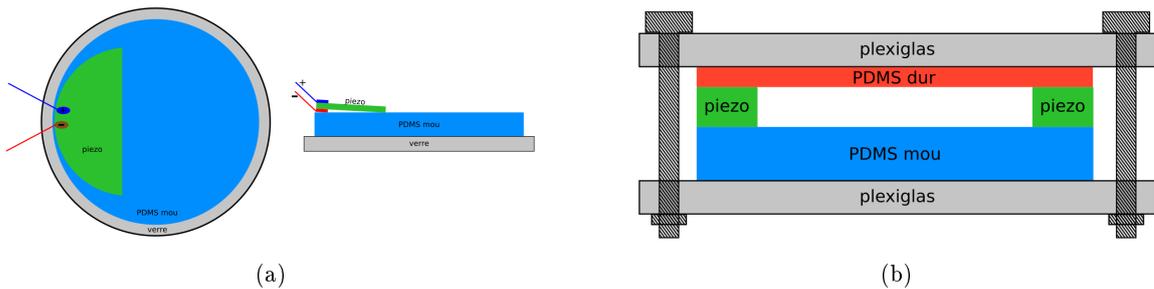


FIGURE 2.2 – (a) : Premier montage où l'élément piézoélectrique d'un buzzer était collé sur la surface en PDMS mou. Les soudures décollent légèrement le transducteur du PDMS mais ce dernier adhère facilement au transducteur. (b) : Montage pour observer les ondes stationnaires. Les transducteurs sont pris entre le substrat en PDMS mou et le PDMS dur qui assure un bon contact mécanique. Le tout est compris entre 2 plaques de plexiglas serrées par des boulons (hachures). On utilise un microscope à contraste de phase pour observer les ondes stationnaires.

Il s'avère que le PDMS mou dissipe trop fortement les ondes pour observer des ondes stationnaires sur 1 mm. Nous avons alors changé de stratégie et essayé d'utiliser des bulles pour agir comme des résonateurs secondaires créant localement des ondes [95]. Les cellules doivent alors adhérer sur un substrat de faible module de cisaillement et faiblement dissipatif tel que la gélatine. Des bulles sont coincées entre la surface de la gélatine et le plafond sur lequel est collé un transducteur. Leur taille est choisie de telle façon que

leur fréquence de résonance est celle avec laquelle on excite le transducteur. Elles excitent à leur tour mécaniquement la surface à proximité des cellules (figure 2.3a). La taille des bulles est calculée avec la formule de Minnaert [96] :

$$f_{res} \times R_{bulle} \approx 3 \text{ m s}^{-1} \quad (2.3)$$

pour les bulles sphériques dans l'eau. Cependant on peut aussi piéger les bulles dans des puits [97], et si les bulles sont aplaties (figure 2.3b) la formule de Minnaert devient

$$f_{res} \times R_{bulle} \approx 1,5 \text{ m s}^{-1} \quad (2.4)$$

Nous recherchons un module de cisaillement le plus faible possible pour atteindre des longueurs d'onde de l'ordre de la dizaine de microns sans devoir employer des fréquences trop hautes pour requérir une instrumentation spécialisée. Le matrigel, la pectine, l'acide hyaluronique et la gélatine nous permettent d'atteindre un module de cisaillement de 500 Pa. Leur densité est comparable à celle de l'eau, et nous souhaitons obtenir des longueurs d'onde d'environ 20 μm . Les bulles devaient alors avoir un rayon donné par :

$$R_{bulle} = \frac{1.5}{f_{res}} = 1.5 \times \frac{\lambda_{cis}}{C_{cis}} = \sqrt{\frac{\rho}{G}} \times 1.5 \times \lambda_{cis} = 42 \mu\text{m} \quad (2.5)$$

Notre choix s'était porté sur la gélatine car elle est moins chère que les autres composants cités précédemment, elle est facilement disponible et aussi facile d'utilisation. Cependant la gélatine fond à 37°C, ce qui exclue son utilisation pour des expériences sur des cellules vivantes. Nous nous sommes alors tournés vers le polyacrylamide (PAA), qui permet d'obtenir des substrats de module de cisaillement $G = 4 \text{ kPa}$, et qui est utilisé par de nombreux membres de notre équipe quotidiennement. Le passage de 500 Pa à 4 kPa implique un rayon des bulles seulement 3 fois plus petit environ, et des fréquences 3 fois plus grandes.

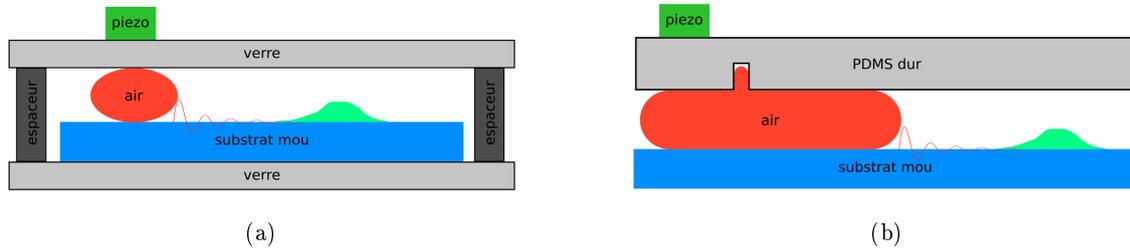


FIGURE 2.3 – (a) : Un transducteur envoie une onde à travers la lamelle de verre. Cette onde est réémise vers le substrat mou par les bulles qui jouent le rôle de résonateurs secondaires. Il faut adapter leur taille pour accorder leur fréquence de résonance à la fréquence du transducteur. Les cellules (cyan) sentent les ondes via le substrat. (b) On peut contrôler la position des bulles en les piégeant dans des puits. Lorsque les bulles sont cylindriques et non plus sphériques, leur fréquence de résonance est différente pour un même diamètre.

L'enjeu était alors d'obtenir des bulles d'une taille donnée dans une chambre microfluidique où des cellules adhèrent à un substrat en PAA. 2 stratégies ont alors été expérimentées : soit le substrat en PAA était polymérisé sur la lamelle, puis une chambre en PDMS avec un plafond en relief permettant de piéger les bulles était collée à la lamelle [98]; soit une chambre en PDMS était directement collée sur la lamelle, puis le PAA était polymérisé dans la chambre [99]. Pour cette dernière méthode nous injectons par une entrée le PAA, et par une deuxième entrée de l'huile afin d'éviter que le PAA n'obstrue l'entrée et la sortie de la chambre, et qu'il ne polymérise dans le volume complet de la chambre (figure 2.4a). En employant un microscope confocal nous ne sommes pas parvenus à évaluer la hauteur et l'état de polymérisation du PAA dans la chambre. Nous avons alors opté pour la première stratégie, qui consiste à polymériser le PAA sur la lamelle puis rajouter une chambre en PDMS par dessus (figure 2.4b).

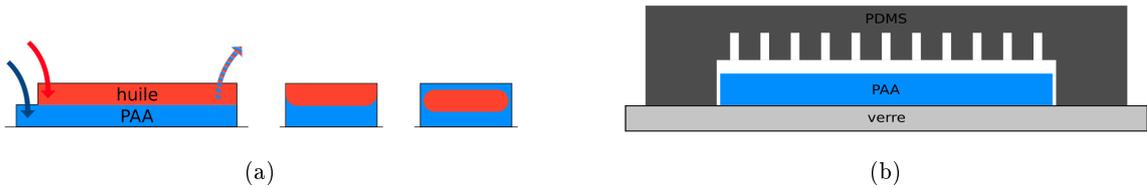


FIGURE 2.4 – (a) : Pour obtenir un substrat dans une chambre macrofluidique, on peut polymériser du PAA dans la chambre avec un flux d’huile pour éviter la polymérisation dans l’ensemble du volume. Nous ne parvenons cependant pas à déterminer comment la polymérisation s’est effectuée et quelles zones le PAA occupe (milieu et droite). (b) Une autre méthode consiste à polymériser le PAA sur une lamelle, puis à rajouter la chambre en PDMS. Le plafond de cette chambre est structuré pour pouvoir retenir les bulles aux positions voulues.

Pour produire une chambre avec des reliefs au plafond permettant de capturer les bulles d’air comme dans la figure 2.4b, nous avons employé une résine de prototypage rapide (SmoothCast 300) qui permet de créer des patrons plus rapidement et plus facilement que la méthode classique en salle blanche (figure 2.5). Pour cela on coule du PDMS dans une boîte de pétri, le PDMS polymérise au four, et on découpe et retire les zones qui formeront les reliefs positifs de la résine. On verse ensuite le mélange base + réticulant de la résine de prototypage dans la boîte de pétri, et on laisse cette résine polymériser à température ambiante. On retire ensuite la résine dure que l’on peut placer dans une nouvelle boîte de pétri dans laquelle on verse de nouveau du PDMS à polymériser. En retirant le patron en résine, on peut réitérer les cycles de découpe de PDMS, polymérisation de résine, et polymérisation de PDMS pour obtenir des patrons comprenant plusieurs couches de reliefs. Dans notre cas la patron est du PDMS silanisé pour ne pas adhérer au dernier mélange de PDMS qui formera la chambre. Une méthode encore plus rapide consiste à utiliser du scotch que l’on colle et coupe selon les reliefs que l’on souhaite obtenir, et on verse du PDMS que l’on cuit pour former le patron. Il faut ensuite là aussi silaniser le patron de PDMS obtenu avant de verser le PDMS qui constituera la chambre. Si ces techniques sont rapides, très abordables et simples à mettre en œuvre, elles ne permettent pas un contrôle précis de la hauteur des chambres ni des dimensions, formes et emplacements des puits au plafond des chambres. Il faut alors se tourner vers des protocoles de polymérisation de résine en salle blanche, certains permettant d’obtenir directement des chambres multi-étage. Ces protocoles sont cependant extrêmement compliqués, et il est plus simple de faire une chambre en 2 parties séparées : les murs latéraux, et le plafond dont le relief est donné par le patron fabriqué en salle blanche. On peut surexposer la résine pour obtenir des reliefs à plus large base, ce qui permet une meilleure adhérence entre la résine et le silicium, et surtout un meilleur décollement du PDMS (figure 2.5b). Avant de tester cette méthode pour fabriquer la chambre, qui demande tout de même la mise au point d’un photomasque et l’optimisation des paramètres de dépose et d’illumination de la résine, nous étudions la faisabilité d’un tel système avec une chambre simple et du PAA. Lorsque le PAA est polymérisé entre une lamelle de verre et du parafilm, l’épaisseur de substrat est trop importante, et la surface du PAA est trop haute par rapport à la profondeur de champ de l’objectif pour pouvoir être observée. Par ailleurs, lorsque le PAA est polymérisé sur toute la surface de la lamelle, la chambre en PDMS glisse sur le PAA, est lorsqu’elle est maintenue mécaniquement, l’étanchéité n’est pas satisfaisante. Pour palier à ce problème nous essayons d’abord de polymériser le PAA dans une chambre en PDMS haute de $50\ \mu\text{m}$, de retirer la chambre et de coller une chambre en PDMS haute de $100\ \mu\text{m}$, mais le PAA est arraché avec la première chambre. Nous polymérisons donc le PAA entre une lamelle de verre silanisée, sur laquelle le PAA va adhérer, et une petite lamelle de verre passivée, dont la plus grande hydrophilie va favoriser l’étalement d’un plus petit volume de PAA sur une plus grande aire, ce qui nous permet d’obtenir un substrat de faible épaisseur ($65\ \mu\text{m}$) sur une aire localisée. Nous utilisons alors 2 types de chambres avec ces substrats. Les premières chambres (figure 2.5c) ont un plafond simple, on utilise 2 lamelles de $16\ \text{mm}$ de diamètre collées entre elles pour contrôler la hauteur et la largeur des chambres. Le deuxième type de chambre (figure 2.5d) est constitué d’un cadre en PDMS de fine épaisseur ($\approx 1,5\ \text{mm}$) sur lequel on colle un plafond de PDMS de grande épaisseur ($\approx 5\ \text{mm}$). Le plafond utilisé est en l’occurrence le tampon en PDMS d’impression par micro contact que nous avons développé pour contrôler l’adhérence des cellules

sur les substrats actifs en PDMS mou (page 35). Ces micro reliefs sont un avantage car ils pourraient servir à capturer les bulles d'air. Nous vérifions que ces 2 types de chambres sont assez hautes pour ne pas toucher le substrat en PAA en injectant une solution de billes micrométriques dans les chambres et en observant les billes passer sur le substrat.

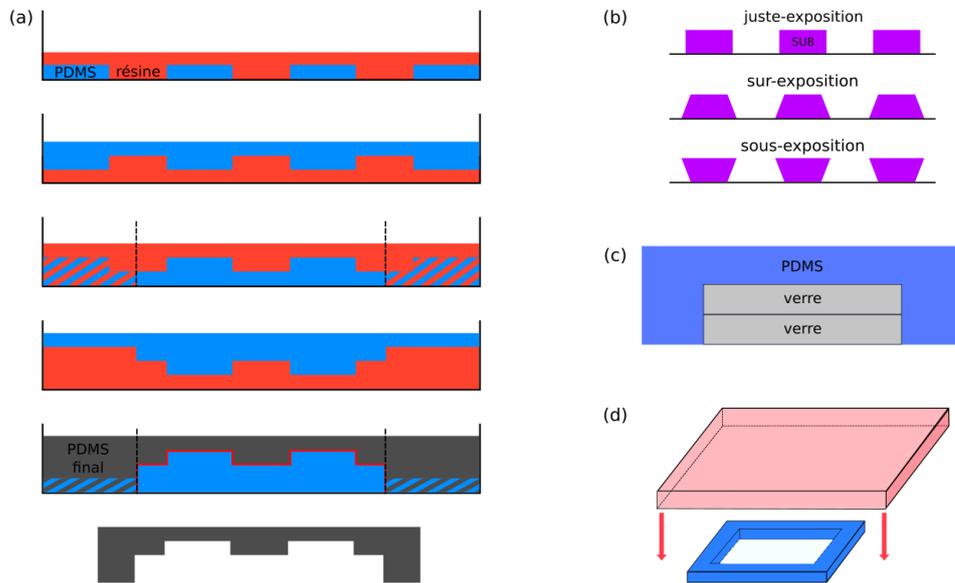


FIGURE 2.5 – (a) : Fabrication d'une chambre multi-étages avec la résine de prototypage rapide. (b) : Varier l'exposition aux UV de la résine SU8 en salle blanche permet de jouer sur la forme des plot du master qui servira à faire le plafond en PDMS de la chambre. (c) : un espaceur fin de PDMS est refermé par un plafond en PDMS de grande épaisseur. (d) : Une chambre simple en PDMS est réalisée en coulant du PDMS sur 2 lamelle de verre de plus grand diamètre que celles utilisées pour polymériser le PAA.

Pour avoir des bulles dans la chambre, le plus simple est de produire ces bulles à l'extérieur de la chambre puis de les injecter dans la chambre. Un surfactant tel que le Tween20 permet de stabiliser ces bulles, mais ce type de surfactant lyse les cellules, il est donc proscrit de l'employer. Les composants du milieu de culture cellulaire stabilisent bien les bulles, et leur formation est très simple : on aspire et on injecte à grande vitesse le milieu dans un tube contenant ce milieu. Cette méthode est rapide et simple, mais elle ne permet pas de contrôler la taille des bulles. Un système de concentration de flux permettant de contrôler la taille des bulles peut être utilisé, mais nous craignons finalement le passage même des bulles sur ou à proximité des cellules. À ces échelles micrométriques, les bulles peuvent arracher des protéines membranaires, ou au moins générer un flux lors de leur passage qui activerait des voies de signalisation cellulaire. Nous considérons alors de nucléer des bulles à partir du plafond de la chambre en y incluant des puits traversant le plafond, et en ajoutant une deuxième chambre par dessus pour contrôler la pression d'air.

Devant la difficulté à réaliser ces puits traversant et la complexité croissante des solutions que nous envisageons, nous changeons de direction et optons pour un système plus simple où un transducteur est collé à côté d'une chambre ouverte dans laquelle des cellules adhèrent sur du PAA (figure 2.6a) ; ou une configuration où le transducteur est collé sous la lamelle de verre au niveau du substrat (figure 2.6b). Il faut donc renverser la chambre, ce qui implique de la refermer par une deuxième lamelle de verre à travers laquelle on observe les cellules. Cette dernière configuration permet de transférer un maximum d'énergie du transducteur au substrat. Cependant il faut que l'épaisseur de PAA, de l'espaceur en PDMS et de la lamelle de verre soient en adéquation pour que la surface du PAA soit comprise dans la profondeur de champ de l'objectif.

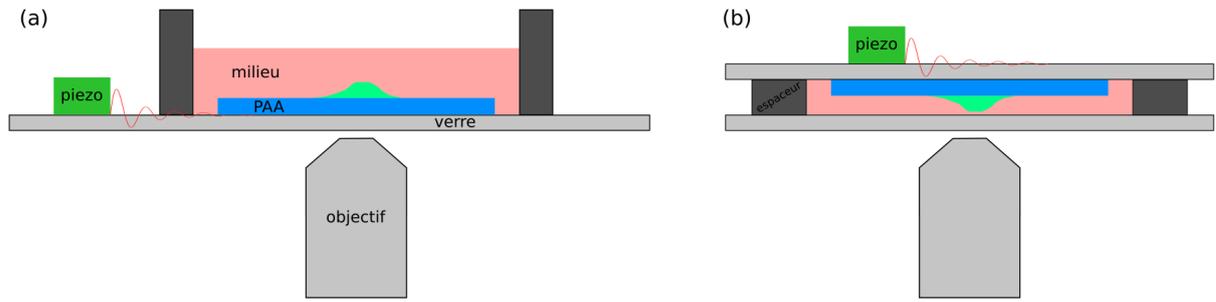


FIGURE 2.6 – (a) : Le montage le plus simple consiste à observer des cellules sur un substrat en collant un transducteur juste à côté. (b) : Le transducteur est collé de l'autre côté de la lamelle en regard du substrat. Pour observer les cellules il faut donc confiner le milieu avec une 2^e lamelle et renverser le tout.

C'est avec la configuration de chambre renversée que nous avons observé des mouvements latéraux de la surface de PAA. Avant d'ensemencer des cellules sur ces substrats, nous souhaitions vérifier si l'excitation de la lamelle sur laquelle avait polymérisé le substrat en PAA avait un effet sur ce dernier. Nous avons alors pu remarquer que les billes micrométriques fluorescentes incrustées à la surface du substrat décrivaient pendant le temps d'acquisition (500 ms) des trajectoires rectilignes, elliptiques ou circulaires selon que nous variions la zone observée ou la fréquence employée pour le transducteur (figures 2.7fa-f). L'amplitude des mouvements était maximale à la surface et pour des fréquences d'excitations comprises entre 1 et 8 kHz, avec un pic d'amplitude à 2 kHz.

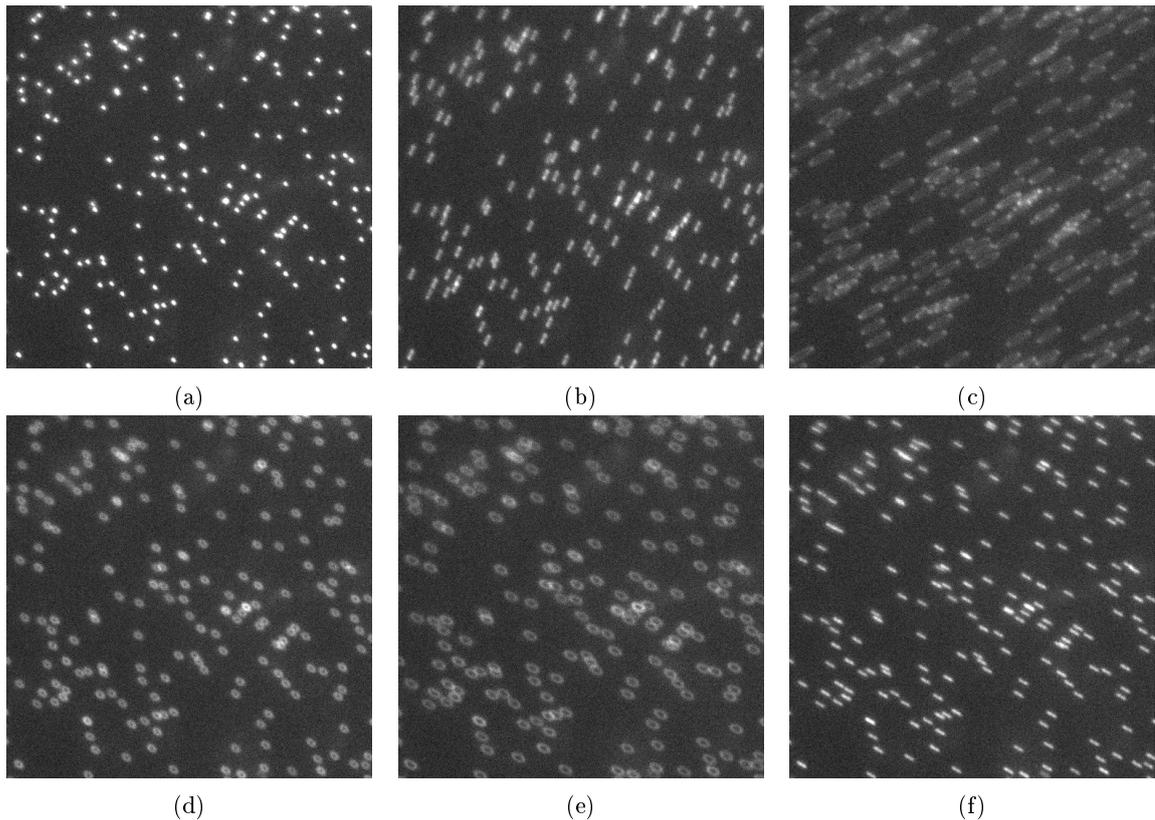


FIGURE 2.7 – Billes fluorescentes incrustées à la surface d'un substrat en PAA. Différentes trajectoires sont observées en changeant de zone d'observation sur le substrat pour une fréquence donnée, ou en variant la fréquence d'excitation sur une même zone d'observation.

Ce phénomène est probablement dû à 2 ondes stationnaires orthogonales et dont la différence de phase $\Delta\Phi$ varie localement (figure 2.8a). Lorsque $\Delta\Phi = 0$ la surface, et donc les billes fluorescentes qui y sont incrustées, a un mouvement rectiligne selon la bissectrice des directions de propagation des 2 ondes (figure 2.8b). Lorsqu'on s'éloigne de cette zone et que le déphasage augmente, les billes parcourent

une ellipse dans le sens trigonométrique qui s'élargit. Dans les zones où $\Delta\Phi = \pi/2$ les billes décrivent des cercles, et quand le déphasage augmente la surface décrit de nouveau une ellipse, mais selon la perpendiculaire à la première bissectrice. À $\Delta\Phi = \pi$ les trajectoires sont de nouveau rectilignes, et la surface suit les mêmes déformations aux déphasages négatifs, mais dans le sens contraire. À une fréquence de modulation du transducteur fixée, le déphasage varie spatialement. Cela suppose 2 ondes stationnaires orthogonales de fréquences différentes. L'origine de la différence de ces fréquences ne peut pas être le substrat, puisqu'il forme un disque qui n'introduit pas d'anisotropie. En revanche, l'espaceur en PDMS est rectangulaire et non carré, il est donc possible qu'il soit à l'origine des 2 ondes stationnaires de fréquences différentes. Pour comprendre pleinement ce phénomène, il faut par ailleurs considérer le couplage entre le PAA et le milieu liquide, et comprendre plus en détail comment l'onde mécanique se transmet entre le transducteur, le verre, le PAA, le milieu et la deuxième surface de verre. La compréhension théorique est donc ardue, mais ce système promet de pouvoir exciter mécaniquement les cellules adhérant au PAA selon différents modes / trajectoires d'excitation. Malheureusement l'amplitude de ce phénomène se dégradait avec les expériences successives, jusqu'à la disparition totale du phénomène. Une cause très probable est la dégradation du transducteur lors du collage à la lamelle de verre en employant de la colle cyanolite, et du décollage avec de l'isopropanol. Nous avons essayé différentes méthodes pour assurer un contact mécanique efficace en se passant de colle, mais aucune solution envisagée ne permettait de retrouver le phénomène de déplacement latéral de la surface du substrat. Nous avons tout de même observé avec ce montage des cellules adhérant sur des zones d'adhérence patronnées sur du PAA, ou adhérant directement sur du verre. Leur cytosquelette d'actine était marqué par le fluorophore YFP afin de déterminer si l'application d'ultrasons, même sans mouvements latéraux de surface, avaient une influence sur la morphologie des cellules ou l'organisation de leur cytosquelette. En définitive aucune différence notable n'a été observée entre les cellules contrôle et les cellules soumises aux ultrasons.

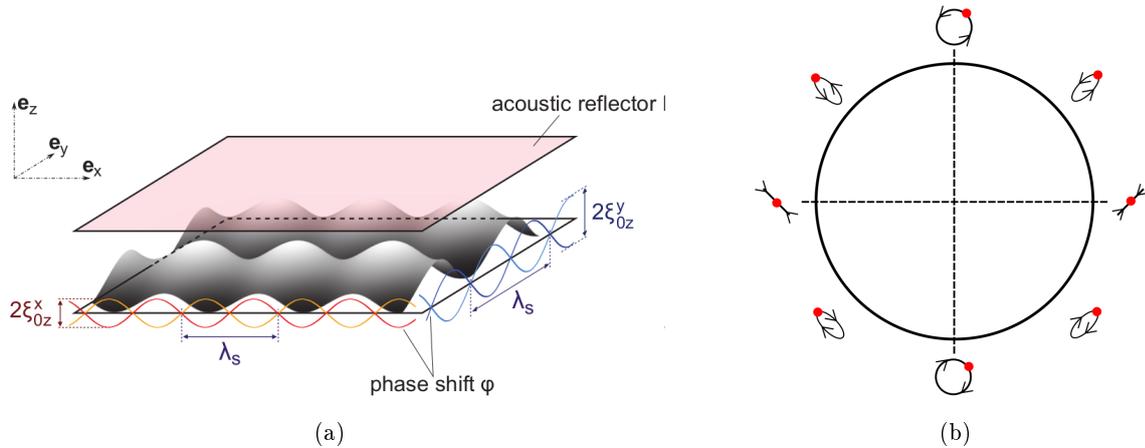


FIGURE 2.8 – Déphasage des ondes stationnaires croisées (a) : Ondes stationnaires croisées transversales, d'après [100]. Dans notre cas, les ondes stationnaires sont certainement longitudinales, il faut considérer les courbes rouges et bleues comme l'amplitude des 2 ondes transversales, et la surface en niveaux de gris comme le déphasage entre elles. (b) : Trajectoire d'une bille incrustée à la surface du PAA en fonction de la différence de phase des ondes stationnaires croisées.

Ce projet était très exploratoire, nous nous étions fixé un temps précis pour explorer cette voie, et nous avons atteint l'échéance. Nous avons donc décidé de suspendre les recherches sur ce sujet, et de nous concentrer sur l'analyse quantitative d'efficacité de FRET (voir Partie II). Par ailleurs, nous souhaitons stimuler les cellules exclusivement via leur substrat, mais les différentes méthodes essayées jusqu'ici présentent l'inconvénient de générer des ondes volumiques et des flux, qui peuvent représenter une stimulation mécanique difficile à évaluer. Ces flux sont directement produits par les bulles, ou ils sont générés par le couplage entre la surface oscillante du substrat et le milieu liquide de la chambre. On peut toutefois retenir certaines pistes pour la continuation future de ce projet :

- Utiliser un système de maintien en sandwich comme sur la figure 2.2b. Cela assure une bonne

transmission de l'énergie mécanique du transducteur au verre, tout en préservant la qualité du transducteur.

- Utiliser des feuilles de PDMS fabriquées par des fournisseurs spécialisés. Des épaisseurs de $100\ \mu\text{m}$ sont produites de manière reproductible. Cela permet la réalisation d'espaceurs en PDMS de géométrie et de propriétés rhéologiques reproductibles.
- Nous n'avons finalement pas testé la production d'une chambre en 2 parties, l'espaceur et le plafond, et dont les reliefs du plafond sont obtenus à partir des reliefs de résine sur silicium. Cette technique est très abordable techniquement, et combinée avec les feuilles de PDMS pour produire les espaceurs et promet une méthode pour produire des chambres telles qu'à la figure 2.4b permettant de contrôler la taille et la position des puits de manière reproductible.
- Beaucoup de tests ont échoué à cause de la faible profondeur de champ de l'objectif $\times 60$ d'une profondeur de champ de $220\ \mu\text{m}$. Maintenant que nous avons un objectif $\times 40$ d'une profondeur de champ de $300\ \mu\text{m}$ il est plus aisé de réaliser ces expériences. On peut utiliser des chambres renversées plus hautes, ou des chambres droites avec une plus grosse épaisseur de PAA.
- Toutes les expériences ont été réalisées en utilisant un transducteur piézoélectrique pour envoyer une onde mécanique vers des cellules. Une deuxième approche est possible en employant des substrats eux-mêmes piézoélectriques. Des matériaux comme le niobate de lithium (LiNbO_3) ou le tantalate de lithium (LiTaO_3) peuvent être utilisés comme lamelles sur lesquelles des électrodes, ou transducteurs inter digités (IDT), sont collées. Lorsqu'un courant alternatif passe par ces électrodes, ces matériaux se contractent et se dilatent en réponse et génèrent des ondes qui se propagent en volume ou en surface. Comme ces matériaux ont une rigidité comparable au verre, il faut employer des fréquences qui vont de la dizaine de MHz jusqu'au GHz pour obtenir des longueurs d'onde comparables à la taille des cellules. Ces hautes fréquences demandent une instrumentation particulière et des problèmes d'interférences électromagnétiques peuvent survenir. Pour contourner ce problème on peut coller une chambre en PDMS à la lamelle, et exciter cette dernière à des fréquences plus faibles. L'énergie mécanique est alors transmise au PDMS, où la vitesse des ondes mécaniques et les longueurs d'ondes obtenues sont plus faibles.

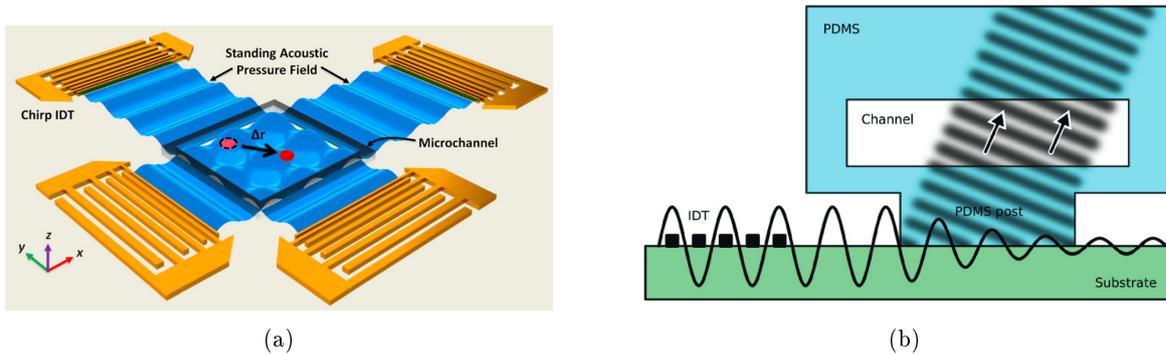


FIGURE 2.9 – (a) : Des IDT sont employés pour générer des ondes stationnaires d'axes orthogonaux. Des éléments sont alors piégés dans les nœuds des ondes croisées. (b) : Un IDT est utilisé pour générer une onde transmise à une chambre en PDMS. La plus faible célérité des ondes dans le PDMS induit une diminution des longueurs d'onde. D'après [101] et [102].

Deuxième partie

FRET quantitatif

Pour étudier la mécanotransduction, nous avons mis au point des substrats actifs qui nous permettent de contrôler localement et dynamiquement la stimulation mécanique des cellules. Ces substrats nous permettent aussi de lire la réponse mécanique de ces cellules par TFM. Afin de comprendre les processus à l'œuvre dans la réponse des cellules aux stimuli mécaniques, nous avons besoin d'observer la réponse biochimique des cellules. Nous avons besoin de voir comment certaines protéines vont se réorganiser spatialement à l'intérieur de la cellule, comment leur concentration va varier localement ou comment certaines protéines vont changer d'état d'activité. Les deux premiers points sont relativement simples à étudier, notamment par microscopie de fluorescence plein champ. Cependant, l'observation de l'activité des protéines demande une instrumentation et des techniques d'analyse plus spécifiques.

Nous allons voir en effet que ce qui stocke ou transmet l'information dans une cellule n'est pas forcément la simple présence d'une protéine à un endroit donné, mais son état d'activité. Une protéine peut être présente dans le cytoplasme d'une cellule à l'état inactif, et elle peut passer à l'état actif et interagir avec d'autres protéines suite à un certain signal, purement mécanique ou provenant de protéines qui ont elles-mêmes été activées. Les protéines interagissant ensemble forment un *réseau de signalisation*, au sein duquel des réactions en chaîne d'activation / désactivation de protéines ont lieu, appelées *cascade de signalisation*.

C'est pour étudier la dynamique de ces réseaux de signalisation, comment l'information biochimique se propage dans le temps et dans l'espace suite à une stimulation mécanique, que nous employons des rapporteurs d'activité. Ces rapporteurs changent de conformation selon l'état d'activité d'une protéine d'intérêt, typiquement un "nœud" du réseau de signalisation, et nous mesurons ce changement de conformation au moyen d'une technique de microscopie de fluorescence exploitant le phénomène de transfert résonnant d'énergie de fluorescence, ou *FRET* pour Fluorescence Resonant Energy Transfer.

Une grande partie de ma thèse a été consacrée à la mise au point d'une technique d'analyse quantitative des images de microscopie de fluorescence. Le chapitre 3 présente les principes du phénomène de fluorescence et de FRET en particulier, ses applications en biologie et les nombreuses techniques de mesure d'efficacité de FRET. Le chapitre 4 est lui consacré à notre montage expérimental, à la théorie de l'analyse des images de microscopie et à sa mise en pratique. Nous comparons enfin notre méthode d'analyse avec les méthodes préexistantes au moyen de standards FRET, et nous étudions l'effet des paramètres d'acquisition et d'analyse des données sur les mesures obtenues.

Chapitre 3

État de l'art et présentation générale du FRET

3.1 Introduction à la fluorescence

Certaines molécules appelées fluorophores sont capables d'émettre de la lumière après en avoir absorbé. Pour comprendre ce phénomène il convient de le présenter sur un diagramme de Jablonski, qui permet de visualiser les transitions entre les états électroniques du fluorophore.

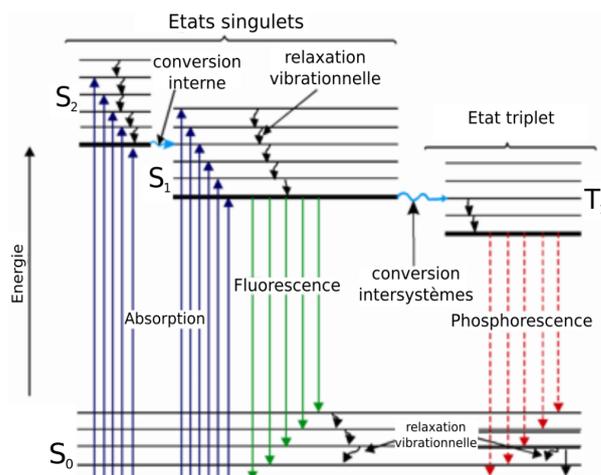


FIGURE 3.1 – Diagramme général de Jablonski, d'après [103]

Lors de l'absorption d'un photon, un électron de l'état électronique fondamental S_0 passe dans un des états vibrationnels des états électroniques S_1 ou S_2 par transition radiative (figure 3.1 flèches bleues). Il rejoint alors l'état vibrationnel le plus bas de son état électronique en *relaxant* par transition non radiative en dissipant de l'énergie aux molécules environnantes (flèches noires). La conversion interne est le passage de S_2 à S_1 par transition non radiative (flèche cyan), elle s'effectue généralement au bout de 10^{-12} s. Après un temps typique de 10^{-8} s, l'électron relaxe vers un des états vibrationnels de S_0 par transition radiative, il y a émission d'un photon : c'est la *fluorescence*. L'électron relaxe finalement dans l'état fondamental de S_0 par transition non radiative. Il peut arriver en S_1 que l'électron change de spin et passe dans l'état "interdit" *triplet* T_1 lors d'une transition non radiative appelée *conversion intersystèmes*. Dans l'état triplet l'électron a un spin identique à celui auquel il était apparié dans l'état fondamental, contrairement aux états singulets S_0 , S_1 et S_2 où l'électron garde un spin opposé. Le temps de vie dans l'état triplet se situe entre 10^{-3} s et 10^{-2} s, c'est l'émission d'un photon suite à la transition radiative vers l'état S_0 qu'on nomme *phosphorescence*.

Les temps de vie des différents états sont à l'origine de propriétés largement répandues parmi les

fluorophores : Le temps typique pour un électron pour redescendre à l'état vibrationnel le plus bas de S_1 est bien plus court que le temps de vie de fluorescence. Ainsi en général l'émission d'un photon se fait à partir de l'état vibrationnel le plus bas de S_1 , c'est la *loi de Kasha*. Ceci a pour conséquence que le spectre d'émission d'un fluorophore ne dépend pas de la longueur d'onde des photons absorbés. Une autre conséquence est la *règle de Vavilov* qui stipule que le rendement quantique est indépendant de la longueur d'onde des photons absorbés.

En addition de ce phénomène, les fluorophores redescendent généralement vers des états vibrationnels supérieurs à l'état le plus bas de S_0 avant de rejoindre l'état fondamental de manière non radiative. L'ensemble des pertes non radiatives d'énergie se traduisent par une énergie plus faible du photon émis par rapport à celle du photon absorbé. Les spectres d'absorption et d'émission sont donc décalés : c'est le *décalage de Stokes*.

Par ailleurs les temps de vie de fluorescence sont trop courts pour que le noyau bouge significativement avant l'émission du photon (principe de Franck-Condon). Cela implique que les niveaux vibrationnels des états excités sont similaires aux niveaux vibrationnels de l'état fondamental (figure 3.2). Le spectre d'émission est alors une image en miroir du spectre d'excitation.

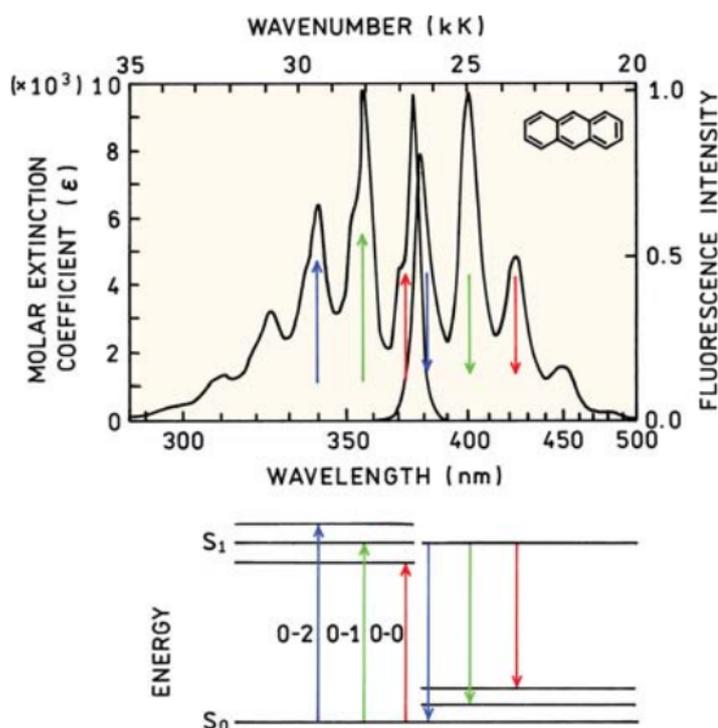


FIGURE 3.2 – Spectres d'absorption et d'émission de l'anthracène. Le principe de Franck-Condon implique que les états vibrationnels des différents états électroniques sont semblables, d'après [104]

Un fluorophore est caractérisé par :

- son coefficient d'extinction molaire ϵ : il indique l'efficacité avec laquelle un fluorophore absorbe les photons d'une certaine longueur d'onde, en $M^{-1}cm^{-1}$
- son rendement quantique Φ : c'est le ratio entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Si on note k_r le taux d'émission du fluorophore et k_{nr} le taux de transitions non radiatives vers S_0 (figure 3.3), alors

$$\Phi = \frac{\text{\#photons émis}}{\text{\#photons absorbés}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (3.1)$$

le rendement quantique représente aussi la proportion de fluorophores qui émettent un photon parmi ceux qui en ont absorbé, à cause du décalage de Stokes il ne représente pas le ratio d'énergie émise

sur celle absorbée.

- le temps de vie τ est le temps caractéristique pendant lequel le fluorophore reste dans l'état excité. Il est défini par

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (3.2)$$

et dans les cas simples la population des états excités $[S1]_t$ suit une dynamique du premier ordre :

$$[S1]_t = [S1]_{t=0} e^{-t/\tau} \quad (3.3)$$

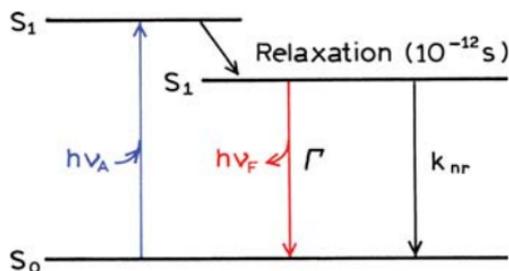


FIGURE 3.3 – La relaxation à l'état vibrationnel le plus bas d'un état électronique prend typiquement 10^{-12} s. Le fluorophore se désexcite ensuite par voie radiative (ici Γ est le taux d'émission) et non radiatives (de taux k_{nr}), d'après [104]

L'intensité de fluorescence d'un fluorophore peut être réduite par le phénomène de *désactivation* (quenching en anglais). Celui-ci peut-être dû aux transitions non radiatives $S_1 \rightarrow S_0$, comme la désactivation collisionnelle (ou de Dexter). Lors de cette désactivation, le fluorophore dans l'état excité F^* perd son excitation au contact d'une autre molécule D dans le solvant :



Pour les désactivations intermoléculaires, la baisse d'intensité de fluorescence est donnée par l'équation de Stern–Volmer :

$$\frac{I_f^0}{I_f} = 1 + K[D] = 1 + k_d \tau_0 [D] \quad (3.5)$$

avec :

I_f^0 intensité de fluorescence en absence de désactivateur

I_f intensité de fluorescence en présence de désactivateur

K constante de désactivation de Stern–Volmer, qui indique la sensibilité d'un fluorophore à un désactivateur

$[D]$ concentration de désactivateur

k_d coefficient du taux de désactivation

τ_0 temps de vie du fluorophore en absence de désactivateur

La désactivation peut aussi se former avant même l'excitation d'un fluorophore. Celui-ci peut en effet former un complexe dans son état fondamental avec le désactivateur. Ce complexe est alors non fluorescent ou présente un spectre d'absorption différent de celui du fluorophore unique. On parle alors de désactivation statique puisqu'elle ne repose pas sur la diffusion et la collision entre molécules.

3.2 Principe du FRET

Il existe une dernière voie de désexcitation des fluorophores : le *Transfert d'Énergie par Résonance* ou FRET pour Fluorescence (ou Förster) Resonance Energy Transfer. Cette désexcitation est un transfert *non radiatif* d'énergie entre un fluorophore excité donneur (D) et une molécule, généralement aussi un fluorophore, appelé accepteur (A). Il peut avoir lieu lorsque le spectre d'émission du fluorophore donneur recouvre au moins partiellement le spectre d'excitation de l'accepteur, et lorsque les deux molécules sont assez proches l'une de l'autre, typiquement 5 nm. Il ne faut pas se tromper en pensant que la condition de recouvrement des spectres implique que le transfert d'énergie s'effectue par émission d'un photon par le donneur et absorption du photon par l'accepteur. Le transfert d'énergie se fait par interaction dipôle-dipôle : le donneur est un dipôle qui oscille et qui peut échanger de l'énergie avec un autre dipôle ayant une fréquence de résonance proche. Cette interaction dipôle-dipôle implique par ailleurs une dépendance du taux de transfert d'énergie k_T à l'orientation relative entre les 2 fluorophores. Ce taux de transfert entre un donneur et un accepteur est donné par :

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N_A n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.6)$$

avec :

k_T taux de transfert d'énergie

r distance entre le donneur et l'accepteur

Q_D rendement quantique du fluorophore donneur en absence de l'accepteur

κ^2 orientation relative entre le donneur et l'accepteur, qui vaut théoriquement $\kappa^2 = 2/3$ pour des fluorophores dont la diffusion rotationnelle est libre

τ_D temps de vie du donneur en absence de l'accepteur

N_A nombre d'Avogadro

n indice de réfraction du milieu, on considère 1.4 dans le cytoplasme

F_D densité spectrale d'émission normalisée du donneur, c'est-à-dire l'intensité émise entre λ et $\lambda + \Delta\lambda$ divisée par l'intensité émise totale

ϵ_A coefficient d'extinction molaire de l'accepteur

L'intégrale de recouvrement $J(\lambda)$ exprime le degré de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur :

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.7)$$

On peut définir R_0 le rayon de Förster où le taux de transfert d'énergie vaut la moitié du taux maximal, il se situe généralement autour de 5-10nm. Dans cette condition le taux de transfert est égal à la somme des autres taux de désexcitation $k_T(r) = \tau_D^{-1}$, donc d'après (3.6) :

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10) Q_D \kappa^2}{128\pi^5 N_A n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.8)$$

Cela nous permet d'avoir une expression simplifiée de la dépendance du taux de transfert en fonction de la distance entre les fluorophores :

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (3.9)$$

On définit alors l'efficacité de FRET E comme le rapport entre le nombre de photons transférés à l'accepteur sur le nombre de photons absorbés :

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} \quad (3.10)$$

en incluant (3.9) dans (3.10) :

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad (3.11)$$

On peut alors mesurer E en mesurant l'intensité de fluorescence du donneur en absence F_D et en présence F_{DA} de l'accepteur :

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (3.12)$$

Lors des expériences résolues en temps, on mesure l'efficacité de FRET au moyen des temps de vie du fluorophore donneur en absence τ_D et en présence τ_{DA} de l'accepteur :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (3.13)$$

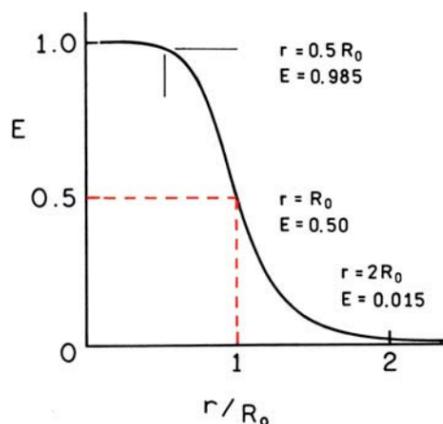


FIGURE 3.4 – Efficacité de FRET et distance de Förster, d'après [104]

On remarque sur la figure 3.4 que l'efficacité de transfert varie rapidement autour du rayon de Förster, et passe de 98.5% à 1.5% entre $r = 0.5R_0$ et $r = 2R_0$. Cette forte dépendance en fonction de la distance séparant les fluorophores fait du FRET une technique de choix pour mesurer des distances de l'ordre de 5 nm. Pour le couple de fluorophores Cerulean-Venus par exemple, le rayon de Förster vaut 5.4 nm, cela représente une variation significative d'efficacité de FRET pour des distances comprises entre 3 nm et 10 nm.

3.3 Les applications en biologie

Le FRET, en révélant la proximité entre fluorophores, a permis l'étude de la structure et d'interactions entre molécules biologiques. Les études s'intéressent au FRET entre fluorophores présents sur une même molécule, qu'on nomme FRET *intramoléculaire*, ou entre fluorophores présents sur des molécules différentes, on parle alors de FRET *intermoléculaire*. Les fluorophores en question peuvent être de la même espèce, il y a alors *homofret*, ou, et c'est le cas le plus courant, le FRET a lieu entre une espèce de fluorophores donneurs et une espèce d'accepteurs, il y a alors *hétérofret*. Les mesures peuvent être qualitatives et porter sur la présence ou non de FRET, ou on peut réaliser des expériences plus quantitatives pour connaître le degré d'interaction entre les fluorophores, et en inférer dans certains cas la distance les

séparant.

Cette capacité à mesurer des distances est notamment mise à profit pour mesurer les forces qui s'exercent entre une cellule et son substrat via ses adhérences focales [105] ou entre des cellules épithéliales via leurs jonction d'adhérence [106]. Dans la Microscopie de Tension Moléculaire (MTM), des cellules expriment une protéine d'intérêt dans laquelle un senseur de force FRET est encodé. Ce senseur de force fonctionne comme un newtonmètre : on mesure son élongation, et la connaissance de sa rigidité nous permet de calculer la force qui s'exerce à ses extrémités. La mesure de son élongation est rendue possible par la paire de fluorophores donneur-accepteur placée de part et d'autre du "ressort protéique", la partie du senseur de force qui va subir l'élongation. La mesure de l'efficacité de FRET nous donne une mesure de la distance séparant les fluorophores, qui est proportionnelle (ou au moins corrélée) avec les forces de tension qui s'exercent sur le senseur de force. La calibration du senseur peut être réalisée en liant un brin simple d'ADN aux extrémités du senseur de force puis en ajoutant le brin complémentaire, qui en s'hybridant avec le premier brin va augmenter la longueur de persistance de l'ADN et générer une force de tension sur le senseur de force de 5 à 7pN. Une autre méthode consiste à attacher le senseur de force entre une surface et une bille manipulée par une pince optique. On peut alors obtenir une courbe de calibration de l'efficacité de FRET E en fonction de la force de traction appliquée au biosenseur de force. Ces biosenseurs sont caractérisés par les fluorophores employés, qui vont déterminer notamment le rayon de Förster et donc la plage de distances sur laquelle les variations de E sont les plus importantes, et par le ressort protéique utilisé, qui détermine la gamme des forces qui peuvent être mesurées.

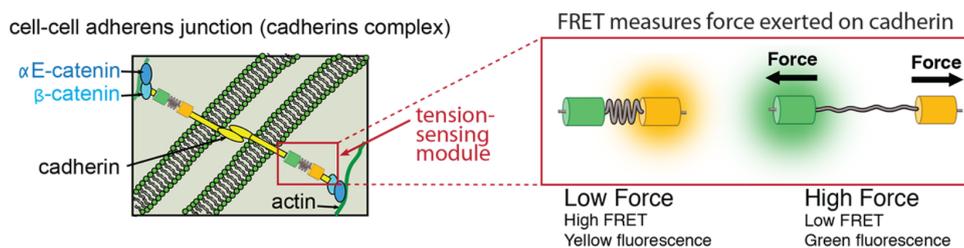


FIGURE 3.5 – Senseur de force TSMOD inséré dans la séquence d'une cadhérine, d'après [107]

Par exemple le ressort protéique Tension Sensor Module (TSMOD) est une séquence de 40 acides aminés qui se comporte comme un ressort entropique, c'est à dire que l'état replié de la protéine est favorisé puisque le nombre de conformations désordonnées (quand la protéine est en pelote) est plus important que le nombre de conformation assez ordonnées (quand la protéine est étirée). Il a été utilisé avec les fluorophores mTFP et Venus pour mesurer les forces de traction qui s'exercent sur les E-cadhérines de cellules épithéliales (figure 3.5) [106]. Les E-cadhérines sont des molécules transmembranaires qui lient le cytosquelette d'actomyosine d'une cellule et aux aux E-cadhérines des cellules voisines. Le senseur de force a été inséré dans le domaine cytoplasmique d'une cadhérine, entre le domaine transmembranaire et le domaine qui se lie à la caténine, protéine permettant de se lier aux filaments d'actine. Il a alors été montré que le cytosquelette d'actomyosine exerce des forces de tension sur les cadhérines, même celles qui ne sont pas liées aux cadhérines des cellules voisines, et que cette force augmente lorsque les cadhérines se lient à celles des cellules voisines au niveau des contacts cellulaires. Cette force augmente au niveau des contacts cellulaires lorsque les cellules sont étirées, et reste constante au niveau des régions sans contact [106].

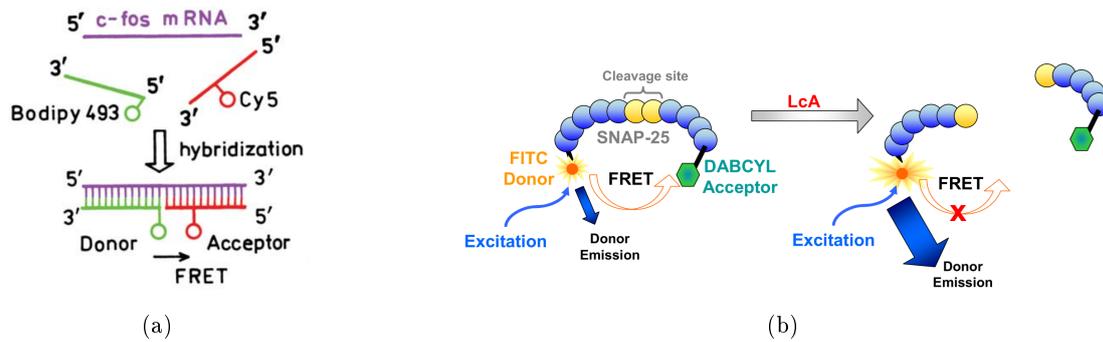


FIGURE 3.6 – (a) Détection d'ARNm par hybridation de brins complémentaires portant les fluorophores. Lorsque l'ARNm est produit, les brins s'hybrident et leurs fluorophores sont assez proches pour qu'il y ait FRET. (b) Les fluorophores FITC et DABCYL sont greffés au peptide SNAP-25 qui est un substrat de la chaîne légère de la toxine botulique A (LcA). Lorsque cette enzyme est active, elle clive le peptide, et le FRET n'est plus possible. D'après [108] et [109]

Cependant, pour beaucoup d'applications en biologie, il n'est pas nécessaire de connaître la distance entre fluorophores mais seulement s'il y a présence ou non de FRET. C'est le cas par exemple lorsqu'on s'intéresse à l'interaction entre une enzyme et son substrat ou entre deux brins d'ADN. On peut alors modifier génétiquement les protéines pour que l'enzyme ait un donneur et le substrat un accepteur, ou on peut greffer chimiquement un donneur à un brin d'ADN et l'accepteur à un autre [108]. Lorsque les deux molécules d'intérêt interagissent, elles sont assez proches l'une de l'autre pour qu'il y ait transfert d'énergie du fluorophore donneur à l'accepteur (figure 3.6a). Une même protéine peut aussi présenter les 2 fluorophores, et on étudie alors la capacité d'une enzyme à cliver cette protéine [109]. Lorsque la protéine porteuse des fluorophores est clivée entre ces fluorophores, les bouts de protéine diffusent librement dans le milieu et s'éloignent l'un de l'autre, rendant alors le FRET impossible (figure 3.6b). Une autre utilité de modifier des protéines pour qu'elles expriment une paire de fluorophore donneur - accepteur est l'étude de leur conformation. Si on souhaite révéler dans quelle conformation une protéine se replie parmi les différentes conformations possibles, on place un fluorophore donneur et un accepteur de telle manière qu'il y aura un niveau important de FRET dans une conformation envisagée, et un FRET nul dans l'autre conformation (figure 3.7) [110].

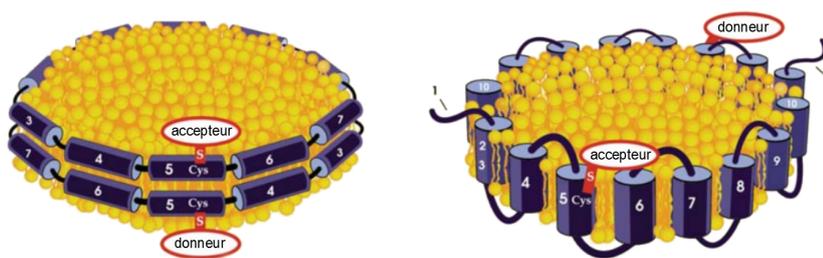


FIGURE 3.7 – Conformations possibles de l'apolipoprotéine apoA-I lorsqu'elle est liée aux lipides. En conformation ceinture (à gauche), il y a FRET entre les 2 fluorophores, alors qu'en conformation barrière (à droite) le FRET n'est pas possible, d'après [110]

Pour étudier la mécanotransduction, une dernière classe de biosenseurs a été développée. Ces biosenseurs permettent d'observer l'activité des molécules de la signalisation cellulaire. En effet, les cellules font un usage important de 2 stratégies de signalisation qui permettent d'activer ou de désactiver des protéines. Ces stratégies reposent sur un mécanisme commun : l'ajout ou le retrait d'un phosphate à une molécule. La première méthode implique des kinases, qui sont des enzymes capables de catalyser l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) et de greffer le phosphate clivé à un acide aminé d'une protéine spécifique. Cet acide aminé est généralement une sérine ou une thréonine chez les eucaryotes, mais la phosphorylation d'une tyrosine permet de réguler nombre de processus cellulaires.

Cet ajout de phosphate peut empêcher une enzyme de se lier à son substrat par répulsion stérique ou électrostatique, il peut aussi modifier la conformation d'une protéine, ou créer un site de liaison qui sera reconnu par une autre protéine. Le retrait de ce phosphate, la déphosphorylation, est le processus inverse catalysé par les phosphatases. L'activité des kinases et des phosphatases peut être elle-même régulée par l'ajout et le retrait de phosphates par d'autres kinases et phosphatases, formant ainsi une cascade de signalisation qui peut amplifier le signal ou rendre les transitions de signalisation plus abruptes et non linéaires [111]. Par exemple la kinase Src (prononcer sarc) est impliquée dans la mécanotransduction. Elle est composée d'une chaîne d'acide gras qui l'ancre à la membrane cellulaire, d'un domaine catalytique kinase, et de deux sites de liaison peptidiques : Src homology 3 (SH3) et Src homology 2 (SH2) (figure 3.8) [112]. Dans l'état inactif, SH2 se lie à la tyrosine phosphorylée de l'extrémité C-terminale de Src, et SH3 se lie à une chaîne peptidique de Src en déformant le site catalytique de la kinase et la rendant inactive. Pour s'activer, Src fonctionne comme une porte logique ET : il faut qu'il y ait déphosphorylation de la tyrosine liée à SH2, et que le domaine SH3 se lie à un ligand portant lui aussi une tyrosine phosphorylée. Alors Src s'auto-phosphoryle, et son site catalytique est pleinement actif.

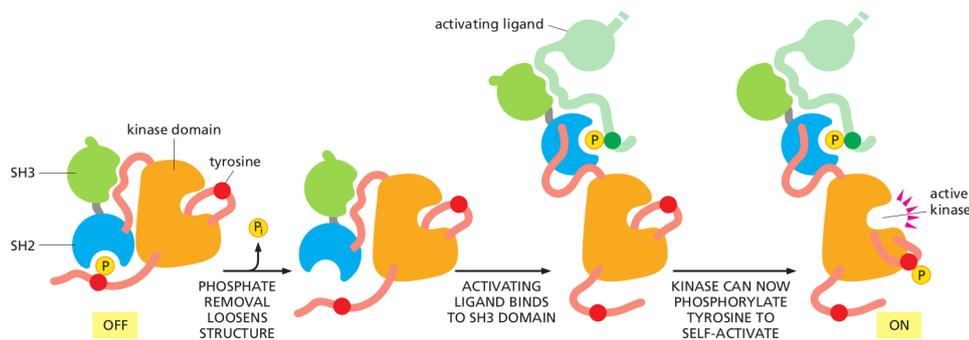


FIGURE 3.8 – La kinase Src s'active si 2 conditions sont réunies : la tyrosine liée à SH2 doit être déphosphorylée, et SH3 doit se lier à la tyrosine phosphorylée d'une autre protéine. d'après [35]

Un rapporteur de l'activité de Src (figure 3.9) a été mis au point pour observer le changement d'état de cet kinase à la suite d'une stimulation mécanique [113]. Ce rapporteur est constitué d'une paire de fluorophores eCFP/ eYFP séparés par un domaine SH2, une chaîne flexible, et un substrat de Src. Lorsque le substrat n'est pas phosphorylé, la chaîne flexible permet aux 2 fluorophores de se retrouver assez proches l'un de l'autre pour que le FRET soit possible. Lorsque Src devient actif, il peut phosphoryler le substrat du rapporteur d'activité, et le domaine SH2 du rapporteur se lie à la tyrosine phosphorylée. Les fluorophores sont alors trop éloignés et l'efficacité de FRET diminue. Ce biosenseur a été utilisé par WANG *et al.* [113] pour observer la vague d'activation de Src au sein de cellules suite à une force de traction générée par une bille fonctionnalisée avec la protéine d'adhérence fibronectine.

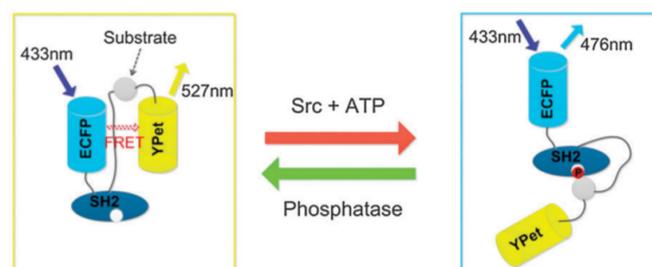


FIGURE 3.9 – Le biosenseur rapporteur d'activité de la kinase Src Schéma d'après [114], ici Ypet est représenté comme accepteur, bien que EYFP ai été utilisé originellement.

La deuxième voie de signalisation utilisant le transfert de phosphate repose sur les GTPases (figure 3.10a). Ces protéines sont capables de se lier à leur ligand lorsqu'elles sont à l'état actif, c'est-à-dire lorsqu'elles sont liées à une guanine triphosphate (GTP) [115]. L'hydrolyse de la GTP est assez longue,

avec un temps de demi-vie d'environ 4h. Lorsque la GTP est hydrolysée, la GTPase liée à la GDP change de conformation et devient inactive. Les GTPases liées à des GDP s'accumulent dans les cellules car la dissociation de la GDP à la GTPase est aussi lente, avec un temps de demi-vie de 10h. Lorsque la dissociation de la GDP de la GTPase a lieu, la GTPase qui a une grande affinité avec la GDP et la GDP se lie rapidement à ces nucléotides. Comme la concentration en GTP est 10 fois supérieure à celle en GDP, les nouveaux complexes GTPase-nucléotide sont pour l'essentiel des GTPase-GTP. Le système de signalisation repose sur le contrôle du cycle des GTPase, dont les étapes les plus lentes que sont l'hydrolyse de la GTP et la dissociation de la GDP peuvent être accélérées. Les facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF en anglais) se lient à une GTPase-GDP et changent légèrement leur conformation, ce qui a pour effet de favoriser la dissociation des GDP qui a lieu alors dans une échelle de temps de quelques seconde à la minute. La réserve des complexes GTPase-GDP inactifs diminue alors rapidement au profit de la formation des GTPase-GTP actifs. Les protéines activatrices de GTPases (GAP) au contraire accélèrent l'hydrolyse des GTP liées aux GTPases, diminuant la population de GTPases actives.

Un exemple de rapporteur d'activité de GTPase et celui qui concerne la GTPase Ras (figure 3.10b) [116]. Les fluorophores CFP et YFP sont séparés par la GTPase Ras, une chaîne flexible, et H-Raf, le domaine d'interaction de Ras-GTP avec la protéine Raf. Dans l'état inactif, lorsque Ras est liée à une GDP, les fluorophores sont assez éloignés pour que l'efficacité de FRET soit faible. Lorsque qu'une GEF favorise la dissociation de la GDP et qu'une GTP se lie à Ras, Ras-GTP reconnaît Raf et les fluorophores sont rapprochés, augmentant l'efficacité de FRET. L'hydrolyse de la GTP favorisée par une GAP redissocie Ras et Raf, éloignant de nouveau les fluorophores. [117]

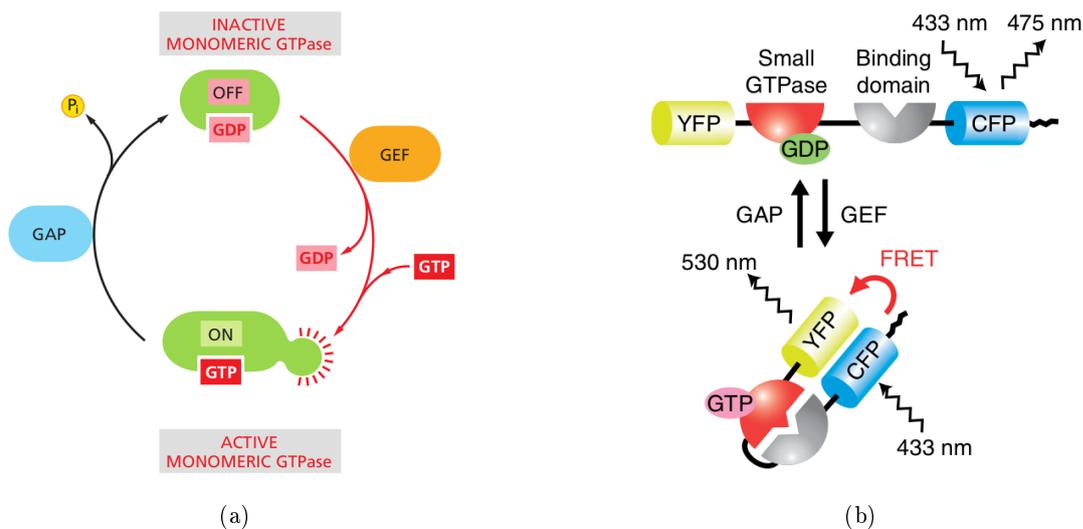


FIGURE 3.10 – Le cycle d'activité des GTPases et un senseur d'activité. (a) Les GEFs activent les GTPases en favorisant la dissociation de leur GDP, qui est suivie majoritairement par l'association d'une GTP qui rend effectivement actives les GTPases. Les GAPs désactivent les GTPases en favorisant la phosphorylation du phosphate de leur GTP, d'après [35]. (b) Lorsque la GTPase est inactive (liée à une GDP), les fluorophores peuvent être assez proches de l'autre pour qu'il y ait FRET. Lorsque la GTPase est active (liée à une GTP) elle reconnaît son substrat (gris) et s'y lie, éloignant les fluorophores et rendant le FRET impossible, d'après [116]

Il y a de nombreuses stratégies dans la conception de biosenseurs FRET. Nous avons vu ici deux biosenseurs d'activité qui utilisent du FRET intramolécule, mais le premier comporte une séquence dont la conformation va changer sous l'effet de la kinase Src qui est une protéine distincte étudiée, alors que le deuxième contient la protéine étudiée, et son changement d'activité induit un changement de conformation de cette même protéine chimérique. L'observateur est par ailleurs confronté à un dilemme : un plus haut niveau d'expression de ces rapporteurs d'activité permet d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit lors des expériences, mais toute mesure affecte le système mesuré, et une quantité trop importante de biosenseurs biaise les voies de signalisation étudiées.

3.4 Différentes méthodes pour mesurer le FRET, limitations et motivations pour aller plus loin

Les biosenseurs nous permettent d'observer les mécanismes à l'œuvre dans une cellule par la mesure de leur efficacité de FRET. Cette efficacité de FRET peut être mesurée selon différentes méthodes qui reposent sur le mesure de temps de vie des fluorophores, d'anisotropie ou d'intensité de fluorescence :

Imagerie par temps de vie de fluorescence (FLIM)

Le FRET est une des voies de désexcitation d'un fluorophore, donc une plus grande efficacité de FRET décroît le temps de vie des fluorophores. On rappelle ici l'évolution *simple* de la population des fluorophores excités d'après l'équation (3.3)

$$[S1]_t = [S1]_{t=0} e^{-t/\tau} \quad (3.14)$$

avec

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (3.15)$$

où τ est le temps de vie du fluorophore, k_r le taux d'émission du fluorophore et k_{nr} le taux de transitions non radiatives, qui comprennent les désexcitation collisionnelles et le FRET.

Il est alors possible d'estimer l'efficacité de FRET en mesurant le temps de vie des fluorophores donneurs seuls et en le comparant à leur temps de vie en présence des accepteurs. Ces mesures peuvent s'effectuer dans le domaine temporel ou fréquentiel. Cela signifie que dans la première méthode, une source pulsée comme un laser femtoseconde est utilisée pour exciter les fluorophores, et le temps de vie des fluorophores est calculé à partir d'une courbe de décroissance de fluorescence en fonction du temps. Dans le FLIM fenêtré temporellement (time gated)[118, 119], le faisceau d'excitation est séparé pour illuminer l'échantillon d'une part, et déclencher l'acquisition du signal par une caméra CCD pour un temps très court avec un délai donné. En faisant varier le délai on peut reconstruire la décroissance de fluorescence et calculer τ . La deuxième méthode du FLIM en domaine temporel est le comptage de photon unique corrélé en temps (TCSPC) [120, 121]. On ne mesure pas une intensité de fluorescence, mais le temps écoulé entre le pulse laser et le premier photon de fluorescence détecté. Un convertisseur temps-amplitude (TAC) est déclenché au moment du pulse, génère une rampe de tension et est arrêté lors de la détection du photon. Un convertisseur analogique numérique (ADC) convertit l'information de tension en temps. On construit alors un histogramme de probabilité de compte en fonction du temps dont on extrait le temps de vie de décroissance exponentielle. Le FLIM en domaine fréquentiel utilise une excitation modulée sinusoïdalement en intensité dans le temps. Le signal de fluorescence est alors modulé à la même fréquence, mais avec un déphasage et une démodulation (amplitude inférieure à la modulation d'excitation) caractéristiques du temps de vie de fluorescence. Si on veut mesurer différents temps de vie, il faut employer des modulations à différentes fréquences, typiquement d'environ l'inverse du temps de vie des fluorophores.

Les techniques de FLIM requièrent donc une instrumentation spécifique et coûteuse, mais sont insensibles aux artefacts liés à l'intensité de fluorescence. La mesure de temps de vie ne dépend pas de l'intensité de l'excitation laser, de la concentration en fluorophore, du photoblanchiment, ou des inhomogénéités de signal introduites le long du chemin optique, contrairement à la mesure d'intensité de fluorescence. Les techniques classiques de FLIM nécessitaient un nombre de compte de photons suffisant pour réaliser un ajustement de courbe et calculer les temps de vie de fluorescence. L'acquisition était donc trop longue pour observer la réponse cellulaire en dessous de la minute. Les techniques récentes comme la méthode de la fraction minimale de donneurs interagissants [122, 123] ou celle du graphe de phase (phasor plot) [124, 125, 126] se passent d'ajustement de courbe et peuvent fonctionner avec un plus faible nombre de photons comptés, permettant l'acquisition d'images FLIM en une seconde ou moins. Ces méthodes permettent en outre de déterminer la fraction de molécules qui participent au FRET en se passant des

méthodes d'ajustement multiespèces.

Lors de ma 1^{ère} année de thèse j'ai eu l'occasion d'utiliser la technique de graphe de phase au sein de l'équipe du professeur Don C. Lamb à l'Université Ludwig Maximilians de Munich (LMU). Le but était de réaliser des mesures avec cette méthode connue pour être quantitative, et de pouvoir plus tard les comparer avec nos mesures d'efficacité de FRET analysées selon notre méthode alors en cours de développement. Nous avons observé des cellules de reins de chien de Madin-Darby (MDCK) exprimant un biosenseur d'activité de la kinase Src diffusant dans le cytosol ou attaché à la membrane, et en présence ou non de PP2, un inhibiteur de Src. La figure 3.11a correspond à une cellule MDCK en présence de PP2 et dont le biosenseur de Src est ciblé à la membrane. La représentation des temps de vie (figure 3.11b) permet de sélectionner les zones d'intérêt à analyser. Sur la figure 3.11c le rouge correspond au signal de fluorescence de la CFP, le bleu à l'autofluorescence, le vert correspond au mélange de ces 2 signaux dû aux cellules avec un plus faible niveau d'expression, et le jaune correspond aux agents de fixation. Une fois les zones d'analyse de temps de vie sélectionnées, nous pouvons définir un axe (ligne noire de la figure 3.11d) selon lequel on représente les temps de vie. Les données en dehors des zones sélectionnées ne sont pas représentées. Les couleurs (figure 3.11e) correspondent à la position par rapport à la ligne noire. Le bleu correspond aux faibles temps de vie (haut FRET), le rouge aux temps de vie élevés (bas FRET). Le biosenseur employé ici est "inversé", c'est-à-dire qu'une haute efficacité de FRET correspond à une basse activité du biosenseur.

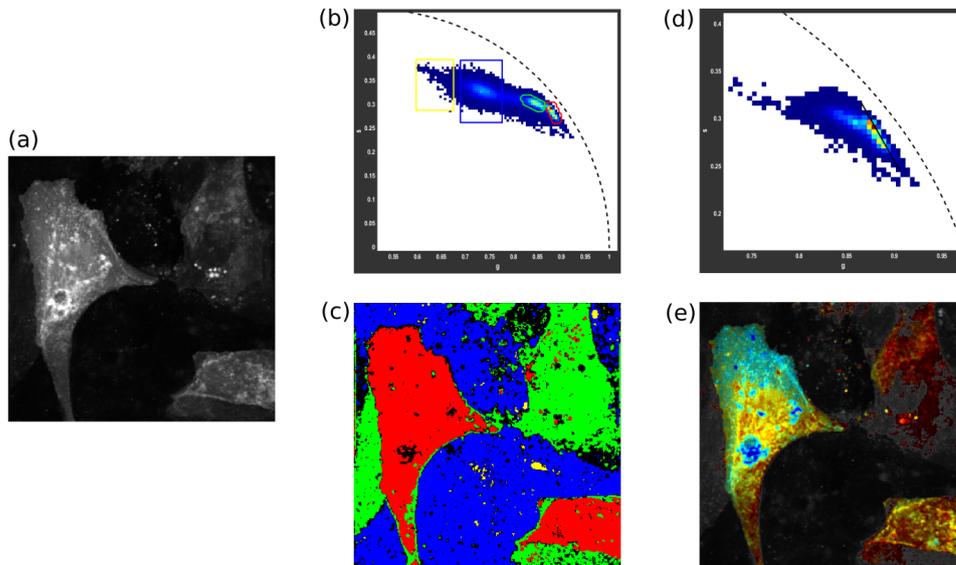


FIGURE 3.11 – Données de graphe de phase (phasor plot). (a) Cellule MDCK exprimant le biosenseur membranaire de Src en présence de l'inhibiteur PP2. (b,c) Les données sont représentées par catégories de temps de vie. (d,e) Les données d'intérêt sont représentées selon l'axe des temps de vie défini par la ligne noire. Le bleu correspond aux faibles temps de vie (haut FRET), le rouge aux temps de vie élevés (bas FRET).

Microscopie de polarisation

La présence de FRET est aussi détectable en mesurant l'anisotropie de fluorescence [127, 128]. Lorsqu'on illumine les donneurs avec un faisceau polarisé, seuls les fluorophores qui sont alignés avec la direction de polarisation seront excités. Les protéines fluorescentes sont assez grosses pour que leur diffusion rotationnelle soit assez faible avant l'émission d'un photon, qui aura alors une polarisation proche de celle du faisceau d'excitation. Lorsqu'un fluorophore donneur est excité par un faisceau polarisé, il peut y avoir FRET vers un fluorophore accepteur dont la polarisation diffère encore de celle du donneur. Le photon émis aura donc une polarisation significativement différente de celle du faisceau d'excitation. L'avantage principal de la microscopie de polarisation est sa capacité à détecter l'homo-FRET [129], c'est-à-dire le transfert non radiatif d'énergie entre fluorophores de même espèce. Pour qu'il y ait homo-FRET il faut que le spectre d'émission d'un fluorophore recouvre de manière suffisante son propre spectre d'ex-

citation, il faut donc que le décalage de Stokes soit faible. Il est alors possible d'étudier l'oligomérisation de protéines portant la même espèce de fluorophores. Lorsqu'il y a oligomérisation, ces protéines sont assez proches pour que l'efficacité de FRET augmente, se traduisant par la dépolariation du signal de fluorescence.

Photoblanchiment des fluorophores

La présence d'accepteurs induisant du FRET a pour effet de diminuer l'intensité de fluorescence des donneurs. En photoblanchissant les fluorophores accepteurs, le FRET n'est plus possible et le gain de fluorescence des donneurs est proportionnel à l'efficacité de FRET [130]. Cette technique nécessite normalement le photoblanchiment de toute la population des accepteurs, mais on peut suivre l'intensité de fluorescence des 2 espèces de fluorophores au cours du photoblanchiment et réaliser un ajustement de courbe pour calculer l'efficacité de FRET avant même le photoblanchiment complet des accepteurs [131].

Une autre méthode consiste à photoblanchir les fluorophores donneurs [132]. La baisse du signal de fluorescence des donneurs est moins rapide lorsque l'efficacité de FRET est plus grande. On compare alors la cinétique de photoblanchiment en présence d'accepteur avec celle en absence d'accepteur.

Ces techniques de photoblanchiment sont réalisables sur les microscopes de fluorescence conventionnels, mais elles sont destructives pour les fluorophores, donc seulement une acquisition par cellule est réalisable, ce qui proscrit leur utilisation pour l'étude spatio-temporelle de la signalisation cellulaire.

FRET ratiométrique

Pour suivre des réactions rapides en cellule vivante, il est possible d'observer l'émission du fluorophore accepteur sensibilisée ("sensitized"), c'est-à-dire augmentée par FRET [133, 134]. Pour ce faire on utilise 2 jeux de filtres : le premier permet d'illuminer l'échantillon à une longueur d'onde d'excitation du donneur, et de collecter I_{DD} , le signal de fluorescence aux longueurs d'ondes d'émission du donneur. Le deuxième permet aussi d'illuminer l'échantillon à une longueur d'onde d'excitation du donneur, mais il collecte I_{DA} , le signal de fluorescence aux longueurs d'ondes d'émission de l'accepteur. On peut ensuite calculer un indice rapportant l'efficacité de FRET de différentes manières, en calculant le rapport I_{DA}/I_{DD} [135] ou encore $\frac{I_{DA}}{I_{DA} + I_{DD}}$ [134]. Cette dernière mesure fournit des valeurs comprises entre 0 et 1 comme on l'attend d'une réelle efficacité de FRET, et traduit l'idée de la proportion d'énergie transmise sur l'énergie totale des fluorophores. Cependant il faut prendre en compte les différences de rendement quantique et de détection de fluorescence des 2 espèces de fluorophores. L'efficacité de FRET apparente s'écrit alors :

$$E = \frac{I_{DA}}{I_{DA} + \gamma^M I_{DD}}$$

où $\gamma^M = (\Phi_A \eta_A)/(\Phi_D \eta_D)$ est le facteur de correction d'émission avec Φ_D et Φ_A le rendement quantique du donneur et de l'accepteur, et η_D et η_A leur efficacité de détection. Cependant ce facteur est difficile à déterminer, et dans de nombreuses publications il est considéré comme valant 1, ce qui revient à le négliger [134].

Le signal mesuré I_{DA} ne contient pas seulement le signal de fluorescence dû au FRET, mais aussi le signal des fluorophores donneurs dont le large spectre d'émission "déborde" dans le canal accepteur (figure 3.12). La deuxième contamination vient des accepteurs qui peuvent être directement excités lorsqu'on illumine l'échantillon à une longueur d'onde d'excitation du donneur, il contribuent alors au signal I_{DA} . Si le facteur de correction pour le débordement de spectre γ^{BT} (pour "Bleed Through") peut être estimé avec seulement une illumination à la longueur d'onde d'excitation du donneur ; le facteur de correction pour l'excitation directe γ^{DE} (pour "Direct Excitation") nécessite lui une excitation supplémentaire à une longueur d'onde d'excitation des accepteurs, ainsi qu'un troisième jeu de filtres. Le choix de cette longueur d'onde et du jeu de filtre rend nulle l'excitation des donneurs, et permet d'exciter seulement les accepteurs tout en collectant leur fluorescence. Dans cet ensemble de méthodes dites à 3 cubes, un premier indice prenant en compte ces phénomènes a été proposé par YOUNG *et al.* : $nF = I_{DA} - \gamma^{DE} I_{AA} - \gamma^{BT} I_{DD}$

[136] où I_{AA} est le signal mesuré avec le 3^{ème} jeu de filtres. Cet indice fournit une valeur qui varie avec l'efficacité de FRET, mais il est sensible aux concentrations en donneurs et accepteurs. Une pléthore de méthodes a été proposée pour palier à ce défaut telle que les indices $FRET_N = nF/(I_{AA} \times I_{DD})$ [137] ou encore $N_{FRET} = nF/\sqrt{I_{AA} \times I_{DD}}$ [138]. Ces indices varient de manière non linéaire avec l'efficacité de FRET, et le lien entre ces indices et l'efficacité de FRET n'est pas clair. Zal et Gascoigne [139] proposèrent alors une méthode, l'E-FRET, qui combine l'indice de [134] et celui de [136] pour calculer un indice plus proche de l'efficacité de FRET :

$$E = \frac{I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA}}{I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD}}$$

C'est ce type d'indice que nous utilisons par la suite, combiné avec la technique d'ALEX-FRET détaillée plus loin.

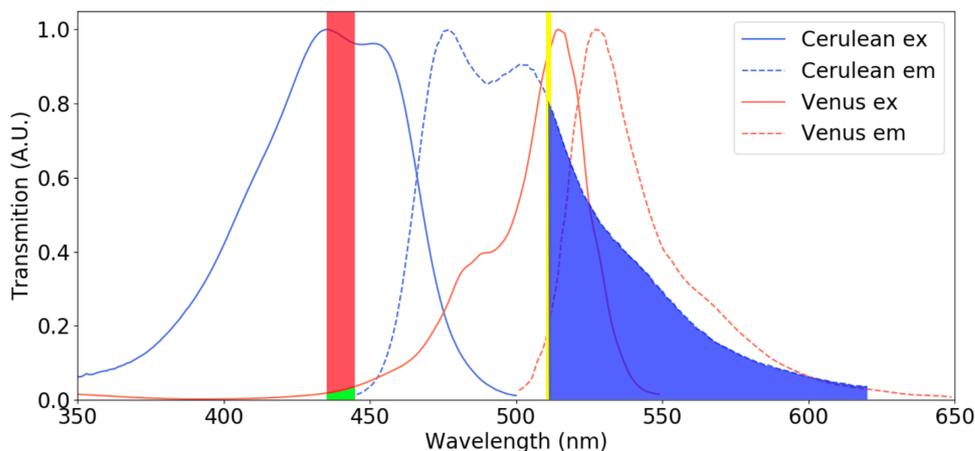


FIGURE 3.12 – Spectres des fluorophores Cerulean (le donneur) et Venus (l'accepteur). L'illumination du donneur à 440 nm (barre rouge) excite aussi l'accepteur (zone verte). Le filtre du séparateur chromatique sépare l'émission du donneur de celle de l'accepteur à 510 nm, mais une partie de l'émission du donneur passe dans le canal accepteur (zone bleue).

FRET spectral (sRET)

Une généralisation du passage de 2 à 3 signaux mesurés est le FRET spectral (sRET), où chaque pixel de l'image encode le spectre d'émission de l'échantillon, par exemple 40 signaux si le spectre est mesuré de 400nm à 800nm par pas de 10nm [140, 141]. Ce spectre d'émission peut être réalisé pour différentes longueurs d'ondes d'excitation, et comparé aux spectres précédemment acquis d'espèces de fluorophores donneur seul, accepteur seul, et des constructions donneur + accepteur d'efficacité de FRET significativement différentes. Par démixage hyperspectral, il est alors possible de connaître la quantité de chaque espèce de fluorophore ainsi que l'efficacité de FRET apparent. Un avantage notable est la possibilité de différencier le signal d'autofluorescence des cellules si le spectre d'émission de cellules non transfectées est enregistré. Le FRET spectral permet d'employer des fluorophores dont les spectres se recouvrent de manière plus importante, ce qui permet d'utiliser des paires de fluorophores dont le rayon de Förster et l'efficacité de FRET sont plus grands. Il permet aussi de collecter les photons émis dans tout le spectre d'émission d'un fluorophore, contrairement aux méthodes 3 cubes, ce qui augmente le signal total mesuré.

Cette séparation du signal de fluorescence selon les longueurs d'ondes d'excitation ou d'émission est par ailleurs applicable au FLIM [142, 143]. De nouvelles considérations entrent en jeu pour l'application à l'imagerie biomédicale comme l'accroissement du temps d'acquisition, la mise au point ou le coût d'une instrumentation particulière, ou un mauvais rapport signal sur bruit, qui augmentent avec le nombre de types de mesures que l'on souhaite réaliser (nombre de canaux de longueurs d'ondes, résolution temporelle et spatiale, ...). La combinaison de ces 2 techniques permet toutefois d'acquérir des images multidimen-

sionnelles riches en informations (x, y, z, temps de vie, longueur d'onde). Ces images ne sont pas facilement interprétables par un humain, mais leur analyse assistée par ordinateur [144], comme la réduction de dimensions et la classification par rapport à des échantillons connus, permet une identification des tissus histologiques de patients sans commune mesure.

L'ALEX-FRET

Le FRET permet d'étudier des réactions chimiques à l'échelle de la molécule unique (smFRET)[145]. Le FRET ratiométrique, qui nécessite une instrumentation simple, peu coûteuse et dont l'analyse est simple, souffre d'artefacts d'intensité et ne permet pas de discerner un donneur seul d'un couple donneur-accepteur de FRET nul. C'est pour étudier les structures et interactions biomoléculaires de molécules uniques diffusant en solution que le FRET par excitation laser alternée (ALEX-FRET)[146] a été développé.

Dans cette méthode, une source laser excite de manière alternée un échantillon à une longueur d'onde d'excitation du donneur puis de l'accepteur (figure 3.13). L'alternance est réalisée en combinant pour chaque faisceau laser un polariseur (P) avec un modulateur électro-optique (EOM). Ce dernier permet de changer rapidement la polarisation du faisceau, qui déterminera s'il peut passer au travers du polariseur ou non. L'échantillon est une solution assez diluée pour que dans la majorité des cycles d'excitation donneur / accepteur aucune molécule ne soit présente dans le volume d'excitation, et pour que lorsqu'un signal de fluorescence est détecté, la probabilité qu'il y ait plus d'une molécule dans le volume d'excitation au cours d'un même cycle soit négligeable. Lorsqu'une molécule est excitée, son signal de fluorescence est collecté et est séparé en deux canaux par un filtre dichroïque. Chaque canal correspond au domaine d'émission du donneur ou de l'accepteur, et les 2 signaux sont mesurés simultanément par deux photodiodes à avalanche (APD) dédiées. Il y a alors 4 signaux mesurés :

$F_{D_{ex}}^{D_{em}}$ le signal de fluorescence détecté dans le canal d'émission du donneur émis par une molécule illuminée à la longueur d'onde d'excitation du donneur

$F_{D_{ex}}^{A_{em}}$ le signal de fluorescence détecté dans le canal d'émission de l'accepteur émis par une molécule illuminée à la longueur d'onde d'excitation du donneur

$F_{A_{ex}}^{D_{em}}$ le signal de fluorescence détecté dans le canal d'émission du donneur émis par une molécule illuminée à la longueur d'onde d'excitation de l'accepteur

$F_{A_{ex}}^{A_{em}}$ le signal de fluorescence détecté dans le canal d'émission de l'accepteur émis par une molécule illuminée à la longueur d'onde d'excitation de l'accepteur

On note F^{FRET} le signal $F_{D_{ex}}^{A_{em}}$ corrigé pour le débordement de spectre et l'excitation directe (détails en page 71) :

$$F^{FRET} = F_{D_{ex}}^{A_{em}} - \gamma^{BT} F_{D_{ex}}^{D_{em}} - \gamma^{DE} F_{A_{ex}}^{A_{em}} \quad (3.16)$$

Les détails concernant γ^{BT} et γ^{DE} sont donnés en page 71. La stœchiométrie S est définie comme le rapport entre la quantité de donneur $[D]$ sur la quantité totale de fluorophores ($[D] + [A]$), de telle sorte qu'elle varie linéairement avec les quantités de matières, et que lorsqu'il y a autant de donneurs que d'accepteurs $S = 0.5$. L'efficacité de FRET E et la stœchiométrie S sont alors calculés [147] selon :

$$E = \frac{F^{FRET}}{F^{FRET} + \gamma^M F_{D_{ex}}^{D_{em}}} \quad (3.17)$$

et

$$S = \frac{F^{FRET} + \gamma^M F_{D_{ex}}^{D_{em}}}{F^{FRET} + \gamma^M F_{D_{ex}}^{D_{em}} + F_{A_{ex}}^{A_{em}} / \gamma^X} \quad (3.18)$$

$\gamma^M = (\Phi_A \eta_A) / (\Phi_D \eta_D)$ est le facteur de correction d'émission avec Φ_D et Φ_A le rendement quantique du donneur et de l'accepteur, et η_D et η_A leur efficacité de détection. $\gamma^X = (L_{A_{ex}} \sigma_{A_{ex}}^A) / (L_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^D)$ est le facteur de correction d'excitation avec $L_{D_{ex}}$ et $L_{A_{ex}}$ l'intensité d'excitation à la longueur d'onde

d'excitation du donneur et de l'accepteur, et σ_D^D et σ_A^A leur section efficace d'absorption à leur longueur d'onde d'excitation. Les deux facteurs γ^M et γ^X sont discutés en détail page 72.

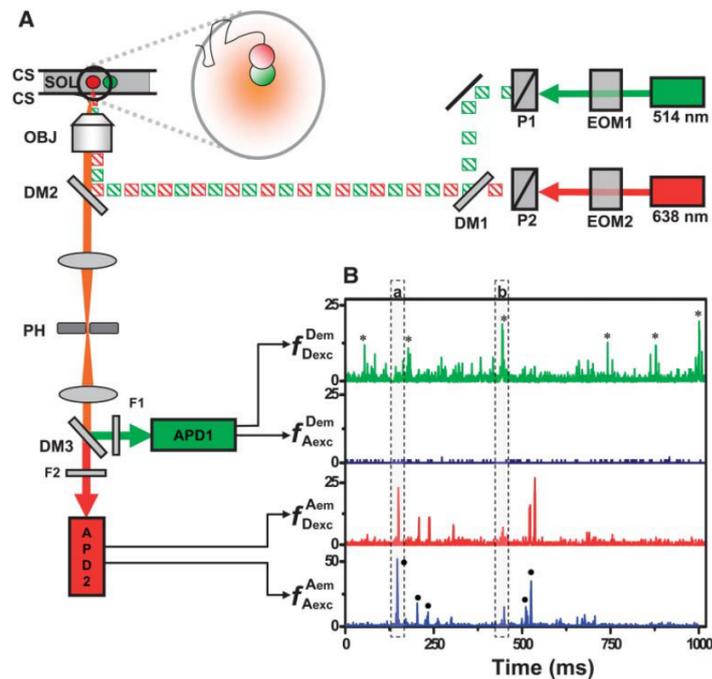


FIGURE 3.13 – Montage expérimental de l'ALEX FRET en molécule unique de [146]

On peut alors réaliser un histogramme 2D où les valeurs de E et S de chaque mesure sont comptabilisées (figure 3.14). Cet histogramme permet de différencier des couples de fluorophores d'efficacité de FRET différentes (a) et de mettre en évidence les espèces d'accepteur seul (c), mais il permet aussi de discriminer les espèces de donneurs seuls (b) vis-à-vis des couples donneur-accepteur de faible efficacité de FRET (d) en révélant leur stœchiométrie.

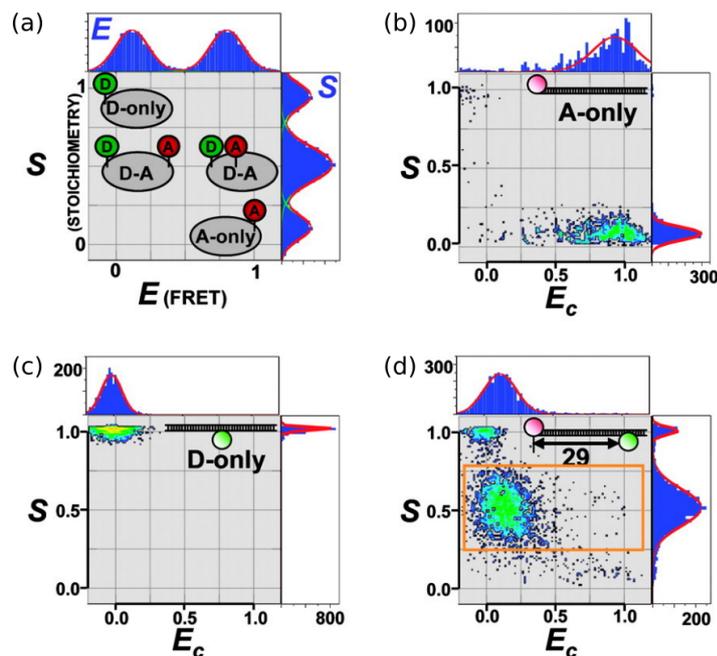


FIGURE 3.14 – Histogramme 2D E/S permet de mettre en évidence les espèces de donneur seul, d'accepteur seul, et de couple donneur-accepteur d'efficacité de FRET différentes, d'après [146].

Cette méthode d'ALEX-FRET ressemble aux méthodes 3 cubes, puisqu'elle repose sur 2 excitations

et 3 observations, mais les méthodes 3 cubes nécessitent un changement de jeu de filtre pour chacun des 3 signaux à enregistrer. En ALEX, le cube de fluorescence ne change pas, permettant un cycle d'excitation au moins 2 fois plus rapide que le temps de diffusion d'une molécule dans le femtolitre de volume d'observation (environ 1ms), et une séparation immédiate du signal de fluorescence par un dichroïque qui renvoie les 2 signaux aux APD dédiées.

L'ALEX FRET a ensuite été adapté pour la microscopie de plein champ, où le signal de molécules uniques est collecté par réflexion de fluorescence interne totale (TIRF) sur une caméra CCD [148], permettant le suivi rapide en molécule unique de réactions de nombreux complexes biomoléculaires immobilisés à la surface d'une lamelle.

Chapitre 4

Live Cell ALEX FRET

4.1 Montage expérimental et interfaçage

Pour étudier la mécanotransduction, nous souhaitons utiliser des biosenseurs d'activité (de kinases ou de GTPases) pour observer la réponse biochimique de cellules vivantes à la suite de stimulations mécaniques. Pour observer les réponses rapides (jusqu'à ≈ 1 s) de plusieurs cellules nous adaptons l'ALEX avec un microscope en épifluorescence (un même objectif sert à exciter l'échantillon et à collecter sa fluorescence) et une caméra sCMOS. Lorsqu'on insert dans les cellules de l'ADN circulaire codant pour un biosenseur, celles-ci vont produire les protéines sans que nous puissions contrôler le niveau d'expression. La quantité de biosenseurs produite est telle que lors de l'acquisition, le signal mesuré dans chaque pixel correspond à la somme des signaux émis par de nombreux fluorophores. Pour limiter ce phénomène, il est possible de choisir des cellules avec un très bas niveau d'expression, mais le signal mesuré est plus faible, et devient comparable au bruit de mesure. Le TIRF permet d'atténuer ce problème en diminuant significativement le bruit [149, 150], mais nos substrats actifs servant à la stimulation mécanique rendent extrêmement compliqué l'emploi de cette technique. En effet en TIRF, le faisceau d'excitation est réfléchi lorsqu'il arrive à l'interface entre son milieu de propagation et un milieu de plus faible indice optique ($n_{\text{verre}} = 1.52 \Rightarrow n_{\text{cellule}} = 1.38$) avec un angle θ_1 supérieur à l'angle critique de l'interface θ_c (figure 4.1a). Une onde évanescente se propage alors dans le milieu et illumine l'échantillon sur une distance caractéristique de 100 à 200 nm de l'interface. Nos substrats ont une épaisseur de 115 μm , le phénomène de TIRF doit donc avoir lieu non pas à l'interface verre/PDMS mais à l'interface PDMS/cellule (figure 4.1b). Cette expérience a déjà été réalisée par GUTIERREZ *et al.* [151], mais il nous était difficile de se procurer le PDMS requis, et les PDMS alternatifs ayant l'indice de réfraction requis produisaient des substrats bien trop rigides. Nous devons donc nous passer de TIRF et observer des cellules avec un niveau d'expression relativement élevé.

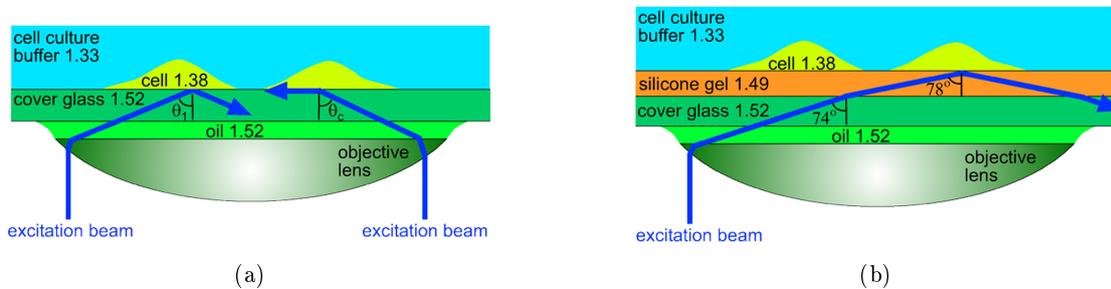


FIGURE 4.1 – TIRF standard (a) et sur PDMS (b).

Ce dernier point est important : cela implique que lorsque nous parlons de mesure d'efficacité de FRET, nous réalisons une mesure d'ensemble de FRET. L'efficacité de FRET E est définie comme la probabilité que l'énergie d'un fluorophore donneur D soit transmise à l'accepteur A . Nous ne pouvons jamais mesurer des probabilités, mais seulement des moyennes empiriques sur un ensemble de réalisations (ou tirages).

Dans notre cas, pour un couple de fluorophores D - A, nous réalisons la moyenne empirique du nombre de fois qu'il y a eu transfert d'énergie entre D et A sur le nombre de cycles excitation / désexcitation de D. Un cycle excitation / désexcitation d'un fluorophore dure typiquement 10^{-8} s, et nous utilisons quotidiennement des temps d'exposition de 500 ms- 1000 ms, ce qui signifie que pour *une* molécule nous mesurons une moyenne d'efficacité de FRET sur $10^7 - 10^8$ cycles d'excitation / désexcitation. De plus, nous moyennons les signaux de fluorescence non pas d'une protéine, mais d'une centaine de protéines, puisque leur concentration, lorsqu'elles sont produites par une cellule, est de l'ordre de $10 \mu\text{M}$ [141]. Donc si les événements qui nous intéressent sont discrets (il y a-t-il eu transfert d'énergie ou non?), le moyennage des signaux sur le temps et la population de fluorophores produit un continuum de valeurs d'efficacité de FRET entre les 2 valeurs extrêmes possibles 0 ou 1.

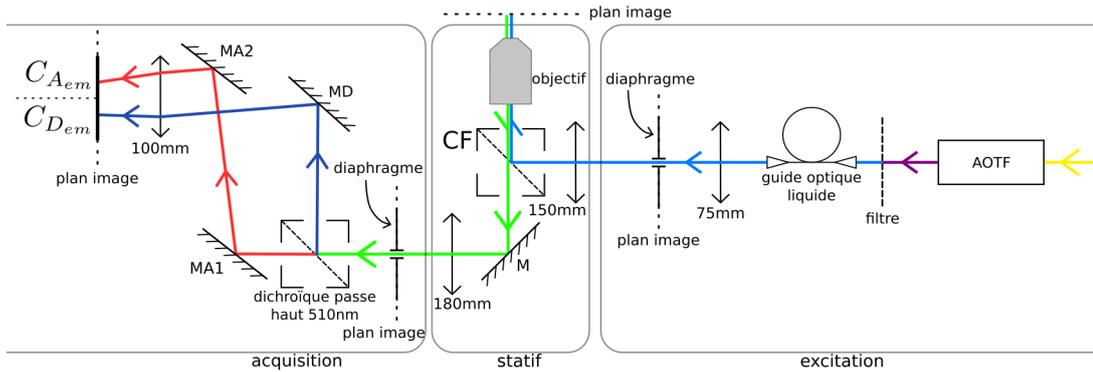


FIGURE 4.2 – Montage optique

Notre montage expérimental comporte les 2 modules essentiels à ce type d'expérience (figure 4.2) : le module d'excitation permet d'illuminer l'échantillon alternativement à une longueur d'onde d'excitation du donneur ($\lambda_{D_{ex}}$) et à une longueur d'onde d'excitation de l'accepteur ($\lambda_{A_{ex}}$), le module d'acquisition permet de séparer l'émission de l'échantillon en un canal d'émission du donneur ($C_{D_{em}}$) et un canal d'émission de l'accepteur ($C_{A_{em}}$) dont les signaux sont mesurés en même temps. Plus précisément, dans le module d'excitation, un laser blanc (flèche jaune) est envoyé dans un filtre ajustable acousto-optique (AOTF). Ce dernier nous permet de sélectionner la longueur d'onde et la puissance du faisceau sortant (flèche violette) qui passe par un filtre pour le nettoyer des longueurs d'ondes indésirables. Comme le faisceau blanc est généré par un laser pulsé dont le faisceau passe dans une fibre non linéaire, le faisceau blanc n'est pas polarisé. Or l'AOTF a l'effet d'un filtre de polarisation : la lumière incidente qui n'a pas la polarisation adéquate est rejetée. Pour ne pas perdre la moitié de la puissance de la composante du laser blanc de longueur d'onde voulue, le boîtier d'AOTF contient en réalité 2 AOTF afin de récupérer plus de puissance à la longueur d'onde désirée. Le faisceau sortant du boîtier est donc composé de 2 faisceaux, extrêmement difficiles à aligner. Nous faisons donc passer le faisceau composite (flèche bleue) dans un guide optique liquide afin d'homogénéiser spatialement le faisceau et d'éviter de potentielles interférences. À la sortie du guide optique, le faisceau est collimaté à l'infini par une lentille convergente puis fenêtré spatialement au niveau du plan image pour ne garder que la partie centrale du profil d'intensité gaussien du faisceau et illuminer l'échantillon de manière plus homogène. À l'entrée du statif du microscope, une lentille convergente permet de focaliser le faisceau au foyer de l'objectif. Avant d'atteindre l'objectif, il est réfléchi par le cube de fluorescence ("CF" sur la figure), qui permet de laisser passer les bandes spectrales correspondant à l'émission des fluorophores donneurs, accepteurs et des billes pour la TFM. Il agit par ailleurs comme un miroir aux longueurs d'ondes d'excitation des fluorophores donneurs et accepteurs. L'émission de fluorescence est filtrée de nouveau par le cube de fluorescence, et passe par la lentille convergente en sortie du statif. En entrant dans le module d'acquisition, le signal de fluorescence est d'abord fenêtré spatialement par un diaphragme au niveau du plan image, de sorte qu'il n'occupe qu'une moitié du champ d'observation de la caméra en fin de chemin optique. Le faisceau est ensuite séparé par un miroir dichroïque, qui est un filtre passe haut en terme de longueurs d'onde dont le seuil se trouve à 510nm pour le couple de fluorophores Cerulean/Venus. La partie réfléchie du faisceau correspond au

canal d'émission du donneur (flèches bleues). Cette partie est renvoyée par le miroir donneur (MD) vers la lentille qui forme l'image de l'échantillon sur la caméra, dans l'aire dédiée au canal d'émission du donneur ($C_{D_{em}}$). La partie qui traverse le dichroïque correspond au canal d'émission de l'accepteur (flèches rouges). Elle est renvoyée par les miroirs accepteurs MA1 et MA2 à travers la lentille sur la zone de la caméra dédiée au canal accepteur ($C_{A_{em}}$). Dans la suite on désignera l'ensemble miroir dichroïque + miroirs MD, MA1 et MA2 par "séparateur chromatique". Les deux faisceaux sont donc imagés simultanément sur une même caméra, et lors d'une acquisition, nous obtenons 4 images :

I_{DD} le signal de fluorescence détecté dans $C_{D_{em}}$ après illumination de l'échantillon à $\lambda_{D_{ex}}$

I_{DA} le signal de fluorescence détecté dans $C_{A_{em}}$ après illumination de l'échantillon à $\lambda_{D_{ex}}$

I_{AD} le signal de fluorescence détecté dans $C_{D_{em}}$ après illumination de l'échantillon à $\lambda_{A_{ex}}$

I_{AA} le signal de fluorescence détecté dans $C_{A_{em}}$ après illumination de l'échantillon à $\lambda_{A_{ex}}$

Il est à noter que le choix des filtres rend très souvent I_{AD} négligeable.

La microscopie quantitative requière un minutage précis des temps d'illumination et d'acquisition, avec une synchronisation étroite entre le déclenchement du laser et celui de la caméra. Il est donc contre-indiqué d'utiliser un logiciel simple de microscopie pour gérer le processus d'acquisition, puisque le temps qu'il mesure est inexact et correspond au temps mesurable du système d'exploitation de l'ordinateur. Le décompte de ce temps virtuel dépend de l'utilisation du processeur, et l'ouverture d'un navigateur internet ou une mise à jour automatique prend une part plus importante du processeur, ralentissant le décompte du temps pour le logiciel d'acquisition. Une solution envisageable est l'emploi d'un système d'exploitation temps réel tel que le système RTLinux qui affiche des temps de latence maximaux d'environ 25 μ s au lieu des 20ms typiques des systèmes standards. Cependant la solution choisie a été l'emploi d'un réseau de portes programmables (FPGA) pour contrôler le laser et la caméra, car un système similaire était opérationnel chez des collaborateurs. Nous étions donc assurés de sa faisabilité et l'expertise de ce type de montage était disponible. Les FPGA sont des réseaux de portes logiques dont on peut modifier les connexions. Nous pouvons écrire un programme en un langage de programmation commun (C, C++, ...), et un compilateur se charge de le traduire en un langage dédié aux architectures FPGA (VHDL, Verilog...). Un autre compilateur se charge ensuite de traduire ce programme en termes de connexions entre portes logiques, et de modifier les connexions conformément au résultat. Ces systèmes ont l'avantage de consommer moins d'énergie que des ordinateurs complets, de pouvoir réaliser un grand nombre d'opérations en parallèle, d'avoir des temps de latence très bas et de pouvoir fonctionner de manière autonome (très utile pour les systèmes embarqués notamment). Un inconvénient de taille cependant est la programmation fastidieuse de tels systèmes. Nous utilisons le cadre de programmation et d'interface LabVIEW, qui fournit un FPGA connecté à un contrôleur temps réel (CTR), c'est-à-dire un processeur exécutant un système d'exploitation temps réel. Leur programmation et leur compilation sont grandement simplifiées par le langage de programmation LabVIEW.

Il y a deux composantes dans la partie contrôle de l'acquisition (figure 4.3) : l'hôte, qui est un ordinateur standard de bureau où un système d'exploitation générique non temps réel est exécuté, et un banc d'acquisition comprenant un CTR, un FPGA et des modules d'acquisition (convertisseurs analogique / numérique, convertisseur numérique / analogique, entrées et sorties numériques, ...). Les programmes exécutés sur le CTR et l'hôte sont différents : sur l'hôte, le programme est une interface graphique (GUI) qui nous permet de choisir les paramètres d'acquisition et de demander le déclenchement ou l'interruption de l'acquisition. Ce programme est toujours sujet au temps virtuel de l'ordinateur, mais ce n'est pas un problème puisque lorsque l'on demande le démarrage de l'acquisition, les paramètres sont envoyés à la cible temps réel qui se charge alors de l'acquisition indépendamment de l'ordinateur de bureau. Les variables sont utilisées par le FPGA pour déclencher simultanément la caméra et l'AOTF, avec pour ce dernier les bonnes longueurs d'onde et puissances. Lorsque l'acquisition est terminée, un signal de fin est envoyé du FPGA vers le CTR qui l'indique à l'hôte. Les images sont envoyées par la caméra vers l'hôte, où elles sont enregistrées par MicroManager.

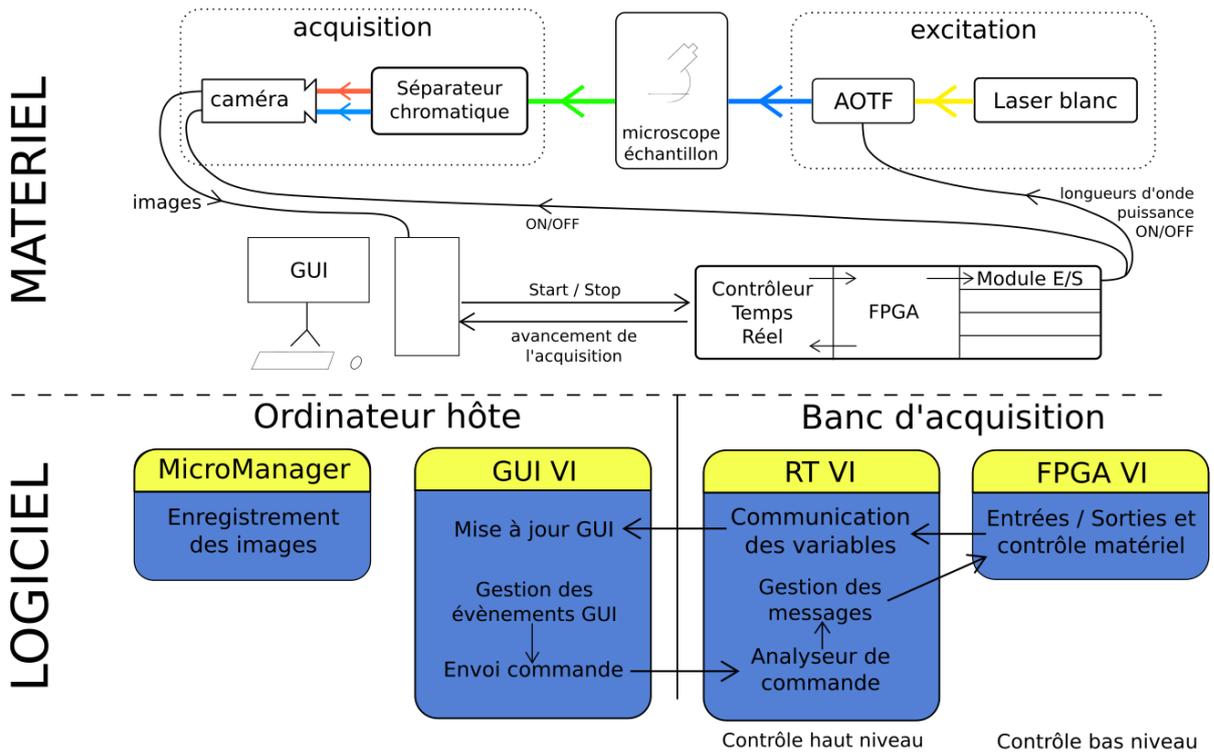


FIGURE 4.3 – Schéma de l'interfaçage entre les modules d'excitation, d'acquisition et l'ordinateur hôte.

Le projet LabVIEW réunissant les codes exécutés sur l'hôte, le CTR et le FPGA a été écrit originellement par notre collaborateur Fabian Wehnekamp, alors en thèse dans l'équipe du professeur Don C. Lamb à l'université Ludwig Maximilians (Munich). J'ai été amené au cours de ma thèse à modifier les codes pour ajouter des fonctionnalités selon nos besoins. Pour se faire il faut avant tout bien comprendre le fonctionnement général du projet et le fonctionnement plus détaillé de certains modules ou fonctions (appelés "VI" pour Virtual Instrument). Bien qu'une inspection détaillée du code et une lecture de la documentation officielle du FPGA est essentielle pour apporter efficacement des modifications au projet LabVIEW, en voici quelques explications :

Le projet comporte des Machines à États (ME), qui sont des processus pouvant se trouver dans différents états, mais toujours dans un seul à la fois. Un état donné détermine un certain nombre de tâches à effectuer et les états suivants possibles. Le processus peut alors changer d'état en fonction des signaux qu'il reçoit (signal TTL ou clique sur un bouton) ou des conditions réalisées (durée d'attente dépassée ("Timeout"), valeur critique atteinte, ...). Pour partager des informations entre les différentes ME, les variables de l'interface utilisateur sont stockées dans des groupes ("clusters") de variables correspondant aux différentes ME : les Variables de Machine à États (VME). Par exemple, la VME 1 contient des variables concernant le positionnement du point confocal, mais aussi celles indiquant les puissances laser souhaitées dans chaque canal. Ces dernières sont essentielles pour la ME 2 qui déclenche l'acquisition ALEX, elle a donc la référence à ce groupe de variables, et elle s'en sert pour lire la valeur des puissances, et déclencher ensuite l'illumination alternée de l'échantillon aux puissances adéquates. Le projet comporte 2 programmes, le programme Hôte exécuté sur l'ordinateur de bureau (ordinateur "Hôte"), et le programme CTR exécuté sur le banc d'acquisition (CTR+FPGA+Modules I/O). Les données des VME du programme Hôte sont transmises aux VME correspondantes dans le programme CTR, dont les propres ME vont lire aussi les valeurs des variables via des références aux VME et changer d'état pour exécuter des actions. Par exemple, lorsque la ME 2 du CTR lit la valeur "Vrai" de la variable "Start ALEX", elle déclenche une acquisition ALEX. Pour ce faire, le CTR passe les paramètres d'acquisition au FPGA, qui est chargé du minutage précis des signaux à envoyer à l'AOTF et à la caméra. Les données sont transmises entre le programme Hôte et celui du CTR par des tampons de données de type FIFO ("First-In-First-Out") spécifiques à chaque ME. Un FIFO est une mémoire dans laquelle les variables

sont lues dans l'ordre d'écriture dans le FIFO. Les FIFOs temps réels employés dans notre cas ont un comportement déterministe, allouent la mémoire en avance sans bloquer les boucles lorsqu'il sont écrit ou lus, et ne s'arrêtent pas lorsqu'une erreur d'exécution apparaît, ce qui permet de diminuer les latences et de ne pas ralentir les processus temps réels exécutés. Nous pouvons maintenant décrire l'arborescence du projet, qui est composée de 2 parties :

- la partie Hôte, exécutée sur l'ordinateur de bureau, qui contient 4 machines à états (ME) indépendantes, chacune ne pouvant se trouver que dans un seul état à la fois :
 - ME GUI : gestion de l'interface utilisateur, qui ne comporte qu'un unique état permettant d'actualiser les informations à afficher (graphes, barre de chargement, etc. ...)
 - ME 1 : contrôle le signal envoyé aux galvanomètres pour l'imagerie confocale et l'optogénétique, et contrôle la puissance laser dans chaque canal. Cette ME comporte 8 états qu'on ne détaillera pas ici puisqu'ils ne concernent pas le projet de cette thèse.
 - ME 2 : contrôle de la séquence ALEX et des puissances, qui comporte 4 états :
 - État 0 – Timeout : ne fait *rien* (attend un événement pour changer d'état)
 - État 1 – "Alex Variables" Value Change : actualisation du cluster des variables d'état de ME 2 (VME 2) et du graphe de la séquence d'illumination et de déclenchement de la caméra
 - État 2 – "Start Alex" Value Change : appelle la fonction qui communique avec le FPGA pour déclencher la séquence d'excitation alternée et d'acquisition des images
 - État 3 – "Enable Camera" Value Change : appelle la fonction qui autorise ou non l'acquisition d'images sans le contrôle du FPGA mais en passant par un logiciel tiers comme MicroManager
 - ME 3 : génération du signal pour les électroaimants (pour les expériences avec les substrats actifs), qui comporte 3 états :
 - État 0 – Timeout : actualisation de VME 3
 - État 1 – "Start Signal Generation" Value Change : appelle la fonction qui communique avec le FPGA pour varier l'intensité du courant envoyé dans les électroaimants, met à jour le graphe du courant envoyé en fonction du temps, et enregistre ces informations dans un tableau
 - État 2 – "Save Data" Value Change : enregistre le tableau de mesure de l'intensité en fonction du temps
- la partie CTR-FPGA, exécutée sur le banc d'acquisition, qui contient 4 ME :
 - ME d'envois des donnée du FPGA vers l'hôte, qui parcourt les FIFOs des 3 autres ME et si des données sont disponibles, les envoie à l'hôte
 - ME 1 qui contrôle les puissances laser de l'AOTF, le signal envoyé aux galvanomètres pour le système confocal 2D et 3D, le taux de comptage, le module d'optogénétique et la fin du programme
 - État 1 – "Idle", par défaut : dans l'état En attente, ME 1 met à jour de manière continue les puissances des canaux de l'AOTF. Ces mises à jours sont bloquées lorsque la caméra est en train d'acquérir des images pour éviter les changements d'intensité.
 - État 6 – "End Program" : Lorsque l'utilisateur met ME 1 dans cet état, la variable booléenne End Program est mise à 1 ("Vrai") ce qui arrête les autres ME
 - ME 2 chargée de contrôler les déclenchements simultanés du laser et de la caméra, et d'alterner selon le schéma demandé les illuminations aux différentes longueurs d'onde
 - État 0 – "Idle", par défaut : Attends une action de l'utilisateur et débloque le contrôle de la puissance de l'AOTF

État 1 – "ALEX" : Commence le cycle ALEX et envoie des pulses TTL à la caméra sCMOS synchronisés avec l'AOTF qui alterne les excitations avec 1, 2 ou 3 canaux (le 3^e est pour la TFM) pour un certain nombre de cycles. Dans cet état, le contrôle de la puissance de l'AOTF est désactivé.

État 2 – "Enable Camera" : Envoie des pulses TTL à la caméra sCMOS dont la durée correspond au temps d'exposition choisit dans l'interface utilisateur

- ME 3 qui contrôle le courant d'entrée dans les électroaimants en générant un signal sinusoïdal ou en créneaux

État 0 – "Idle", par défaut : Attends une action de l'utilisateur

État 1 – "Start Magnetic Coil" : Démarre la génération d'un signal sinusoïdal ou en créneaux, et enregistre l'entrée analogique d'un signal (typiquement d'une sonde à effet Hall)

4.2 Analyse de données ALEX

L'analyse des données d'ALEX FRET acquises avec une APD est facilement transposable aux données obtenues en plein champ, puisqu'on réalise les mêmes opérations entre les 3 valeurs fournies par l'APD $\{F_{D_{ex}}^{D_{em}}, F_{D_{ex}}^{A_{em}}, F_{A_{ex}}^{A_{em}}\}$ et les 3 valeurs des pixels aux mêmes positions dans les images $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$. Donc les équations (3.17) et (3.18) deviennent :

$$E = \frac{I_{DA}^{corr}}{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}} \quad (4.1)$$

et

$$S = \frac{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}}{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD} + I_{AA}/\gamma^X} \quad (4.2)$$

Nous verrons dans la partie suivante comment nous avons obtenu ces équations et où elles se situent par rapport à la littérature. Pour le calcul de E et S, les opérations entre images sont réalisées pixel par pixel. Par exemple $I_{DA} + \gamma^M I_{DD}$ signifie qu'on parcourt tous les pixels de I_{DA} , et pour chaque pixel on additionne sa valeur à celle du pixel à la même position dans l'image I_{DD} multipliée par la constante γ^M .

L'image notée I_{DA} est ici corrigée pour le débordement de spectre et l'excitation directe. Ces corrections sont assez simples à réaliser et elles sont souvent appliquées (voir page 77).

Pour calculer des valeurs d'efficacité de FRET plus quantitatives, il faut de plus prendre en compte les différences de rendement quantique et d'efficacité de détection entre les fluorophores donneur et accepteur. C'est le but du γ^M introduit dès les premières expériences d'ALEX FRET [134] dont la détermination a suscité la mise au point de nombreuses méthodes expérimentales :

HA et WEISS [133] ainsi que ZAL et GASCOIGNE [139] déterminent γ^M en photoblanchissant les accepteurs. HOPPE *et al.* [152] déterminent γ^M noté ξ/γ à partir des intensités de fluorescence d'une construction D+A dont l'efficacité de FRET est connue, par exemple par FLIM. CHEN *et al.* [153] calculent d'abord γ^M à partir des intensités de fluorescence de 2 constructions D+A d'efficacité de FRET différentes et inconnues, puis ils déterminent γ^X avec une de ces constructions. LEE *et al.* [147] calculent γ^M et γ^X en traçant $1/S$ en fonction de E lorsque les mesures sont corrigées seulement pour γ^{BT} et γ^{DE} . Ils obtiennent une droite dont l'ordonnée à l'origine et le coefficient directeur leur permettent de calculer γ^M et γ^X .

Les méthodes de détermination des coefficients et leur dénominations sont nombreuses, et il est facile de s'y perdre. C'est pour mieux comprendre la théorie de l'analyse des données de FRET 3-cubes que nous sommes repartis de zéro et avons redéveloppé les équations qui nous permettent de mesurer les efficacités de FRET et stœchiométries apparentes. Ce travail nous a permis de développer une nouvelle méthode pour déterminer les coefficients γ^M et γ^X .

4.3 Les équations de l’ALEX FRET

Le signal contenu dans un pixel correspond à la somme des signaux émis par les fluorophores qui sont présents dans le volume d’observation correspondant au pixel. Afin d’obtenir un cadre théorique pour analyser nos images, nous décomposons ce signal selon les paramètres pertinents à notre montage expérimental :

I_{DD} le signal mesuré dans le canal donneur après excitation à une longueur d’onde d’excitation du donneur

I_{DA} le signal mesuré dans le canal accepteur après excitation à une longueur d’onde d’excitation du donneur

I_{AA} le signal mesuré dans le canal accepteur après excitation à une longueur d’onde d’excitation du accepteur

n^i la quantité de fluorophores d’espèce i (D pour donneur et A pour accepteur)

L_{iex} intensité d’excitation à la longueur d’onde d’excitation du fluorophore i

σ_i^j section efficace d’absorption du fluorophore j à la longueur d’onde d’excitation i

ϕ_i rendement quantique du fluorophore i

η_i^j efficacité de détection du photon émis par le fluorophore j dans le canal i

E probabilité de FRET

Il est plus simple de commencer à décrire le signal I_{AA} : l’intensité du signal est simplement proportionnelle à la quantité de fluorophores accepteur n^A , à l’intensité d’excitation à la longueur d’onde d’excitation du fluorophore accepteur L_{Aex} , à la section efficace d’absorption du fluorophore accepteur à la longueur d’onde d’excitation de l’accepteur σ_A^A , au rendement quantique du fluorophore accepteur ϕ_A et à l’efficacité de détection du photon émis par le fluorophore accepteur dans le canal accepteur η_A^A . On a donc :

$$I_{AA} = n^A L_{Aex} \sigma_{Aex}^A \phi_A \eta_{Adet}^{Aem}$$

Concernant le signal I_{DD} , on procède de même à l’exception près que seule la proportion $(1 - E)$ des fluorophores donneurs qui n’ont pas subi de FRET contribuent au signal, donc :

$$I_{DD} = n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D (1 - E) \phi_D \eta_{Ddet}^{Dem}$$

Enfin, le signal I_{DA} peut être décrit par 3 contributions distinctes lors de l’illumination à la longueur d’onde d’excitation des donneurs :

- l’énergie absorbée par les fluorophores donneurs et transférée aux accepteurs par FRET, qui l’émettent dans le canal accepteur :

$$n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D E \phi_A \eta_{Adet}^{Aem}$$

- l’énergie absorbée par les fluorophores donneurs qui ne frettent pas, et qui l’émettent dans le canal accepteur (Bleed Through) :

$$n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D (1 - E) \phi_D \eta_{Adet}^{Dem}$$

- et l’énergie absorbée par les fluorophores accepteurs, qui l’émettent dans le canal accepteur (Direct Excitation) :

$$n^A L_{Dex} \sigma_{Dex}^A \phi_A \eta_{Adet}^{Aem}$$

Et nous avons vu précédemment que I_{AD} était négligeable. Nous avons donc :

$$I_{DD} = n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D (1 - E) \phi_D \eta_{Ddet}^{Dem} \quad (4.3a)$$

$$I_{AA} = n^A L_{Aex} \sigma_{Aex}^A \phi_A \eta_{Adet}^{Aem} \quad (4.3b)$$

$$I_{DA} = n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D E \phi_A \eta_{Adet}^{Aem} + n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D (1 - E) \phi_D \eta_{Adet}^{Dem} + n^A L_{Dex} \sigma_{Dex}^A \phi_A \eta_{Adet}^{Aem} \quad (4.3c)$$

Nous souhaitons avoir une mesure quantitative de E , et ce que nous avons est le triplet de mesures $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$. La connaissance des facteurs n, L, σ, ϕ, η nous permettrait de calculer E , mais leur détermination est extrêmement compliquée. Une approche alternative et pragmatique est de mesurer le signal provenant d'échantillons contenant seulement des fluorophores donneurs, ou seulement des fluorophores accepteurs.

Donneur seul	Accepteur seul
$n^A = 0$ et $E = 0$	$n^D = 0$ et E non défini
$\begin{cases} I_{DD} = n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D \phi_D \eta_{Ddet}^{Dem} \\ I_{AA} = 0 \\ I_{DA} = n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D \phi_D \eta_{Adet}^{Dem} \end{cases}$	$\begin{cases} I_{DD} = 0 \\ I_{AA} = n^A L_{Aex} \sigma_{Aex}^A \phi_A \eta_{Adet}^{Aem} \\ I_{DA} = n^A L_{Dex} \sigma_{Dex}^A \phi_A \eta_{Adet}^{Aem} \end{cases}$
on peut alors calculer :	
$\frac{I_{DA}}{I_{DD}} = \frac{\eta_{Adet}^{Dem}}{\eta_{Ddet}^{Dem}} = \gamma^{BT}$	$\frac{I_{DA}}{I_{AA}} = \frac{L_{Dex} \sigma_{Dex}^A}{L_{Aex} \sigma_{Aex}^A} = \gamma^{DE}$

γ^{BT} pour *Bleed Through*, ou débordement de spectre en français, et γ^{DE} pour *Direct Excitation*, ou excitation directe en français, sont utilisés pour corriger le signal dans le canal I_{DA} . γ^{BT} est le ratio entre l'énergie émise par les fluorophores donneurs dans le canal accepteur sur l'énergie émise dans le canal donneur. Il dépend seulement du spectre d'émission du fluorophore donneur, des filtres employés dans le microscope, et de la réponse spectrale de la caméra.

γ^{DE} est le ratio entre l'énergie absorbée par les accepteurs après illumination à la longueur d'onde d'excitation des donneurs sur l'énergie absorbée par les accepteurs après illumination à la longueur d'onde d'excitation des accepteurs. Il dépend du spectre d'excitation du fluorophore accepteur, mais aussi du ratio des puissances d'illumination donneur/accepteur.

Dans des conditions expérimentales fixées (mêmes espèces de fluorophores, mêmes filtres, etc...), les corrections à apporter dans le canal I_{DA} dépendent seulement des quantités de fluorophores donneurs et accepteurs, les ratios γ^{BT} et γ^{DE} ne varient pas. Comme signal des canaux I_{DD} et I_{AA} est proportionnel aux quantités de fluorophores n^D et n^A , les corrections à apporter au canal I_{DA} sont $\gamma^{BT} I_{DD}$ et $\gamma^{DE} I_{AA}$, ce qui se voit directement sur la dernière ligne du tableau ci-dessus.

$$(4.3c) \leftrightarrow I_{DA} = I_{DD} \frac{E}{1 - E} \frac{\phi_A \eta_{Adet}^{Aem}}{\phi_D \eta_{Ddet}^{Dem}} + I_{DD} \frac{\eta_{Adet}^{Dem}}{\eta_{Ddet}^{Dem}} + I_{AA} \frac{L_{Dex} \sigma_{Dex}^A}{L_{Aex} \sigma_{Aex}^A} \quad (4.4)$$

$$\text{en notant } \gamma^M = \frac{\phi_A \eta_{Adet}^{Aem}}{\phi_D \eta_{Ddet}^{Dem}} \quad (4.5)$$

$$I_{DA} = I_{DD} \frac{E}{1 - E} \gamma^M + I_{DD} \gamma^{BT} + I_{AA} \gamma^{DE} \quad (4.6)$$

En réarrangeant :

$$E = \frac{I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA}}{I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD}} \quad (4.7)$$

Pour simplifier, on note

$$I_{DA}^{corr} = I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} \quad (4.8)$$

On a donc

$$E = \frac{I_{DA}^{corr}}{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}} \quad (4.9)$$

Par ailleurs, si nous définissons la stœchiométrie comme le rapport de la quantité de fluorophores donneurs par la quantité de fluorophores totale :

$$S = \frac{n^D}{n^D + n^A} = \frac{1}{1 + \frac{n^A}{n^D}} \quad (4.10)$$

en reprenant n^D et n^A de (4.3a) et (4.3b) :

$$S = \frac{1}{1 + \frac{I_{AA}}{I_{DD}} \frac{L_{Dex} \sigma_{Dex}^D \phi_D \eta_{Ddet}^{Dem}}{L_{Aex} \sigma_{Aex}^A \phi_A \eta_{Adet}^{Aem}} (1 - E)} \quad (4.11)$$

on avait $\gamma^M = \frac{\phi_A \eta_{Adet}^{Aem}}{\phi_D \eta_{Ddet}^{Dem}}$, on définit maintenant $\gamma^X = \frac{L_{Aex} \sigma_{Aex}^A}{L_{Dex} \sigma_{Dex}^D}$

$$\text{donc } S = \frac{1}{1 + \frac{I_{AA}}{I_{DD}} \frac{1}{\gamma^X \gamma^M} (1 - E)} \quad (4.12)$$

$$\text{par (4.7) } S = \frac{I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD}}{I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD} + I_{AA}/\gamma^X} \quad (4.13)$$

$$\text{c'est-à-dire } S = \frac{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}}{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD} + I_{AA}/\gamma^X} \quad (4.14)$$

γ^M , M pour *émission*, permet de tenir compte de la différence de signal mesuré lorsque une même quantité d'énergie est absorbée par un fluorophore donneur ou accepteur. C'est pour cela qu'il comprend le rendement quantique et l'efficacité de détection des photons émis par chaque espèce dans leur canal respectif. γ^X , X pour *excitation*, nous permet de tenir compte de la différence d'absorption d'énergie de chaque espèce, d'où la présence de la puissance d'illumination et la section efficace d'absorption du fluorophore dans la définition de ce facteur.

Une autre façon d'obtenir la formule permettant de calculer E est de considérer l'énergie absorbée par les fluorophores donneurs, dont une partie va être transmise aux fluorophores accepteurs tandis que l'autre partie "reste chez les donneurs". Nous pouvons alors choisir de définir l'efficacité de FRET comme le ratio entre l'énergie absorbée puis transmise par l'énergie absorbée totale. Nous obtenons alors une formule identique à (4.9), la procédure est détaillée dans l'annexe B.1.

Nous obtenons donc une formule identique pour le calcul de l'efficacité de FRET à celle de ZAL ET GASCOIGNE [139], de CHEN *et al.* [153] et de LEE *et al.* [147]. Nous calculons aussi la stœchiométrie avec des paramètres ayant les mêmes significations photophysiques que ces 2 derniers, bien que CHEN *et al.* la calculent comme le ratio des concentrations des 2 espèces $[D]/[A]$, alors que LEE *et al.* calculent comme nous l'observable $[D]/([D] + [A])$ qui a l'avantage de varier linéairement avec les quantités de matière.

4.4 Mise en pratique

4.4.1 Traitement d'image

Pour obtenir des données quantitatives de FRET, nous devons employer des facteurs de corrections qui nous permettent de corriger les phénomènes physiques inhérents à notre montage expérimental, comme les propriétés spectrales de fluorophores ou des filtres employés, même si nous acquérons des images "idéales". Or ces images ne sont pas idéales mais bien sujettes à des artefacts dus à la technique d'acquisition employée, comme l'utilisation d'une caméra CCD ou CMOS. L'imagerie quantitative requière donc la correction de ces défauts au moyen la procédure suivante :

1. **Soustraction du noir** : la puce CMOS de la caméra génère des électrons même en absence de photon (figure 4.4). La première cause est un biais (offset en anglais) qui peut être un signal électronique constant ajouté par le constructeur. La deuxième cause est le bruit thermique : le déplacement aléatoire des électrons dans les composants électroniques génère un signal qui augmente avec la température et le temps d'exposition. Certains pixels "chauds" peuvent générer un signal fort bien qu'il n'y ait pas d'interaction avec un photon. Pour corriger ce signal parasite, on peut prendre plusieurs images avec l'obturateur de la caméra fermé. On réalise un "maître noir" en moyennant ces images, il sera soustrait aux prochaines images.

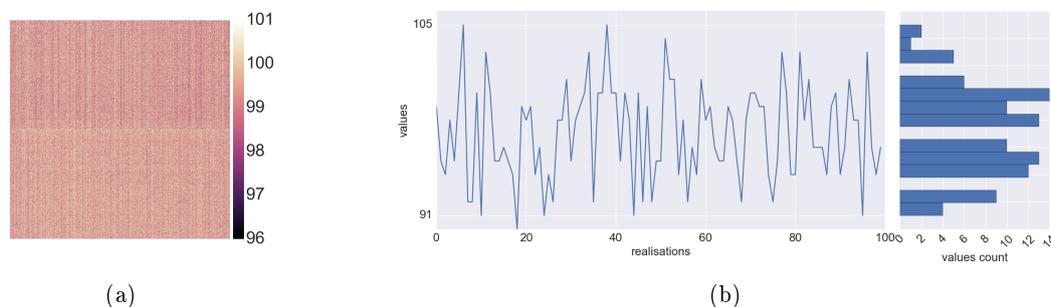


FIGURE 4.4 – (a) Image du maître noir. Chaque pixel a une contribution constante indépendante des photons reçus et différente de ses voisins. (b) Valeurs d'un même pixel pour 100 acquisitions de noir. Les valeurs mesurées sont aléatoirement réparties autour d'une valeur qui constituera celle du pixel du maître noir.

2. **Correction de la plage de lumière uniforme (PLU ou flat field)** : l'illumination de l'échantillon et la détection ne sont pas homogènes spatialement. En effet le faisceau laser qui excite l'échantillon présente un profil d'intensité gaussien. Le faisceau est élargi puis fenêtré spatialement pour avoir une meilleure homogénéité. Cependant le profil d'intensité affiche toujours un maximum, et des poussières sur le chemin optique ainsi que le vignettage altèrent plus encore l'homogénéité de l'image. Pour palier à ces défauts, on image un échantillon uniformément fluorescent et on soustrait le maître noir. On crée la PLU en normalisant l'image par son maximum, ou pour plus de robustesse par son 99ème percentile, en normalisant les valeurs supérieures à 1. Les futures images seront alors divisées par la PLU.

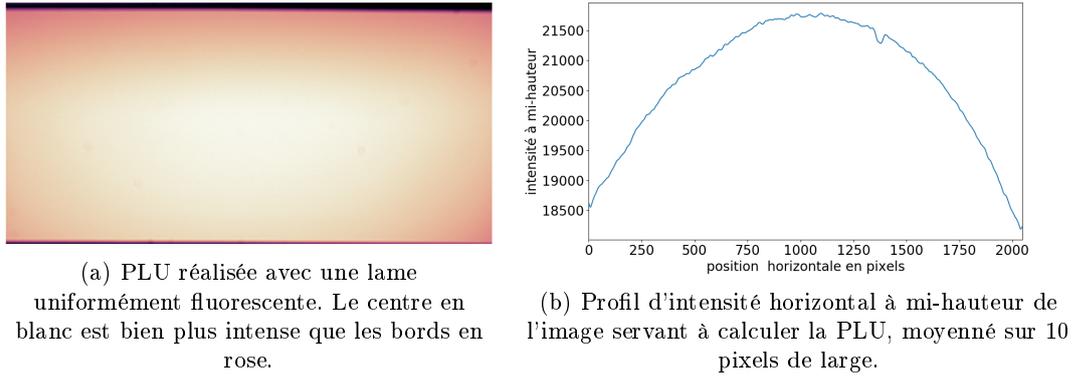


FIGURE 4.5 – La Plage de Lumière Uniforme

3. **Correction de l'alignement** : les calculs pour obtenir des cartes de E et S sont réalisés pixel par pixel, c'est-à-dire qu'un pixel à une certaine position dans la carte de E correspond au pixel à la même position dans la carte de S, et qu'il a impliqué des calculs à partir des pixels à la même position dans les canaux I_{DD} , I_{DA} , et I_{AA} . Il est donc impératif que les pixels de ces canaux correspondent à la même zone de l'objet observé. Or, si la lumière formant l'image dans les canaux I_{DA} et I_{AA} suit le même chemin optique, celle qui arrive dans le canal I_{DD} a suivi un autre chemin. On utilise alors un échantillon assez structuré spatialement, comme des billes micrométriques déposées à la surface d'une lamelle, que l'on observe en plein champ. Nous obtenons ainsi deux images, I_{DD} et I_{DA} , qui correspondent au même objet mais qui sont décalées entre elles. On peut faire un premier alignement au niveau des miroirs dans le séparateur chromatique, mais il restera relativement grossier et un alignement numérique reste nécessaire (figure 4.6).

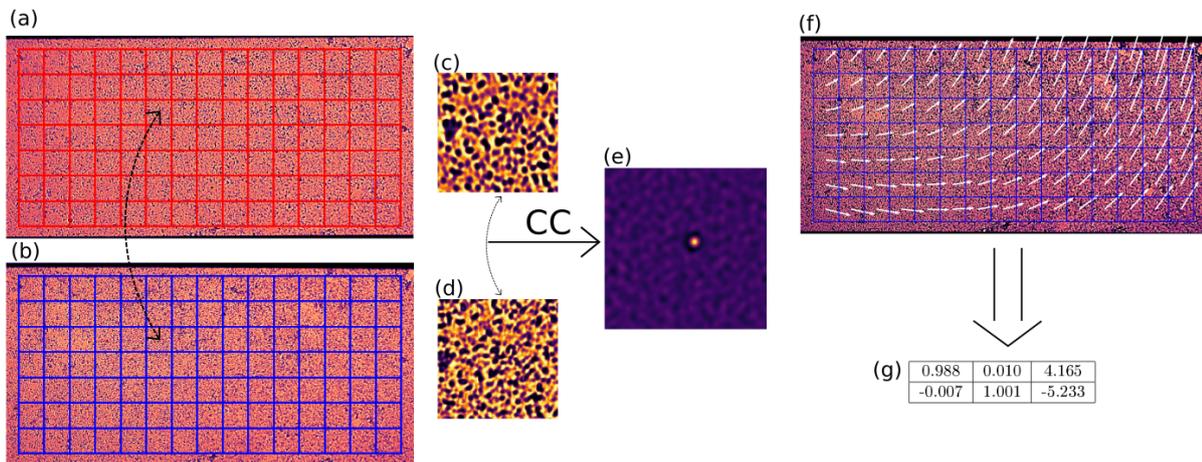


FIGURE 4.6 – L'alignement numérique des canaux

L'alignement numérique des canaux est réalisé en imageant un objet visible dans les 2 canaux. Les deux images sont alors divisées en vignettes qui correspondent entre les canaux ((a) et (b)). On détermine le déplacement d'une vignette d'un canal (c) par rapport à la vignette correspondante dans l'autre canal (d) en calculant leur corrélation croisée 2D (e). Cette opération est réalisée pour toutes les vignettes, on obtient donc une carte des déplacements des vignettes d'un canal par rapport à celle de l'autre canal (f). Cette carte sert à calculer la matrice de transformation affine (g) qui définit la différence entre les canaux en termes de déplacements latéraux, de rotation, de changement d'échelle et de cisaillement.

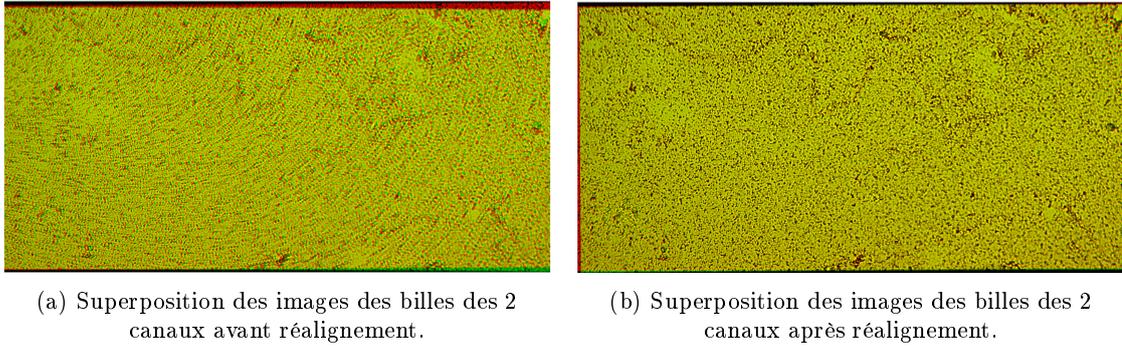


FIGURE 4.7 – L’alignement des canaux sur des images de billes micrométriques. Le canal donneur est coloré en vert, l’accepteur en rouge. Les zones jaunes correspondent à la superposition de leurs signaux.

4. **Soustraction du fond** : la surface sur laquelle adhèrent les cellules ainsi que le milieu d’observation contribuent au signal enregistré sur la caméra, indépendamment de la présence de fluorophores dans les cellules. Nous devons donc soustraire ce signal de fond (background en anglais) pour ne pas l’inclure dans les calculs des facteurs de correction ni de E et S . On sélectionne pour cela une zone de l’image où il n’y a pas de cellule, et on soustrait la moyenne ou la médiane des valeurs de cette zone à toute l’image. Si aucune zone sans cellule n’est disponible, comme c’est le cas lorsqu’on observe un épithélium par exemple, on peut employer des techniques d’estimation du fond basée sur l’analyse de l’histogramme des valeurs des pixels de l’image. On peut réaliser une estimation du fond à chaque nouvelle image, ou bien une estimation commune pour une série d’acquisitions si elles sont réalisées dans les mêmes conditions (temps d’exposition, espèces de fluorophores, milieu d’observation, ...).

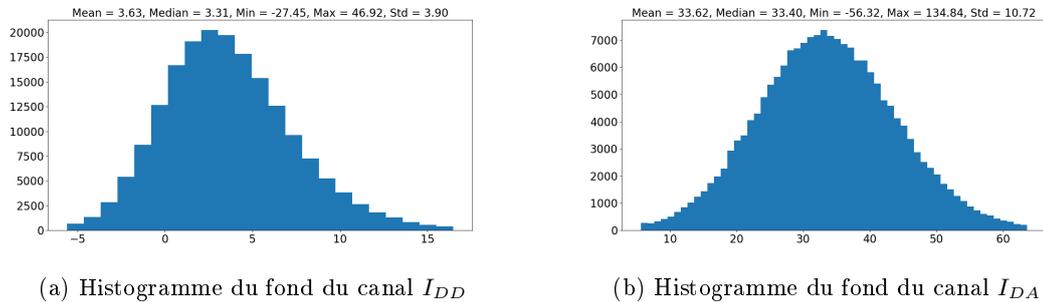


FIGURE 4.8 – Histogrammes du fond de 2 canaux différents après soustraction du maître noir. Les distributions du signal de fond diffèrent dans leur moyenne, leur écart-type et leurs extrema. On remarque que certains pixels ont des valeurs négatives. Ceci est dû au très faible signal de fluorescence mesuré dans le canal I_{DD} ainsi qu’à la stochasticité du bruit de mesure et du signal noir. Plus le signal dans I_{DD} est faible, plus les signaux que l’on soustrait ont des distributions similaires de processus aléatoires.

Il est à noter que la soustraction de fond peut palier dans une certaine mesure à l’absence de maître noir, puisque sans soustraction du noir, chaque pixel contient la contribution du biais et du bruit thermique en plus du signal généré par le milieu d’observation. En revanche cette technique ne permet pas de prendre en compte les spécificités de chaque pixel concernant le biais et le bruit, des pixels chauds peuvent ainsi augmenter le signal de fond mesuré, induisant une sur-correction pour les autres pixels, sans pour autant que leur trop haut signal soit corrigé correctement. La figure 4.9 permet de visualiser ce propos : Le signal du noir (en bleu) s’ajoute au bruit de mesure (en rouge). Le signal mesuré (orange) peut être corrigé en enlevant la moyenne (ligne bleue) à tous les pixels. Il en résulte un signal qui présente une grande variabilité (en jaune) si le signal de fond est notablement plus important que le bruit. Lorsqu’on dispose de l’information sur le signal de noir, il vaut mieux enlever d’abord ce signal spécifique à chaque pixel (signal en vert), puis retirer

la moyenne (ligne orange) des valeurs résultantes. La distribution des valeurs est alors bien plus resserrée (attention à l'échelle) que lorsqu'on retire simplement la moyenne du signal mesuré.

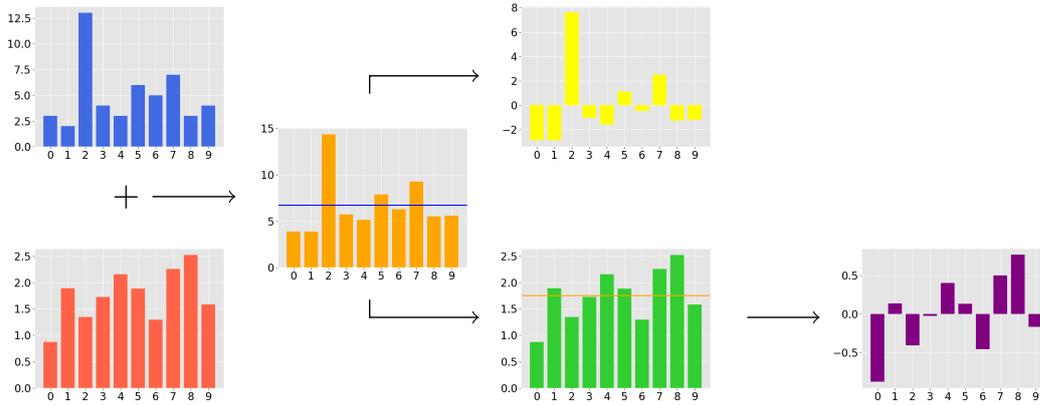


FIGURE 4.9 – Schéma illustrant la suppression du signal du noir et du bruit.

5. **Soustraction de l'autofluorescence** : Les cellules contiennent naturellement des espèces fluorescentes. Ces fluorophores intrinsèques génèrent un signal d'*autofluorescence* qui s'ajoute à la fluorescence des fluorophores extrinsèques que l'on souhaite observer. Cette autofluorescence est majoritairement observable dans les mitochondries et les lysosomes, et de nombreuses espèces peuvent y contribuer, telles que les acides aminés aromatiques, le collagène, les NADH, les flavines et riboflavines. Pour supprimer cette contribution, il faut imager des cellules non transfectées. Le signal est en général assez faible pour se confondre avec le bruit de mesure, on peut alors augmenter considérablement le temps d'exposition pour distinguer le signal provenant de l'autofluorescence des cellules. Comme le signal est proportionnel au temps d'exposition, on peut déterminer de cette façon une autofluorescence par unité de temps pour chaque canal de mesure. La principale difficulté réside dans la non-homogénéité spatiale de l'autofluorescence (figure 4.10a). Certaines zones, correspondant certainement aux mitochondries ou aux lysosomes, présentent un signal élevé, alors que les zones voisines ont un signal variant autour de 0. Il faudrait donc idéalement supprimer la juste part due à l'autofluorescence dans chaque pixel, et non une même valeur pour tous les pixels. Ceci est possible en FLIM si les fluorophores intrinsèques ont des temps de vie significativement différents des fluorophores extrinsèques, et en imagerie spectrale si les spectres d'excitation et/ou d'émission des fluorophores intrinsèques sont aussi assez différents des spectres des fluorophores extrinsèques. Dans notre cas nous n'avons pas assez de types de données (comme le nombre de canaux d'excitation ou d'émission) pour distinguer le signal des fluorophores extrinsèques de celui des espèces autofluorescentes. Il nous faut donc être particulièrement attentifs à ce problème et le minimiser en employant des milieux d'imagerie qui réduisent fortement l'autofluorescence des cellules. Lors de l'analyse des données, nous *choisissons* de prendre la médiane du signal mesuré dans chaque canal pour définir l'autofluorescence propre à ce canal.

Il s'avère que grâce à la mesure de la stœchiométrie, nous pouvons tout de même éliminer de l'analyse les zones où l'autofluorescence est assez importante pour faire dévier de manière significative la stœchiométrie d'une valeur cible, 0.5 dans le cas de biosenseurs portant un fluorophore donneur et un accepteur (figures 4.10b-c).

En outre, la faiblesse du signal d'autofluorescence impose lors de l'analyse des données une attention particulière lors de la définition du masque de fond. En effet, lorsqu'on définit le masque de fond pour une image où une cellule présente une intensité de fluorescence très importante, la représentation des données à l'utilisateur rend indistinguable de potentielles cellules très faiblement fluorescentes du véritable fond. Il faut alors compresser les signaux, en affichant la racine carrée ou le logarithme des intensités de l'image.

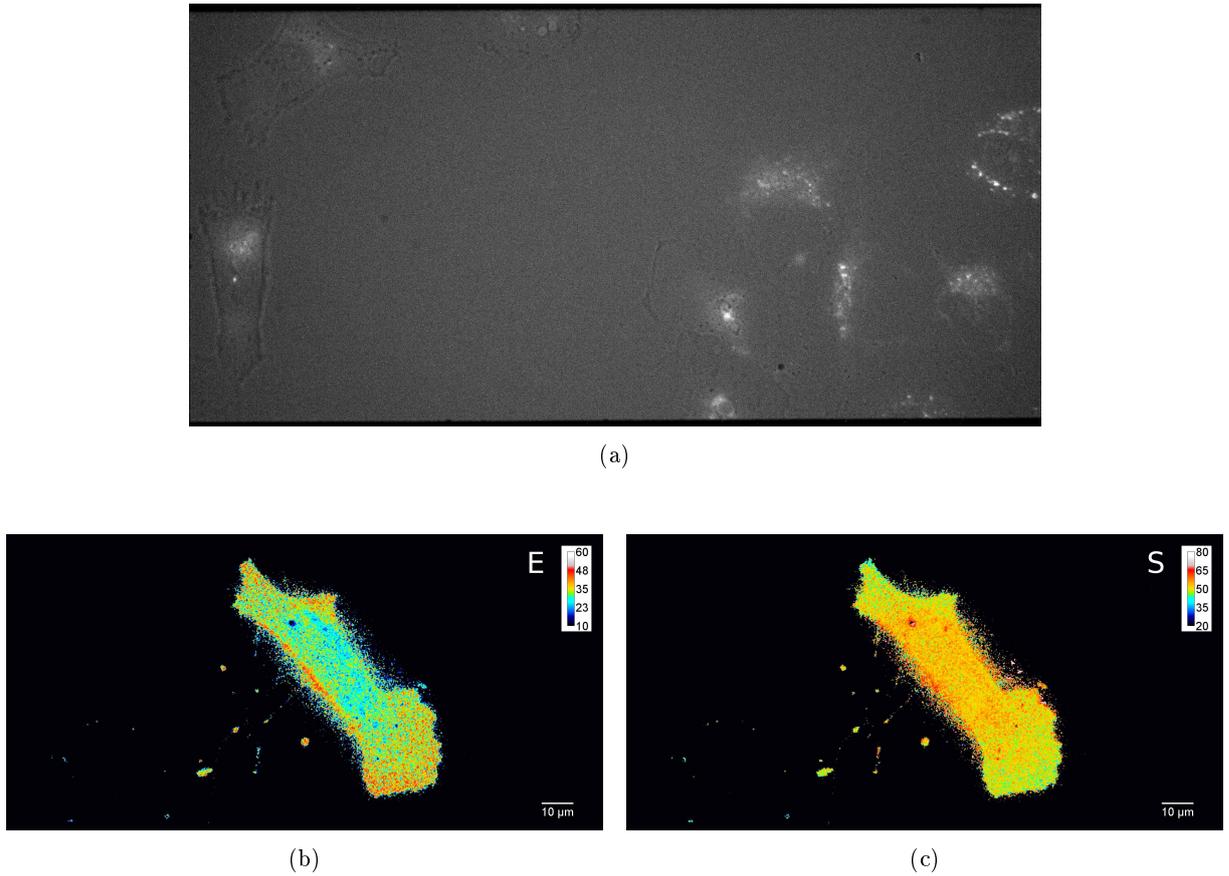


FIGURE 4.10 – (a) L’autofluorescence des cellules varie spatialement. Ici ce qui semble correspondre à des organelles (Golgi, ER, . . .) sont les zones de plus grande autofluorescence, alors que le reste de la cellule présente une autofluorescence quasi-nulle. (b) Les mesures d’efficacité de FRET E diminuent fortement dans certaines zones. (c) La carte de stœchiométrie permet d’ignorer des zones de l’analyse où elle s’écarte trop de la valeur cible $S = 0.5$. On remarque que les zones de très faibles valeurs de E correspondent aux zones de très hautes valeurs de S .

Les procédures précédentes sont utilisées pour chaque triplet d’acquisition $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ pour obtenir une *estimation* des images "idéales", c’est-à-dire les images que nous obtiendrions s’il n’y avait pas ces artefacts. Ce sont ces images corrigées qui servent ensuite à calculer les facteurs de correction relatifs au FRET puis les cartes de E et S .

Les premiers facteurs à déterminer sont γ^{BT} et γ^{DE} , ce sont aussi les plus évidents du point de vue de la théorie, et les procédures sont similaires entre ces 2 facteurs.

Détermination de γ^{BT}

Pour déterminer γ^{BT} nous avons besoin de cellules qui expriment le fluorophore donneur seulement. Dans notre cas nous transfectons des cellules Hela avec un plasmide codant pour la protéine fluorescente Cerulean [154]. On image plus d’une dizaine de cellules, et pour chaque triplet ALEX, on définit un masque de fond et un masque de la cellule. Chaque image du triplet ALEX est ensuite soumise aux corrections vues précédemment (noir, PLU, alignement, fond et autofluorescence). Différentes méthodes sont ensuite proposées pour déterminer γ^{BT} :

1. calculer le ratio des sommes des intensités des canaux I_{DD} et I_{DA} : $\gamma^{BT} = \frac{\sum I_{DA}}{\sum I_{DD}}$
2. calculer les moyennes ou médianes $\overline{I_{DD}}$ et $\overline{I_{DA}}$ des valeurs dans le masque de la cellule dans les images I_{DD} et I_{DA} respectivement, puis déterminer γ^{BT} en calculant le rapport

$$\gamma^{BT} = \frac{\overline{I_{DA}}}{\overline{I_{DD}}}$$

Nous avons alors un γ^{BT} par cellule, on peut choisir comme valeur de référence la moyenne ou la médiane de ces γ^{BT}

3. une variante de cette technique est de calculer $\overline{I_{DD}}$ et $\overline{I_{DA}}$ sur l'ensemble des valeurs de toutes les cellules, et le rapport de ces valeurs sera le γ^{BT} de référence.
4. il a été aussi proposé [155] de trier par ordre croissant les valeurs pour chaque canal, de les agréger par classe (bin en anglais), et de moyenner les valeurs dans chaque classe. γ^{BT} est déterminé en calculant la pente du fit des valeurs de I_{DA} en fonction de I_{DD} . Le tri des données perd l'information de correspondance entre les pixels des différents canaux.
5. la méthode que nous proposons consiste à générer l'image I_{BT} en divisant l'image I_{DA} par I_{DD} (figure 4.11b). Nous avons alors dans le masque de la cellule des milliers de valeurs de γ^{BT} calculées à chaque fois avec des pixels correspondant spatialement entre eux. On réalise cette opération pour toutes les cellules, et on peut finalement choisir comme valeur de référence la moyenne ou la médiane des valeurs calculées. Nous pouvons réaliser un examen plus approfondi pour vérifier si γ^{BT} est bien indépendant de l'intensité du signal. Pour cela on trace l'histogramme à 2 dimensions des valeurs de I_{BT} et de I_{DD} (figure 4.11a). On observe 2 zones sur l'histogramme : la première correspond aux pixels de faible intensité dans les images I_{DD} , et présente une grande variabilité des valeurs de I_{BT} à cause des erreurs de calcul plus grandes lorsque des signaux trop faibles sont mesurés. La deuxième zone correspond aux pixels de grande intensité dans les images I_{DD} , et les valeurs de I_{BT} sont réparties autour d'une valeur commune, malgré une certaine variabilité. Pour les cellules peu intenses (figure 4.11c), la distribution des γ^{BT} est plus asymétrique, et les valeurs peuvent atteindre 10 fois la valeur estimée de γ^{BT} aux plus faibles intensités. En examinant la distribution des valeurs de I_{BT} des cellules (figure 4.11d), on remarque que certaines distributions sont très dispersées, elles correspondent aux cellules les moins intenses. La médiane (lignes rouges) est un indicateur plus robuste que la moyenne (points rouges). On choisit finalement de calculer γ^{BT} à partir des pixels de plus haute intensité seulement, en sélectionnant dans les images I_{BT} ceux qui correspondent aux 30% des valeurs les plus élevées des images I_{DD} et en calculant leur médiane. Sur l'histogramme 2D des valeurs de I_{BT} et de I_{DD} (figure 4.11e) la distribution des valeurs de I_{BT} est bien plus homogène. Cela se traduit pour toutes les cellules par une distribution symétrique et plus resserrée des valeurs de I_{BT} (figure 4.11d), les distributions des cellules peu intenses sont seulement plus dispersées que celles des cellules intenses. En définitive, notre technique produit des résultats similaires aux précédentes, tout en nous permettant de vérifier visuellement la qualité des données et des facteurs de correction sur des points critiques tels que l'indépendance des valeurs de γ^{BT} par rapport à l'intensité de fluorescence.

Détermination de γ^{DE}

La procédure de détermination de γ^{DE} est similaire à celle de γ^{BT} . Il nous faut cette fois-ci des cellules exprimant le fluorophore accepteur seulement, on transfecte donc les cellules avec un plasmide codant pour le fluorophore Venus [156] dans notre cas. On image de la même façon plus d'une dizaine de cellules, et pour chaque triplet ALEX, on définit un masque de fond et un masque de la cellule. On calcule la valeur de référence γ^{DE} selon la méthode que nous avons proposé pour γ^{BT} : on génère les images I_{DE} en divisant pour chaque triplet ALEX l'image I_{DA} par I_{AA} , et nous choisissons la médiane des pixels des I_{DE} qui correspondent aux 30% des valeurs les plus élevées des I_{AA} et en calculant leur médiane.

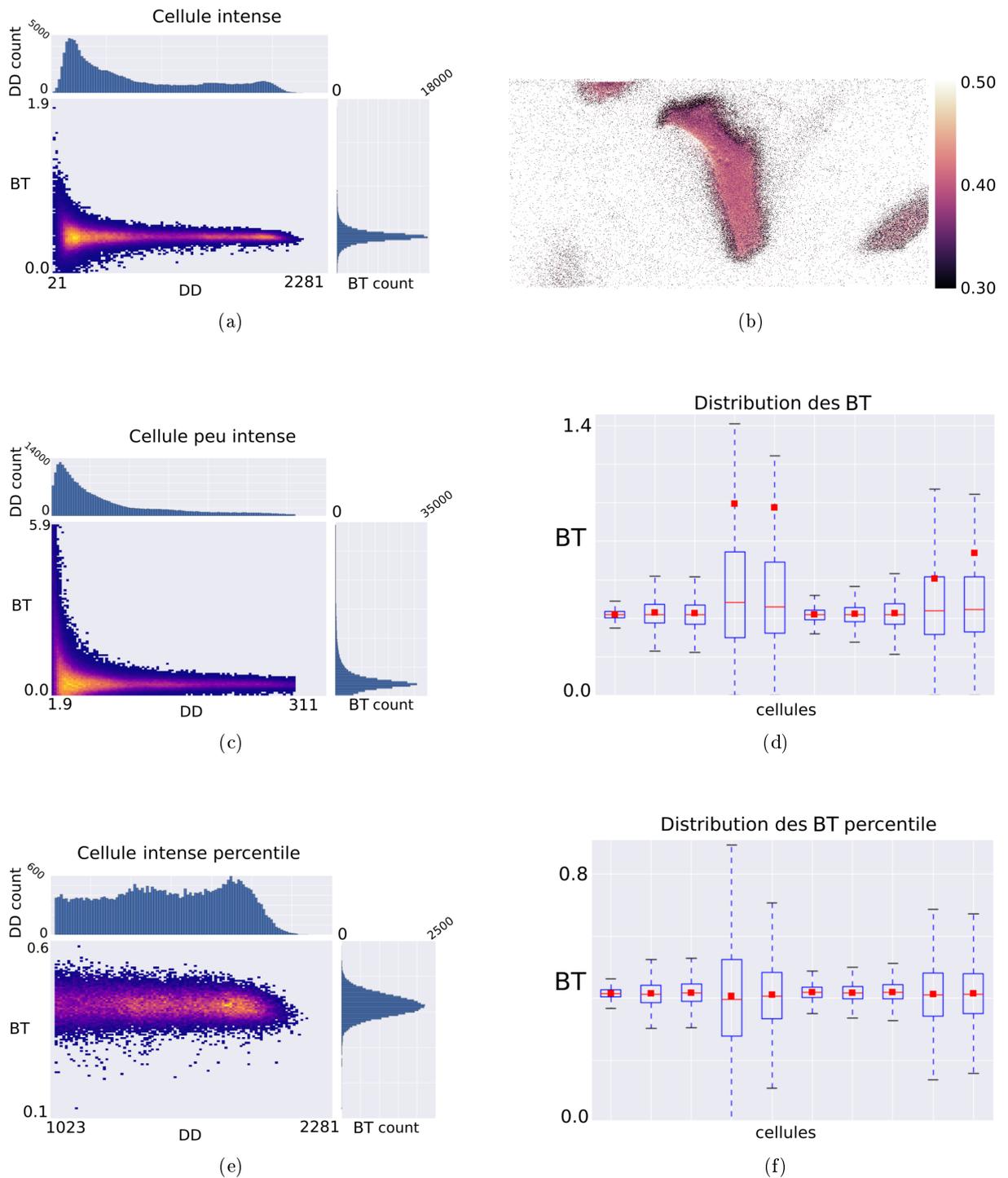


FIGURE 4.11 – (a) Histogramme 2D des valeurs de γ^{BT} et I_{DD} . Pour cette cellule très intense, la distribution des γ^{BT} est centrée autour d’une même valeur, même si elle s’élargit aux faibles intensités. (b) I_{BT} , la carte de γ^{BT} . (c) Histogramme 2D des valeurs de γ^{BT} et I_{DD} d’une cellule peu intense. (d) Pour chaque cellule est représentée la distribution des valeurs de γ^{BT} . (e) En éliminant les pixels de plus basse intensité (50^e ou 70^e percentile) la distribution des γ^{BT} est centrée autour d’une même valeur, même pour les cellules les moins intenses. (f) Distributions des γ^{BT} en rejetant pour chaque cellule les 70% des pixels de plus faible intensité.

Effet des paramètres d’acquisition sur les valeurs de γ^{BT} et γ^{DE}

Sur la figure 4.12 sont affichées les distributions des valeurs de γ^{BT} et γ^{DE} de chaque pixels d’une cellule HELA exprimant seulement le fluorophore donneur Cerulean ou seulement le fluorophore accepteur Venus. Nous pouvons vérifier que γ^{BT} ne varie pas avec le temps d’exposition de la caméra (a) ni la puissance du laser illuminant l’échantillon (b). γ^{DE} en revanche, par définition, dépend du ration de la

puissance du laser aux 2 longueurs d'ondes d'excitation. On observe toutefois qu'il ne dépend pas du temps d'exposition (c). Pour les 2 facteurs de correction, la dispersion des valeurs décroît lorsque l'intensité du signal augmente, soit avec un temps d'exposition plus grand, soit avec une puissance d'illumination plus importante.

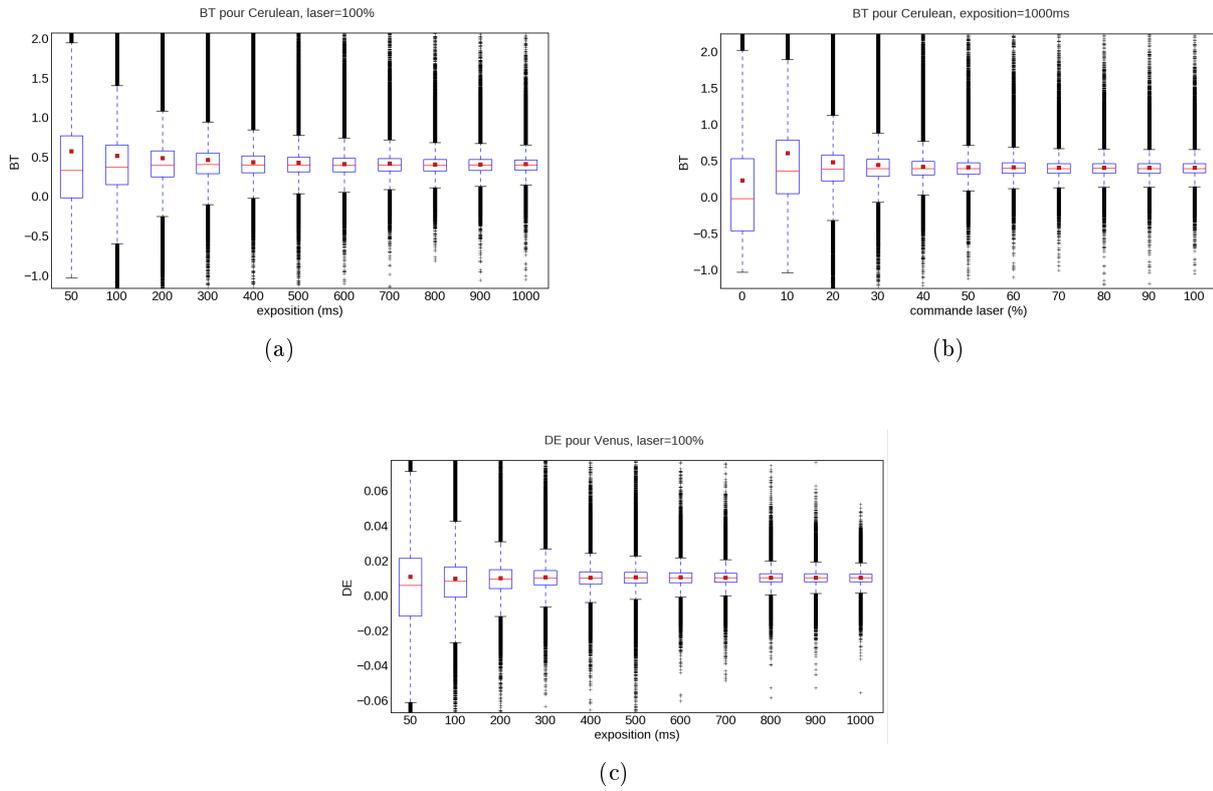


FIGURE 4.12 – Effet des paramètres d’acquisition sur les distributions de γ^{BT} et γ^{DE} . (a) Distributions de γ^{BT} en fonction du temps d’exposition. (b) Distributions de γ^{BT} en fonction de la commande de la puissance laser. (c) Distributions de γ^{DE} en fonction du temps d’exposition. Les points rouges sont les moyennes des distributions, les lignes rouges sont les médianes.

Effet du filtrage spatial sur la détermination de γ^{BT} et γ^{DE}

Afin de réduire le bruit des signaux mesurés, il est possible de filtrer spatialement les données. Lorsqu’on acquiert des signaux, ceux-ci sont rarement totalement décorrélés des points de mesure voisins, et dans notre cas la valeur d’un pixel est fortement corrélée aux valeurs des pixels voisins. Par ailleurs, le bruit de mesure est lui aléatoire et indépendant du bruit de mesure des points voisins. Donc pour éliminer la contribution du bruit de mesure aléatoire à la valeur d’un pixel, on peut calculer la moyenne de ce pixel et de ses voisins. Les contributions des signaux aléatoires se compensent statistiquement de manière plus efficace en augmentant la taille de la fenêtre de moyennage, la contrepartie étant la perte en résolution spatiale. De nombreux autres filtres peuvent être employés, tel que le filtre médian, ou encore le filtre gaussien. Ce type de filtre repose sur le produit de convolution d’une image avec un noyau (kernel) qui est une matrice beaucoup plus petite que l’image (figure 4.13a). Lors de la convolution, chaque pixel voit sa valeur multipliée par le coefficient au centre du noyau, et les valeurs des pixels voisins sont multipliées par les coefficients correspondants du noyau, les valeurs sont ensuite additionnées et divisées par la somme des coefficients du noyau. Le filtre de Savitzky-Golay [157] consiste pour chaque point à réaliser un ajustement de courbe avec les points voisins (figure 4.13c) dont l’ordre du polynôme et la taille de la fenêtre sont choisis par l’utilisateur. La valeur du point considéré est alors remplacée par la valeur à cette position de la courbe ajustée. Pour des points de mesure régulièrement espacés, le filtre est en fait implémenté sous la forme d’un produit de convolution des données avec un noyau dont les coefficients permettent de réaliser la minimisation des moindres carrés classiquement employée pour l’ajustement de courbe.

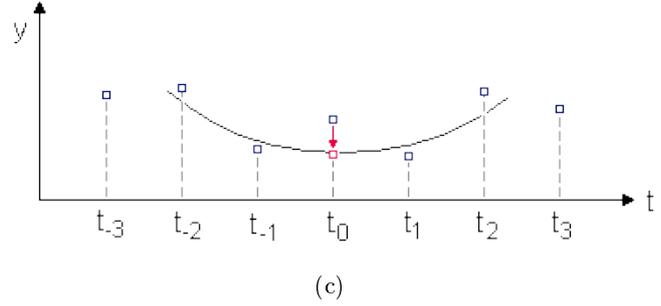
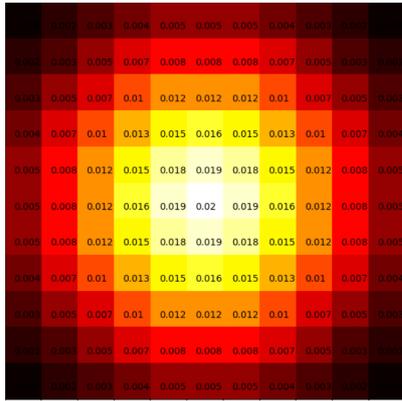
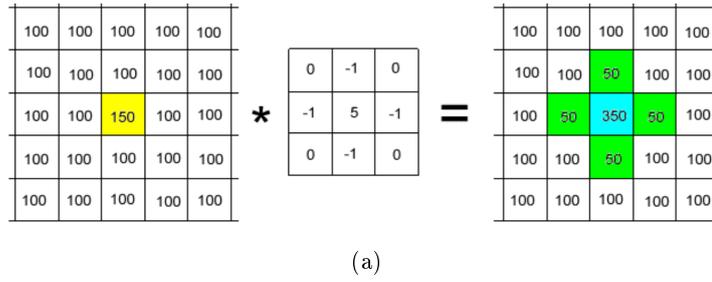
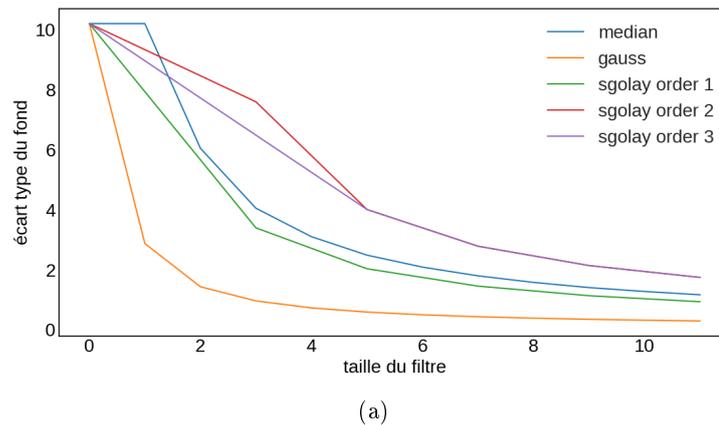


FIGURE 4.13 – Filtrage spatial par convolution avec un noyau et ajustement de polynôme. (a) Produit de convolution d’une image (matrice à gauche) par un noyau (matrice centrale). La nouvelle valeur du point central de l’image est calculée en centrant le noyau sur ce point, et en sommant les produits de chaque pixel voisin par le point du noyau correspondant (valeurs en vert et bleu). Ici la somme des coefficient vaut un, le noyau est déjà normalisé, d’après [158]. (b) Coefficients normalisés d’un noyau gaussien de taille 11×11 et de paramètre $\sigma = 3$, d’après [159]. (c) Illustration du filtre de Savitzky-Golay avec un polynôme d’ordre 2 et une fenêtre de taille 5, d’après [160].

Pour déterminer la méthode de filtrage la plus appropriée, nous pouvons observer l’évolution de l’écart-type des valeurs dans une zone de "fond" (figure 4.14a), c’est-à-dire où il n’y a pas de cellule produisant des fluorophores, puisque ces valeurs correspondent à du bruit que nous cherchons à éliminer. Parmi les méthode de filtre médian, de Savitzky-Golay avec des polynômes d’ordre 1, 2 et 3, et le filtre gaussien, c’est ce dernier qui réduit de manière la plus efficace la dispersion des valeurs du bruit mesuré. Dans la suite, lorsque nous filtrons les images, ce sera avec un filtre gaussien de taille $\sigma = 2$, cette taille étant un bon compromis entre réduction du bruit et conservation de la résolution. Nous pouvons observer que les distribution de γ^{BT} et γ^{DE} sont beaucoup plus resserrées lorsque les images sont filtrées avec un filtre gaussien de taille $\sigma = 2$ (figure 4.14 b-e).



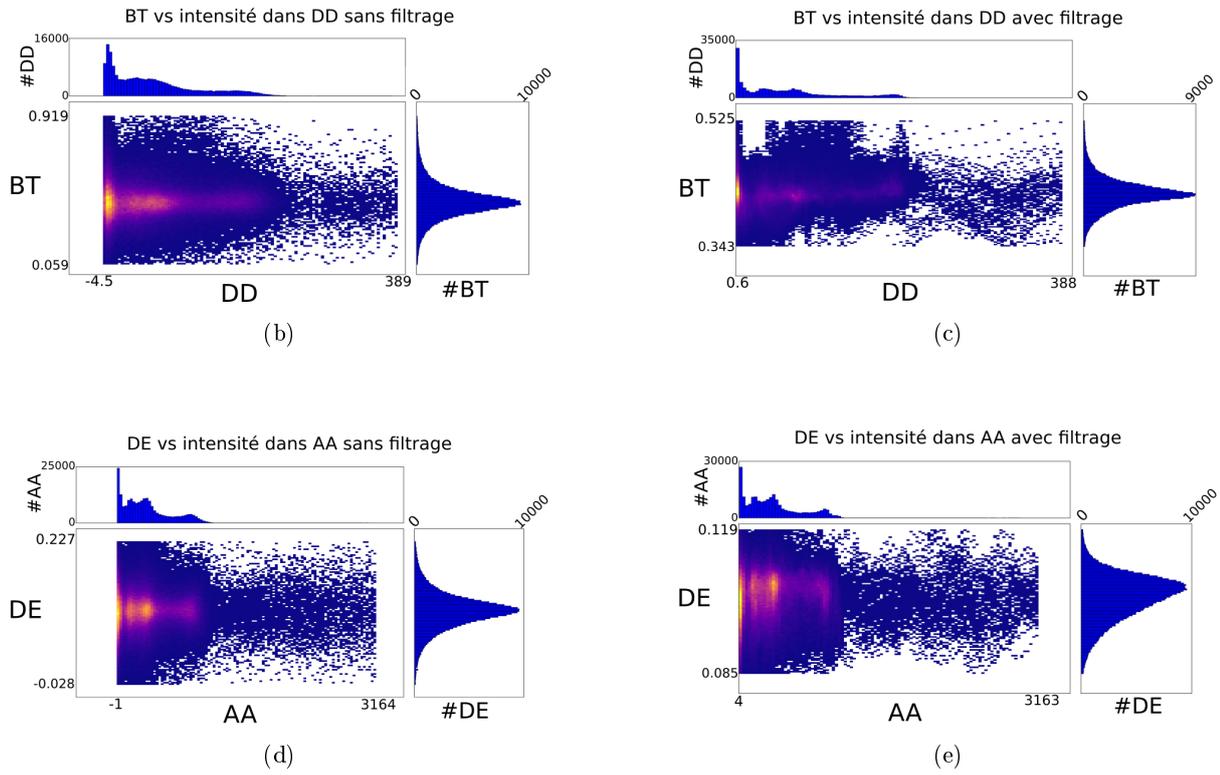


FIGURE 4.14 – Étude des filtres spatiaux et effets sur les valeurs de γ^{BT} et γ^{DE} . (a) Courbes de la variation de l'écart type des valeurs du fond avec la taille des filtres, pour différentes méthodes de filtrage spatial. Histogrammes 2D des valeurs de γ^{BT} et du canal I_{DD} pour un triplet d'images non filtrées (b) et filtrées avec un filtre gaussien (c). Histogrammes 2D des valeurs de γ^{DE} et du canal I_{AA} pour un triplet d'images non filtrées (d) et filtrées avec un filtre gaussien (e).

Détermination de γ^M et γ^X

Les facteurs de correction γ^M et γ^X sont moins triviaux à déterminer. En effet, avec les cellules produisant seulement des fluorophores donneurs ou seulement des accepteurs, nous avons assez d'équations pour déterminer γ^{BT} et γ^{DE} , mais il nous manque des équations supplémentaires pour déterminer γ^M et γ^X . La solution vient en mesurant des valeurs d'efficacité de FRET différentes et en reprenant l'équation (4.14) :

$$S = \frac{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}}{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD} + I_{AA}/\gamma^X} \Leftrightarrow \gamma^M \gamma^X I_{DD} + \gamma^X I_{DA}^{corr} = I_{AA} \frac{S}{1-S} \quad (4.15)$$

Nous reconnaissons ici une équation de plan sous la forme $ax + by = cz$ où x , y et z sont respectivement I_{DD} , I_{DA}^{corr} et I_{AA} , et dont on veut déterminer les coefficients a , b et c qui correspondent à $\gamma^M \gamma^X$, γ^X et $\frac{S}{1-S}$. Nous considérons ici que $S = 0.5$ puisque les cellules que nous observons par la suite expriment des protéines chimériques sur lesquelles sont toujours présents un fluorophore donneur et un accepteur. La stoechiométrie pourrait varier légèrement si des problèmes de maturation de protéines survenaient, mais cette variation n'impacterait que la valeur de γ^X calculée. Le plan *doit* passer par l'origine, puisque pour des conditions expérimentales données, ou plus exactement à stoechiométrie fixée, un plus faible signal dans un des canaux est la conséquence d'une plus faible quantité de fluorophores dans le volume d'observation, d'une puissance d'excitation plus faible ou d'un temps d'exposition plus court, ce qui influe dans les mêmes proportions le signal des 2 autres canaux. On peut visualiser les points de mesure que sont les pixels des triplets d'images ALEX $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ dans un espace à 3 dimensions, où chaque dimension représente l'intensité dans un des 3 canaux (figure 4.15). Alors un point de mesure définit avec l'origine une droite, et une infinité de plans passent par cette droite. Nous ne pouvons donc pas calculer les coefficients du plan : le système est dit sous-déterminé. En revanche, 2 points distincts suffisent avec l'origine pour définir un plan unique, nous pouvons alors calculer les coefficients du plan : le système est déterminé. Cependant, nous n'avons jamais 2 points, mais des millions, et comme ces données proviennent

de mesures, sujettes à des erreurs et du bruit, ces points ne peuvent pas définir ensemble un plan unique, ils sont en fait répartis autour d'un plan dont nous souhaitons déterminer les coefficients.

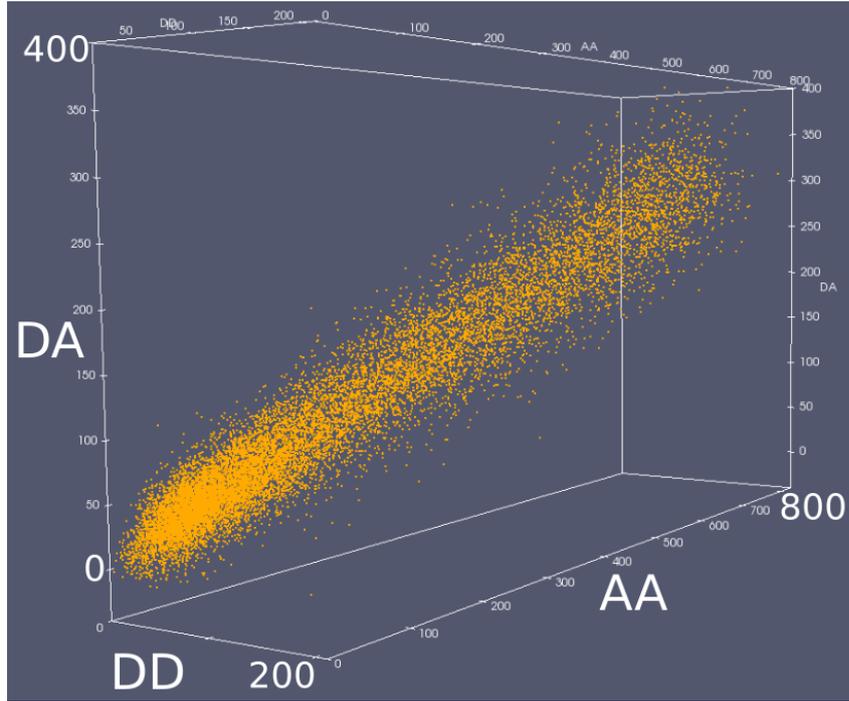


FIGURE 4.15 – Représentation 3D des valeurs d'intensité d'une cellule. Chaque point est un pixel dont les coordonnées correspondent aux valeurs d'intensité dans les canaux I_{DD} , I_{DA} et I_{AA} .

Avant de résoudre ce problème il convient d'introduire les notations usuelles. Notre problème s'écrit sous la forme

$$\mathbf{X}\boldsymbol{\beta} = \mathbf{y}$$

où \mathbf{X} est la matrice contenant les données de départ du problème, dans notre cas si nous avons N points dans chaque canal :

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} I_{DD} & I_{DA}^{corr} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_{DD}^1 & I_{DA}^{corr1} \\ I_{DD}^2 & I_{DA}^{corr2} \\ \vdots & \vdots \\ I_{DD}^N & I_{DA}^{corrN} \end{bmatrix}$$

$\boldsymbol{\beta}$ est le vecteur contenant les paramètres recherchés, pour nous :

$$\boldsymbol{\beta} = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \gamma^M \gamma^X \\ \gamma^X \end{bmatrix}$$

et \mathbf{y} est le vecteur contenant les données cibles, à savoir :

$$\mathbf{y} = \begin{bmatrix} I_{AA} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_{AA}^1 \\ I_{AA}^2 \\ \vdots \\ I_{AA}^N \end{bmatrix}$$

Une méthode pour déterminer ces coefficients β_1 et β_2 est la *descente de gradient*. Cette technique repose sur une fonction de coût que nous définissons et qui nous permet d'évaluer le choix des valeurs de paramètres que nous testons. La méthode des moindres carrés consiste à définir la fonction de coût comme la somme Ω des carrés des résidus, c'est-à-dire des écarts entre les données estimées et les données

réelles :

$$\Omega = \sum_{i=1}^N (I_{AA}^i - (\gamma^M \gamma^X I_{DD}^i + \gamma^X I_{DA}^{corr\ i}))^2 \quad (4.16)$$

$$\Leftrightarrow \Omega(\beta) = \|\mathbf{y} - \mathbf{X}\beta\|^2 \quad (4.17)$$

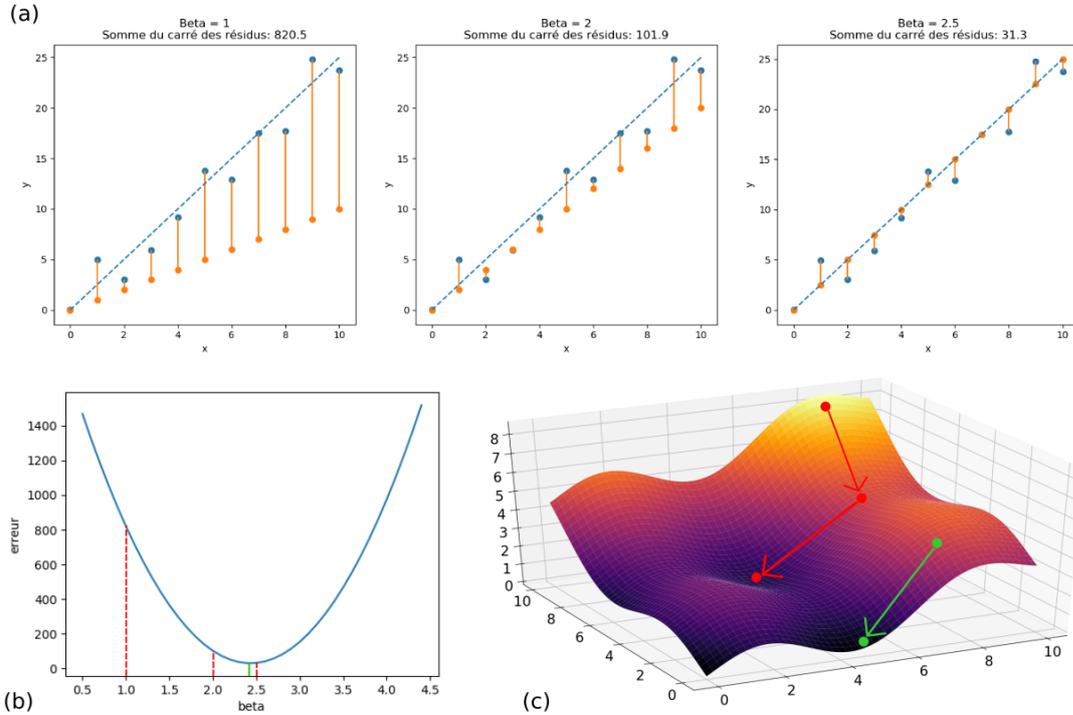


FIGURE 4.16 – Illustration de la descente de gradient pour trouver β_1 , le coefficient directeur de droite autour de laquelle sont répartis des points de mesure. (a) : Ici la vraie valeur du coefficient est 2.5, mais on commence la descente de gradient en estimant $\beta_1 = 1$. Les résidus sont les écarts (traits verticaux) entre le modèle estimé et les points de mesure. La fonction de coût est calculée comme la somme des carrés des résidus (b). Lorsque β_1 augmente, la fonction de coût diminue, jusqu'à atteindre théoriquement son minimum en $\beta_1 = 2.5$. Ici le minimum vaut en réalité 2.4 (trait vert) à cause de la variation statistique du bruit des données. Cette approche est valable pour un nombre arbitraire de dimension, la figure (c) représente une descente de gradient à 2 dimension, où la fonction de coût varie de manière non monotone avec les paramètres estimés et forme une surface dont la hauteur est le coût pour le couple de paramètres (β_1, β_2) .

Il nous faut choisir une valeur de départ pour chaque paramètre et évaluer le coût que ce choix induit. En variant chaque paramètre légèrement, ce coût va diminuer ou augmenter, définissant ainsi un paysage dont le relief, qui représente le coût, varie lorsqu'on se déplace en variant les valeurs. On choisit alors des valeurs pour chaque paramètre qui nous permettent de diminuer le plus le coût. Dans l'image du paysage, cela revient à descendre la pente la plus importante. La variation d'un paramètre $\Delta\beta_i$ est proportionnelle au gradient de la fonction de coût : $\Delta\beta_i = \alpha \frac{\delta\Omega(\beta)}{\delta\beta_i}$, où α est le *pas* qu'on détermine à l'avance. On calcule toutes les variations, *puis* on les applique aux paramètres. On réitère l'opération jusqu'à ce que le gain de coût soit inférieur à un seuil décidé au préalable, c'est-à-dire lorsqu'on s'est approché suffisamment du minimum local et que nous ne gagnons plus assez en coût en variant les paramètres. Le minimum local peut être un minimum global comme c'est notre cas, puisque notre système est linéaire, mais ce n'est pas toujours le cas et cela peut poser problème. Des solutions comme celles du recuit simulé sont alors possibles mais dépassent le cadre de cette thèse. La descente de gradient est un bon outil lorsque le nombre de dimensions de l'espace de coût - le nombre de valeurs que l'on cherche - est important. Cependant son efficacité dépend des paramètres employés, comme la définition de la fonction de coût, les valeurs

de départ, le pas α entre valeurs successives, et la valeur de condition d'arrêt. Cette méthode demande donc une certaine expertise ou habitude d'utilisation, et a donné des résultats insatisfaisants pour la détermination de γ^M et γ^X . Pour ces raisons nous lui avons préféré une méthode non paramétrique : la *résolution des équations normales*.

Lorsque nous cherchons à minimiser la somme des carrés des résidus, un estimateur des paramètres recherchés peut être obtenu en résolvant les équations normales :

$$\hat{\beta} = (\mathbf{X}^\top \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^\top \mathbf{y} \quad (4.18)$$

où $(\mathbf{X}^\top \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^\top$ est la pseudo-inverse de Moore-Penrose de la matrice \mathbf{X} . Cette pseudo-inverse peut être vue comme une généralisation des inverses de matrices à celles qui ne sont pas carrées. Cet estimateur des moindres carrés est le meilleur estimateur linéaire non biaisé si les erreurs de mesure ne sont pas corrélées, si leurs variances sont égales et si leur espérance est nulle. Si les erreurs suivent de plus une loi normale, alors cet estimateur est identique à celui de la méthode du maximum de vraisemblance. Cette méthode permet de nous passer du choix des paramètres de la descente de gradient et nous assure un résultat déterministe. Elle peut cependant être lourde en terme de calculs informatiques, mais c'est le nombre de dimensions du problème qui impacte le plus la puissance de calcul requise. Ici il n'y a que 2 dimensions, correspondant aux 2 paramètres recherchés $\gamma^M \gamma^X$ et γ^X , le temps calcul est de ce fait imperceptible.

4.5 Test de notre méthode

4.5.1 Les standards FRET

Le FLIM est la méthode de référence pour obtenir des mesures de l'efficacité de FRET quantitatives. Cependant l'instrumentation coûteuse, les temps d'acquisition longs et l'expertise nécessaire à l'analyse des données ont favorisé le développement de nombreuses techniques d'acquisition alternatives et une multitude d'indices pour évaluer le FRET. La précision de ces méthodes et leur capacité à fournir des données quantitative était inconnues ou difficile à obtenir. L'analyse des méthodes se restreignait souvent à la comparaison qualitative entre des paires de fluorophores séparés par des brins complémentaires d'ADN de longueurs différentes, donc d'efficacité de FRET différentes; ou à comparer l'efficacité de FRET mesurée avec la valeur théorique de la distance entre fluorophores obtenue avec différents modèles de polymères en solution. Cette incertitude sur la précision des techniques et des indices rendait difficile l'interprétation et la comparaison de mesures d'efficacité de FRET. Pour palier à ce problème, THALER *et al.* [141] et Koushik *et al.* [161] développèrent des standards dont l'efficacité de FRET peut être comparée entre différentes techniques et laboratoires (figure 4.17). Ces standards consistent en une paire de fluorophores donneur et accepteur (Cerulean et Venus respectivement) séparés par une séquence d'acides aminés de longueur variable (figure 4.17-a). Les 3 standards C5V, C17V et C32V contiennent 5, 17 et 32 acides aminés séparant Cerulean et Venus. Une plus grande chaîne d'acides aminés implique une plus grande distance entre fluorophores, donc une efficacité de FRET plus faible. L'efficacité de FRET de ces 3 espèces a alors été mesurée selon 3 méthodes : le FLIM, le FRET spectral sRET [141] et la méthode à 3 cubes E-FRET [139] (figure 4.17-b).

Pour chaque standard, les 3 méthodes produisent des moyennes d'efficacité de FRET différentes, mais une analyse statistique plus approfondie montre que les valeurs sont statistiquement indistinguables, c'est-à-dire que les 3 méthodes produisent la même estimation d'efficacité de FRET pour un même standard. Comme les 3 méthodes produisent des résultats similaires, la *vraie* valeur d'efficacité de FRET de chaque standard est considérée comme la moyenne des efficacités obtenues avec ces 3 méthodes (figure 4.17-c). Par ailleurs, pour chaque méthode, les 3 constructions produisent des estimations significativement distinguables. Les 3 méthodes permettent de détecter une variation de 5% d'efficacité de FRET (entre C5V et C17V), ce qui équivaut à un changement de 0,2 nm si on considère une orientation moyenne des fluorophores telle que $\kappa^2 = 3/2$.

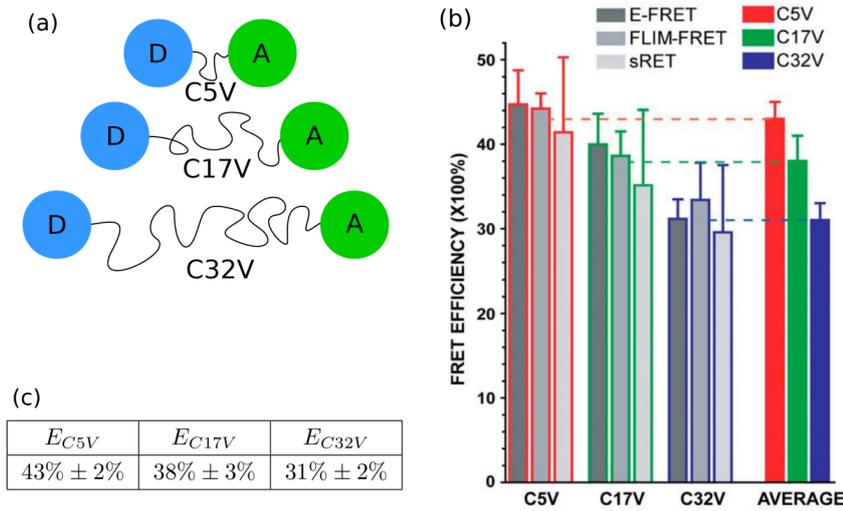


FIGURE 4.17 – (a) : Le donneur (D) et l’accepteur (A) sont séparés par 5, 17 et 32 acides aminés pour C5V, C17V et C32V respectivement, augmentant la distance entre fluorophores et donc diminuant l’efficacité de FRET. (b) : Moyenne des efficacités de FRET pour chaque construction avec les 3 méthodes. (c) : Valeurs finales des efficacités de FRET calculées pour chaque espèce de standard avec la moyenne des trois méthodes.

4.5.2 Résultats obtenus avec notre méthode

Détermination de γ^M et γ^X et mesures de E et S

Pour évaluer notre montage expérimental et notre méthode d’analyse, nous avons observé des cellules exprimant les standards FRET C5V, C17V et C32V, et analysé les images obtenues. Les références des plasmides, le protocole d’amplification d’ADN et de transfection des cellules sont détaillés en annexe A.1. L’analyse des images comprenait les diverses corrections d’imagerie (page 73) ainsi que les corrections pour le débordement de spectre et l’excitation directe. La question était alors de savoir si nous pouvions déterminer les valeurs de γ^M et γ^X de notre système, et si ces valeurs nous permettaient de retrouver des efficacités de FRET des standards comparables à celles mesurées dans la publication originale.

La détermination de γ^M et γ^X est donc réalisée avec l’ensemble des cellules observées qui expriment un standard FRET par expérience. Les valeurs des 3 canaux des différentes cellules sont agrégées en un nuage de points 3D unique dont on trouve l’équation pour déterminer γ^M et γ^X (page 82). Il est impossible de juger de la qualité de la détermination de γ^M et γ^X simplement en observant les valeurs numériques obtenues $\gamma^M = 2.11$ et $\gamma^X = 1.18$, puisqu’il est normal que ces valeurs varient entre montages expérimentaux. On peut cependant générer des valeurs de I_{AA} à partir des valeurs mesurées de I_{DD} et I_{DA} et des coefficients γ^M et γ^X nouvellement calculés (figures 4.18-a,b,c). On peut alors juger qualitativement de la justesse de l’estimation de γ^M et γ^X en vérifiant que le nuage de points généré forme bien un plan qui coupe le nuage de points de mesure dans son plan frontal. Sur ces 3 figures, les points bleus, oranges et rouges correspondent aux standards C32V, C17V et C5V respectivement. Les points blancs sont les données simulées, qui forment bien un plan coupant le nuage de points de mesure dans son plan frontal. En revanche, si les valeurs de γ^M et γ^X ont été mal estimées, le plan formé "pivoté" par rapport au nuage de points de mesure. Pour illustrer ce propos, sur la figure 4.18-d les points blancs sont générés avec γ^M et γ^X correctement évalués selon notre méthode. D’autres points sont générés en variant artificiellement γ^M et γ^X . Les points jaunes et verts correspondent à $\gamma^M \times 1.1$ et $\gamma^M / 1.1$ respectivement, les points rouges et bleus correspondent à $\gamma^X \times 1.1$ et $\gamma^X / 1.1$ respectivement. Ces 4 nuages artificiels forment des plans qui ne coupent pas le plan de points de mesure de manière satisfaisante.

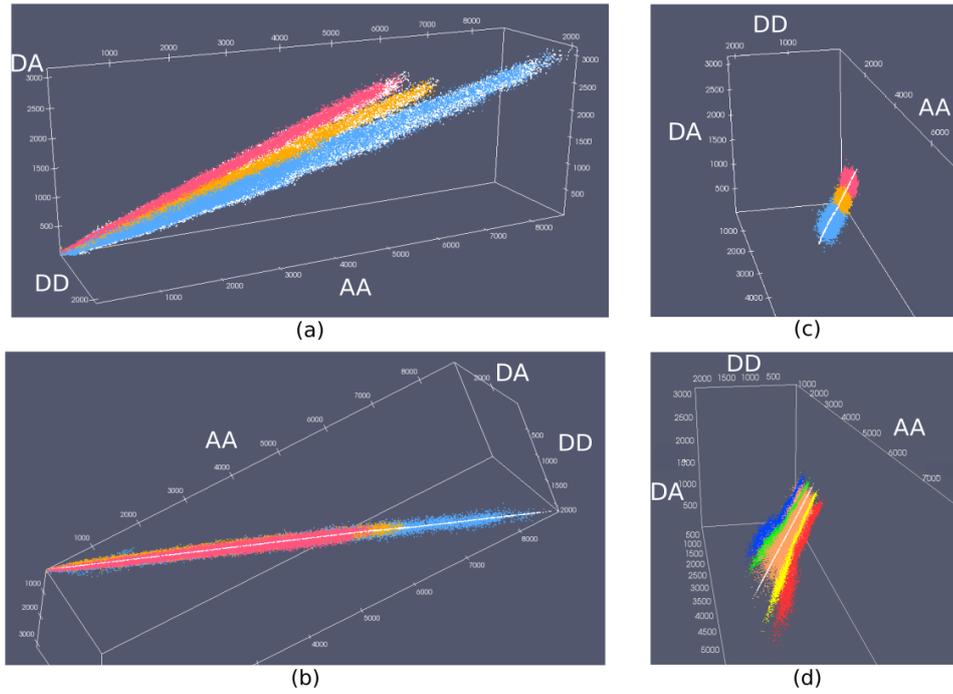


FIGURE 4.18 – Vues frontale (a), sagittale (b) et transversale (c) du nuage de points de mesure et des points générés à partir des valeurs de γ^M et γ^X . (d) Nuages de points obtenus en variant les valeurs de γ^M et γ^X .

Avec les valeurs de γ^M et γ^X nous pouvons maintenant calculer les efficacités de FRET des cellules exprimant les différents standards FRET. Nous obtenons des cartes d'efficacité de FRET E (figures 4.19 a, b et c) et de stœchiométrie S (figures 4.19 d, e et f) dont on peut visualiser simultanément les valeurs sur un histogramme de E/S à 2 dimensions (figures 4.19 g, h et i). Les valeurs retenues pour tracer les histogrammes sont celles des pixels qui se trouvent dans les masques des cellules définis manuellement, afin de ne pas comptabiliser des valeurs de E ou S calculées dans des zones sans cellule. On définit par ailleurs des bornes minimales et maximales pour les valeurs de E et S en dehors desquelles les valeurs ne sont pas comptabilisées car on les considère comme aberrantes. Généralement on choisit pour E la valeur maximale limite 95% car à cause du tonneau de feuillet β des protéines fluorescentes, les cœurs fluorescents des fluorophores donneurs et accepteurs ne peuvent pas se rapprocher assez pour atteindre ces efficacités de FRET. Les bornes minimale et maximale de E et S peuvent être encore réduites selon les besoins, pour éliminer les zones où l'autofluorescence est assez importante pour dévier la stœchiométrie de manière significative par exemple. On peut aussi tracer pour chaque cellule l'histogramme 2D de E en fonction I_{AA} pour vérifier que l'efficacité ne dépend pas de l'intensité du signal mesuré (figures 4.19 j, k et l). Pour chaque cellule, la distribution des valeurs de E est similaire à une gaussienne, donc on peut définir une valeur d'efficacité de FRET unique pour chaque cellule E_{cell} en considérant la médiane de toutes ses valeurs de E . Nous calculons enfin la valeur finale de l'efficacité de FRET d'un standard E_{std} en déterminant la moyenne des valeurs de E_{cell} de chaque cellule exprimant ce standard. Nous choisissons la moyenne plutôt que la médiane car nous observons pour chaque standard entre 23 et 30 cellules, ce qui est trop peu pour que la médiane soit un indicateur plus robuste que la moyenne. Nous obtenons alors les valeurs d'efficacité de FRET $51.6\% \pm 0.8\%$ (sem), $43.8\% \pm 0.8\%$ et $37.1\% \pm 0.8\%$ pour les standards C5V, C17V et C32V respectivement. Pour déterminer si ces valeurs sont significativement différentes, nous ne pouvons pas réaliser de test de Student puisqu'il repose sur l'hypothèse que les valeurs suivent une loi normale, ce qui est faux : au sein de chaque cellule la distribution des valeurs de E est proche d'une loi normale (figure 4.21a), mais les valeurs moyennes de E_{cell} diffèrent entre cellules exprimant un même standard, rendant la distribution de l'ensemble des valeurs des cellules très peu conforme à la loi normale (figure 4.21b). Nous utilisons alors le test de Wilcoxon-Mann-Whitney, qui nous permet de déterminer si 2 échantillons non normaux suivent une même distribution. L'hypothèse nulle selon laquelle

les distributions des valeurs de E de chaque standard sont similaires est rejetée pour chaque couple de standard (C5V-C17V, C5V-C32V et C17V-C32V). Nous parvenons donc bien à différencier les espèces de standards FRET entre elles, ce qui signifie que notre méthode nous permet de détecter une variation de 6.7% d'efficacité de FRET (entre C5V et C17V).

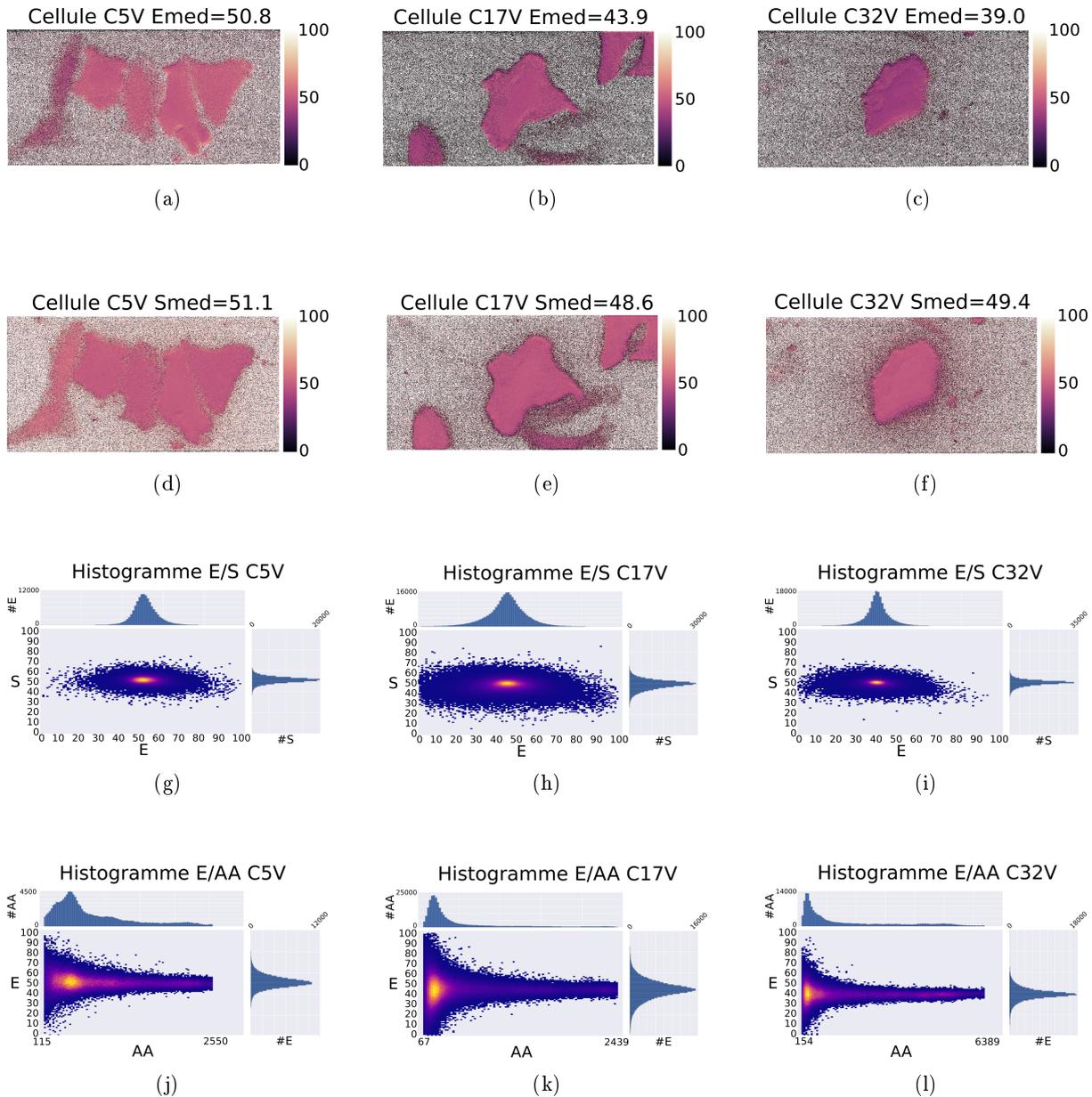


FIGURE 4.19 – 1^{ère} ligne : cartes des efficacités de FRET des cellules exprimant C5V (a), C17V (b) et C32V (c). 2^e ligne : cartes des stœchiométries des cellules C5V (d), C17V (e) et C32V (f). 3^e ligne : histogrammes 2D E/S des cellules C5V (g), C17V (h) et C32V (i). 4^e ligne : histogrammes 2D des E/I_{AA} des cellules C5V (j), C17V (k) et C32V (l).

Effet du standard CTV sur γ^M , γ^X et les mesures de E et S

Nous déterminons γ^M et γ^X en calculant les coefficients du plan que forment les points de mesure correspondant à des efficacités de FRET différentes. Comme ces mesures sont bruitées, une plus grande différence dans les efficacités de FRET permet de déterminer les coefficients du plan avec une plus grande précision. Nous avons donc utilisé CTV, un standard FRET développé par THALER *et al.* [141] qui contient la paire de fluorophores Cerulean - Venus espacés par le domaine *tumor necrosis factor receptor associated factor* (TRAF) de la protéine humaine TRAF2. Ce domaine forme une longue chaîne de 229 acides aminés qui impose une distance d'au moins 80 Å entre le donneur et l'accepteur. Dans la publication

originale, l'efficacité de FRET mesurée pour ce standard est estimée à $E_{CTV} = 6.3\% \pm 2.6\%$, ce qui est bien plus bas que l'efficacité de FRET de C32V estimée à $E_{C32V} = 43\% \pm 2\%$ par Koushik *et al.* [161].

En prenant en compte les cellules exprimant les standards CTV, nous observons une importante variation de γ^M , γ^X et des efficacités de FRET des standards (tableau 4.1). Nous nous attendions à une variation infime des valeurs de γ^M et γ^X , puisque les nuages des points de mesure des standards E_{C5V} , E_{C17V} et E_{C32V} dans l'espace $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ appartenaient bien au même plan, et que nous supposions qu'il en serait de même pour les points de E_{CTV} .

Condition	γ^M	γ^X	E_{C5V}	E_{C17V}	E_{C32V}	E_{CTV}
sans CTV	2.11	1.18	49.3	43.1	34.0	4.95
avec CTV	1.72	1.30	54.4	48.2	38.7	6.0

TABLE 4.1 – Écarts de résultats entre les 2 conditions avec/sans CTV.

Des valeurs différentes de γ^M et γ^X impliquent un plan différent coupant les nuages de points représentés. En effet, sur la figure 4.20 on peut observer comment le nuage de points de CTV (en vert) sort du plan formé par les standards C5V (rouge), C17V (orange) et C32V (bleu). Naturellement, le plan qui coupe au mieux tous les nuages de points diffère de celui qui ignore CTV, ce qui résulte en des valeurs de γ^M et γ^X différentes.

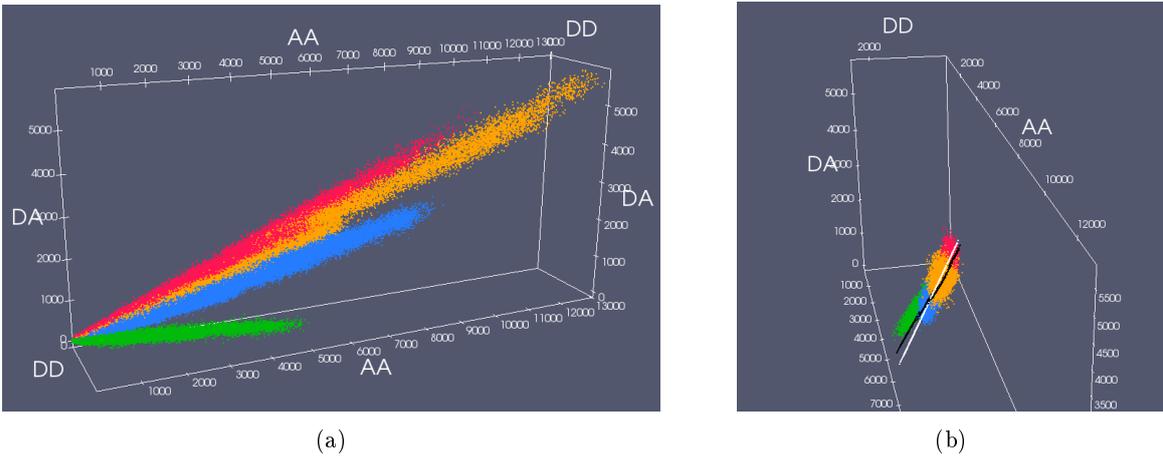


FIGURE 4.20 – Nuages de points de mesures avec CTV. (a) : Vue frontale des points de C5V (rouge), C17V (orange), C32V (bleu) et CTV (vert). (b) : Vue sagittale du plan généré en incluant CTV (noir) qui diffère du plan généré en ignorant CTV (blanc).

Nous ne connaissons pas l'origine de cette différence d'appartenance de plans. Une simple variation d'efficacité de FRET ferait bouger le nuage de CTV sur le même plan que celui des autres standards. Un plan différent pour un même montage expérimental suppose une stœchiométrie apparente différente de 50%. Ceci pourrait-être dû au domaine TRAF qui changerait les spectres d'absorption ou d'émission des fluorophores, résultant en une stœchiométrie apparente plus faible dans notre cas. Une autre possibilité est le fait que TRAF est une longue séquence à exprimer, résultant en un long domaine à maturer, qui peut provoquer plus d'échec sur la maturation de Venus. Cette question reste ouverte, mais pour la suite de cette thèse nous ne considérons plus l'utilisation du standard CTV.

Comparaison avec une autre méthode de détermination de γ^M et γ^X

Les valeurs finales de E pour chaque standard sont bien au dessus de celles mesurées par Koushik *et al.* [161], nos valeurs sont de 8.6, 5.8 et 6.1 points au dessus des efficacités de FRET rapportées par ces derniers pour C5V, C17V et C32V respectivement. Nous avons obtenus des résultats similaires avec des cellules HEK293 quelques mois avant ces dernières mesures, il est donc peu probable que ces écarts viennent d'une erreur expérimentale. Pour étudier les causes possibles de ces différences observées, nous ne disposons pas des données de leur publication. Pour situer notre méthode d'analyse par rapport à l'état de l'art, nous pouvons toutefois comparer les résultats obtenus avec d'autres méthodes mais sur des données identiques (les nôtres).

CHEN *et al.* [153] proposèrent de calculer γ^M et γ^X d'après deux mesures d'échantillons d'efficacités de FRET très différentes. Cette méthode est en fait strictement équivalente mathématiquement à la nôtre (détails en annexe B.2), excepté que nous n'utilisons pas 6 points de mesure (3 canaux par échantillon) mais des milliers qui correspondent aux valeurs des pixels de nos images dans les 3 canaux. Pour appliquer cette méthode, nous devrions moyenner pour chaque espèce de standard FRET les valeurs de l'ensemble des pixels d'un canal donné. C'est-à-dire qu'en observant les cellules exprimant C5V ou C32V, nous devrions réduire l'information à 6 valeurs : I_{DD}^{C5V} , I_{DA}^{C5V} , I_{AA}^{C5V} , I_{DD}^{C32V} , I_{DA}^{C32V} et I_{AA}^{C32V} . Comme cette méthode est conceptuellement proche de la nôtre, et que nous ne souhaitons pas calculer nos coefficients au prix d'une perte d'information, nous comparons notre méthode à une autre méthode de détermination de γ^M et γ^X .

Cette méthode, proposée par LEE *et al.* [147], consiste à tracer les valeurs de $1/S$ en fonction E (figure 4.22a), réaliser un ajustement de droite, et déterminer le coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine qui nous permettent ensuite de calculer γ^M et γ^X en résolvant un système d'équation. Nous avons montré que cette méthode est elle aussi mathématiquement équivalente à la nôtre, les détails sont donnés en annexe B.2. Nous implémentons donc cette méthode et calculons γ^M et γ^X avec le même jeu de données utilisé pour notre méthode. Les valeurs d'efficacité de FRET sont alors $49.0\% \pm 0.3\%$, $41.1\% \pm 0.8\%$ et $34.7\% \pm 0.8\%$ pour les standards C5V, C17V et C32V respectivement. Pour savoir si pour chaque standard les valeurs sont significativement différentes entre les 2 méthodes, nous employons le test des rangs signés de Wilcoxon qui nous permet de déterminer si 2 échantillons non normaux et dépendants suivent une même distribution. Pour cela les valeurs de chaque échantillon sont ordonnées, et on calcule la différence entre chaque valeur d'un groupe et la valeur du même rang de l'autre groupe. Dans notre cas, l'hypothèse nulle selon laquelle la distribution des différences entre les 2 méthodes est symétrique et centrée autour de zéro est rejetée pour chaque standard, ce qui signifie que les 2 méthodes donnent des résultats significativement différents. Si on s'attendait à priori à obtenir des distributions indiscernables avec 2 méthodes qui se veulent quantitatives, il est en fait tout à fait normal dans notre cas que les résultats soient significativement différents. En effet, nous ne réalisons pas différentes mesures des standards suivies de différentes méthodes d'analyse, mais nous réalisons un seul type de mesure, dont les données vont être traitées selon des équations et des fonctions informatiques identiques, à la seule différence près de 2 facteurs (γ^M et γ^X) dont les valeurs diffèrent légèrement entre les 2 méthodes de détermination. En définitive, la question n'est pas de savoir si les distributions sont différentes, mais si les différences sont importantes et si oui, pourquoi. Les écarts d'efficacité de FRET moyenne entre les 2 méthodes (figure 4.22b) sont quasiment constants : 2.6 2.7 et 2.4 points pour C5V, C17V et C32V respectivement, et les écarts entre standards sont aussi similaires entre les méthodes :

$$E_{C5V}^{Coulomb} - E_{C17V}^{Coulomb} = 7.8 \text{ et } E_{C5V}^{Lee} - E_{C17V}^{Lee} = 7.9$$

$$E_{C17V}^{Coulomb} - E_{C32V}^{Coulomb} = 6.7 \text{ et } E_{C17V}^{Lee} - E_{C32V}^{Lee} = 6.8$$

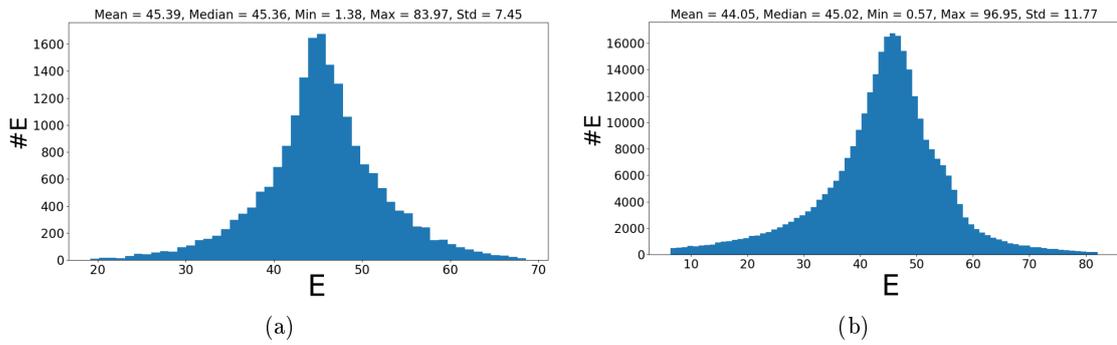


FIGURE 4.21 – (a) : Histogramme de E pour une cellule exprimant C17V, la distribution des valeurs semble suivre une loi normale, elle est en tout cas symétrique. (b) : Histogramme de E pour l'ensemble des cellules exprimant C17V, la distribution des valeurs n'est pas symétrique, elle ne suit pas une loi normale.

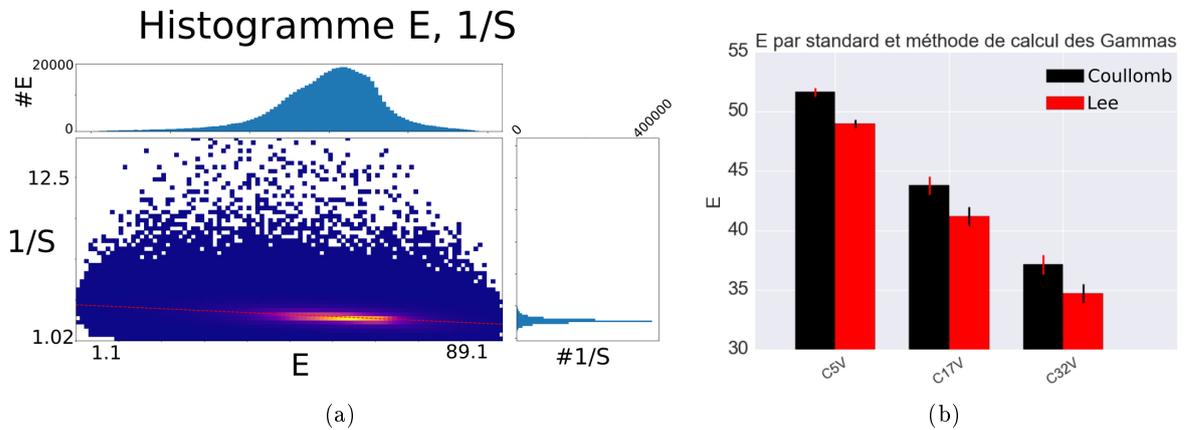
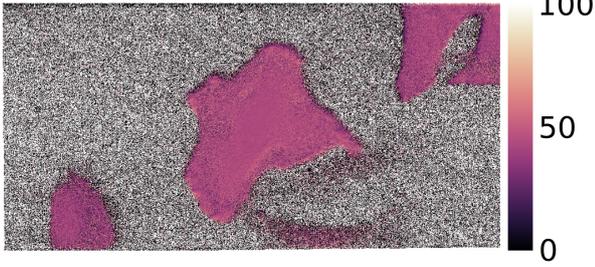


FIGURE 4.22 – Comparaison de 2 méthodes de détermination de γ^M et γ^X . (a) : L'histogramme 2D de $1/S$ et E utilisé dans la méthode de LEE. Le coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine de la courbe ajustée (ligne rouge) permettent de calculer γ^M et γ^X . (b) : Valeurs finales des efficacités de FRET de chaque standard calculées avec γ^M et γ^X estimés selon les méthodes de COULLOMB et de LEE. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type de la moyenne (sem pour standard error of the mean).

Effet du filtrage spatial ou sur les valeurs d'intensité avec les 2 méthodes

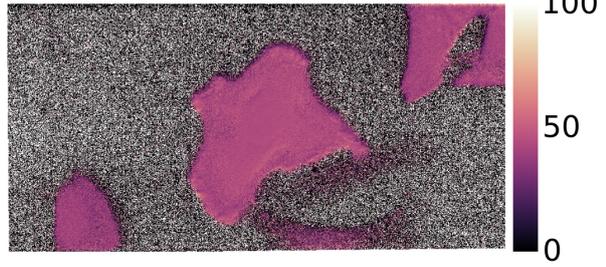
Comme lors la détermination de γ_{BT} et γ_{DE} , nous pouvons traiter les signaux mesurés en appliquant des filtres spatiaux tels que le filtre gaussien afin de diminuer de manière notable le bruit. On peut observer sur la figure 4.23 les effets du filtrage spatial sur les résultats : les cartes de E et S sont plus lisibles car il y a moins de variabilités entre pixels voisins, les distributions sur les histogrammes 2D E/S sont plus resserrées, comme les distributions de E/I_{AA} . Enfin, pour chaque standard l'écart entre les résultats des méthodes COULLOMB et LEE est réduit pour les valeur de E et S . Plus précisément, après le filtrage spatial, les valeurs de E et S varient très faiblement pour la méthode COULLOMB, et la réduction des écarts entre les 2 méthodes est majoritairement due à la plus grande variation des valeurs de E et S pour la méthode LEE (tableau 4.2). Ceci est causé par la variation de γ^M après filtrage plus importante avec la méthode LEE qu'avec la méthode COULLOMB, tandis que γ^X varie très peu pour les 2 méthodes.

Cellule C17V Emed=43.9



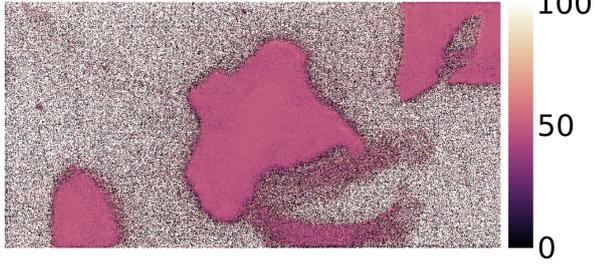
(a)

Cellule C17V E gauss



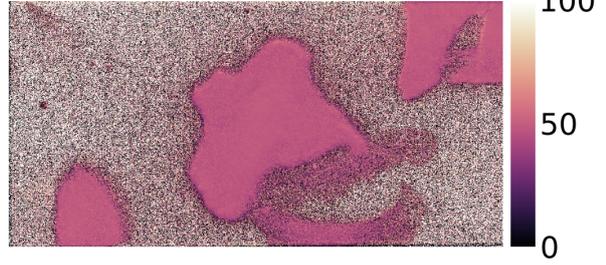
(b)

Cellule C17V Smed=48.6



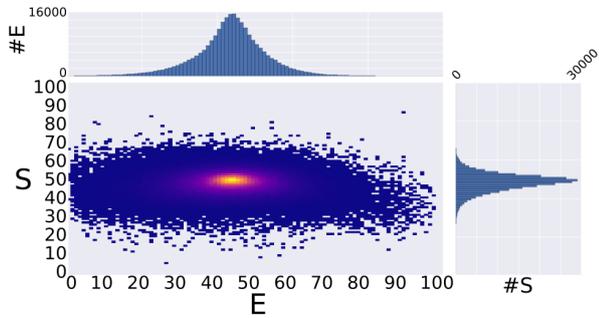
(c)

Cellule C17V S gauss



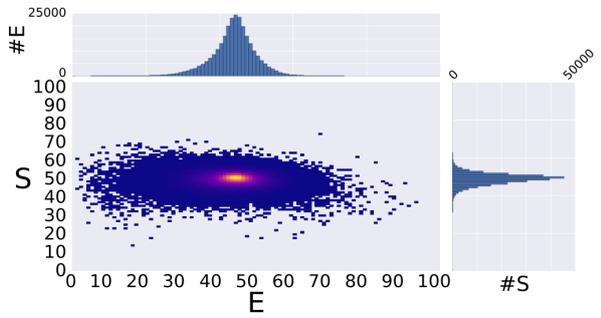
(d)

Histogramme E/S C17V



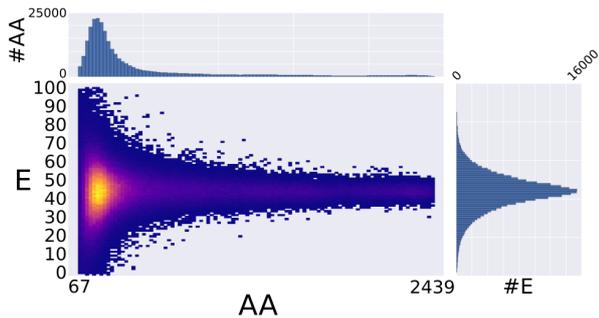
(e)

Histogramme E/S C17V gauss



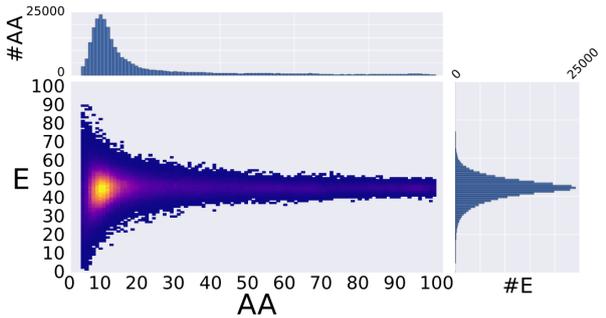
(f)

Histogramme E/AA C17V



(g)

Histogramme E/AA C17V gauss



(h)

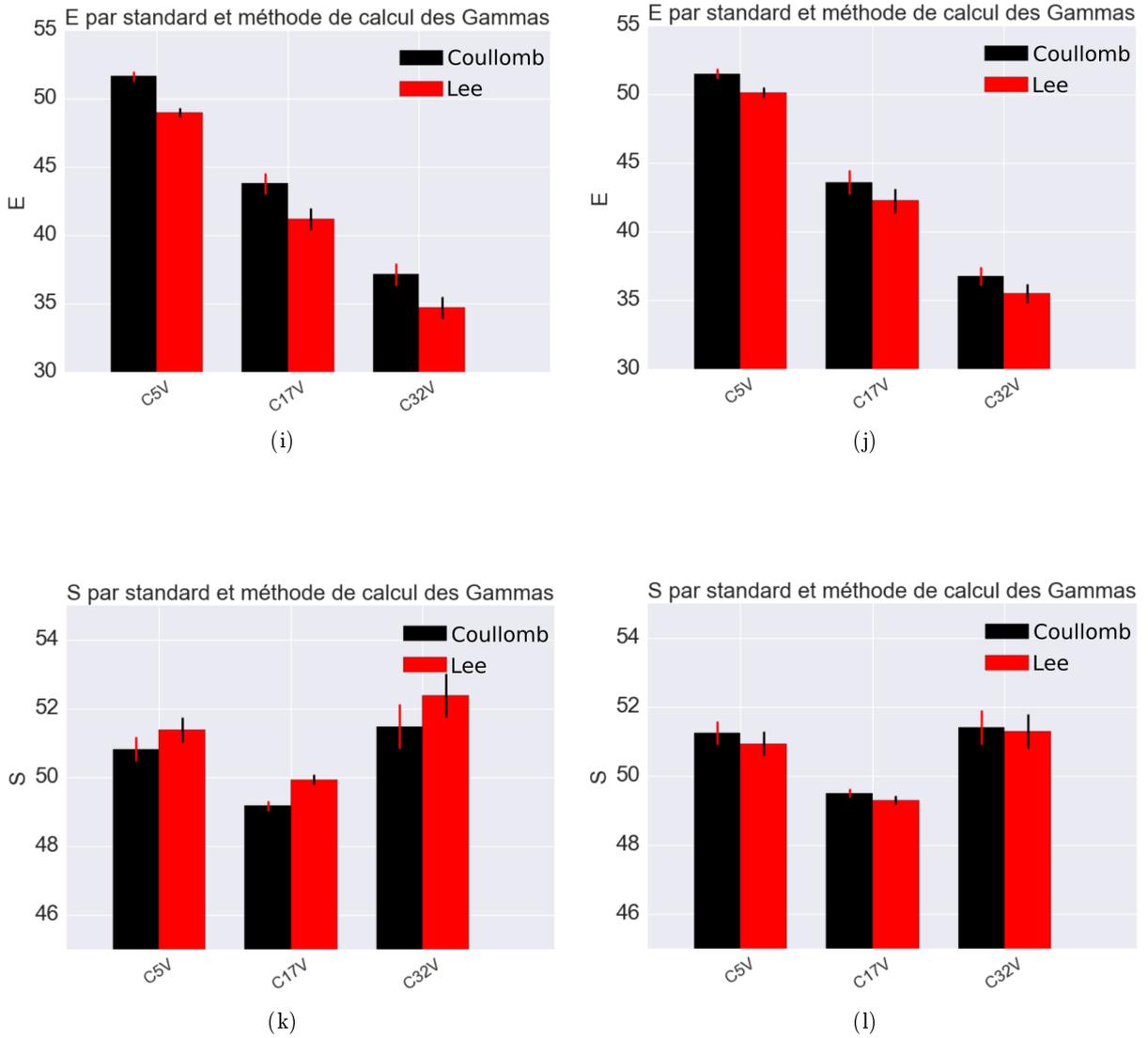
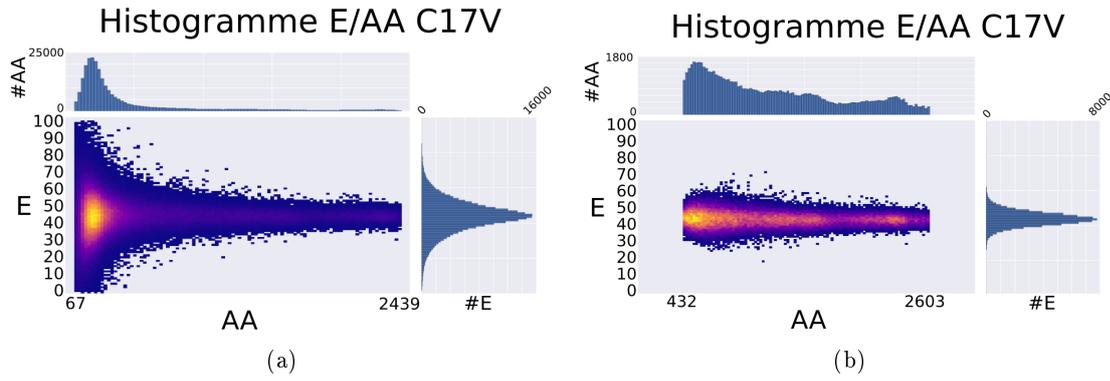


FIGURE 4.23 – Effet du filtrage spatial sur les mesures : la colonne gauche correspond aux données non filtrées, la colonne droite aux données filtrées spatialement. 1^{ère} ligne : carte des efficacités de FRET (a,b). 2^e ligne : carte des stœchiométries (c,d). 3^e ligne : histogrammes 2D E/S (e,f). 4^e ligne : histogrammes 2D des E/I_{AA} (g,h). 5^e ligne : graphes en barres de E par standard et méthode de calcul de γ^M et γ^X (i,j). 6^e ligne : graphes en barres de S par standard et méthode de calcul de γ^M et γ^X (k,l).

Méthode	ΔE_{C5V}	ΔE_{C17V}	ΔE_{C32V}	ΔS_{C5V}	ΔS_{C17V}	ΔS_{C32V}	$\Delta \gamma^M$	$\Delta \gamma^X$
Coullomb	-0,12	-0,18	-0,38	0,43	0,32	-0,05	-0,04	0,01
Lee	1,17	1,07	0,79	-0,44	-0,65	-1,10	-0,16	0,00

TABLE 4.2 – Variation des résultats après filtrage spatial pour les méthodes COULLOMB et LEE. Après filtrage spatial, les variations de E et S sont plus faibles avec notre méthode qu’avec la méthode LEE.

De même que pour l’estimation de γ^{BT} et γ^{DE} , il est de plus possible de sélectionner pour chaque cellule les pixels de plus haute valeur pour éliminer l’importance du bruit par rapport au signal mesuré. Lorsque nous le faisons, nous décidons de rejeter les pixels dont les valeurs d’intensité dans le canal I_{AA} sont inférieures au 70^e percentile de l’ensemble de ces valeurs. Cela nous permet d’analyser la population des pixels dont l’efficacité de FRET se trouve dans la zone où les valeurs de E sont les plus proches d’une valeur commune (figure 4.24).


 FIGURE 4.24 – Sélection des pixels d'intensité supérieure au 70^e percentile.

Filtre spatial	Méthode	EC_{5V}	EC_{17V}	EC_{32V}	SC_{5V}	SC_{17V}	SC_{32V}	γ^M	γ^X
Filtre valeurs									
non	Coullomb	51,62	43,78	37,15	50,83	49,19	51,45	1,98	1,20
non	Lee	48,96	41,20	34,72	51,38	49,95	52,39	2,21	1,16
	Diff	2,66	2,58	2,43	-0,56	-0,76	-0,94	-0,22	0,04
non	Coullomb	49,98	43,40	36,43	50,81	49,99	51,90	2,04	1,17
70%	Lee	51,54	44,94	37,88	50,87	49,95	51,75	1,92	1,21
	Diff	-1,56	-1,53	-1,45	-0,05	0,05	0,15	0,12	-0,04
gauss	Coullomb	51,50	43,60	36,76	51,25	49,51	51,40	1,94	1,21
non	Lee	50,13	42,27	35,50	50,94	49,30	51,29	2,05	1,16
	Diff	1,37	1,34	1,26	0,31	0,20	0,11	-0,11	0,05
gauss	Coullomb	49,80	43,23	35,72	50,83	49,96	51,59	2,01	1,18
70%	Lee	52,24	45,64	37,98	50,76	49,73	51,18	1,82	1,23
	Diff	-2,44	-2,40	-2,27	0,07	0,23	0,41	0,19	-0,05

TABLE 4.3 – Écarts de résultats entre les 2 méthodes selon les conditions de traitement des données.

Filtre spatial	Méthode	EC_{5V}	EC_{17V}	EC_{32V}	SC_{5V}	SC_{17V}	SC_{32V}	γ^M	γ^X
Filtre valeurs									
non	Coullomb	0,89	0,28	0,63	-0,10	-0,47	-0,13	-0,01	0,01
non	Lee	-1,76	-2,31	-1,80	0,40	0,22	0,74	0,21	-0,03
non	Coullomb	-0,74	-0,10	-0,08	-0,12	0,33	0,31	0,05	-0,01
70%	Lee	0,83	1,43	1,36	-0,12	0,21	0,10	-0,08	0,02
gauss	Coullomb	0,78	0,10	0,25	0,32	-0,16	-0,19	-0,06	0,02
non	Lee	-0,59	-1,24	-1,02	-0,05	-0,43	-0,36	0,05	-0,03
gauss	Coullomb	-0,93	-0,27	-0,80	-0,10	0,30	0,01	0,02	-0,01
70%	Lee	1,52	2,13	1,46	-0,23	0,00	-0,47	-0,18	0,04

TABLE 4.4 – Effets des paramètres de traitement et de sélection des données sur l'écart à la moyenne des résultats pour chaque méthode.

Le choix d'appliquer ou non un filtrage spatial avec un filtre gaussien et celui d'ignorer ou non les valeurs de E où l'intensité des pixels est la plus basse forment 4 combinaisons de traitement des données dont les résultats sont présentés ci-après. Les différences de résultats entre les méthodes COULLOMB et LEE pour chaque traitement de données sont présentées dans le tableau 4.3. Les plus faibles écarts entre les 2 méthodes sont observés pour les combinaison {Filtre Spatial : non ; Filtre sur les Valeurs : oui} et {Filtre Spatial : oui ; Filtre sur les Valeurs : non}. Par ailleurs, pour chaque méthode, les écarts entre

les résultats d'un traitement de données avec la moyenne des résultats des 4 traitements de données sont résumés dans le tableau 4.4. On observe aussi les plus faibles écart *intraméthode* pour les traitements {Filtre Spatial : non ; Filtre sur les Valeurs : oui} et {Filtre Spatial : oui ; Filtre sur les Valeurs : non}. Dans la suite de ce document, sauf mention contraire, les résultats discutés pour l'exemple correspondent aux conditions de traitement {Filtre Spatial : oui ; Filtre sur les Valeurs : non}, bien que les différentes combinaisons de paramètres de traitement aient toutes été exploitées et analysées.

Étude de l'augmentation de E avec l'intensité de fluorescence

En examinant plus en détail les valeurs d'efficacité de FRET des cellules, on remarque que certaines cellules ont des valeurs bien plus importantes que d'autres exprimant le même standards FRET. Cela se remarque sur la figure 4.25a, où l'histogramme des valeurs d'efficacité de FRET de cellules exprimant le standard C17V est rendu asymétrique par ce qui semble être un ensemble de valeurs distribuées autour d'une valeur moyenne supérieure à la valeur moyenne de l'ensemble des points. Un examen plus attentif des histogrammes 2D E/S nous permet de remarquer que la cellule C17V n°9.2 (2^e cellule de la 9^e image) a des valeurs de E largement supérieures aux autres cellules C17V (figure 4.25b). C'est aussi la cellule qui montre de loin les plus hautes valeurs d'intensité dans le canal I_{AA} . La représentation 3D du nuage des points de mesure (figure 4.25c) confirme ces observations : les standards C5V, C17V (à l'exception de la cellule 9.2) et C32V sont représentés en rouge, orange et bleu respectivement. Les points de la cellule C17V n°9.2, représentés en vert, suivent la droite de FRET des points de C5V. La figure 4.18 représentait en réalité l'ensemble des cellules à l'exception près de C17V n°9.2 dans un souci de pédagogie, mais les résultats discutés jusqu'ici incluaient cette cellule "aberrante".

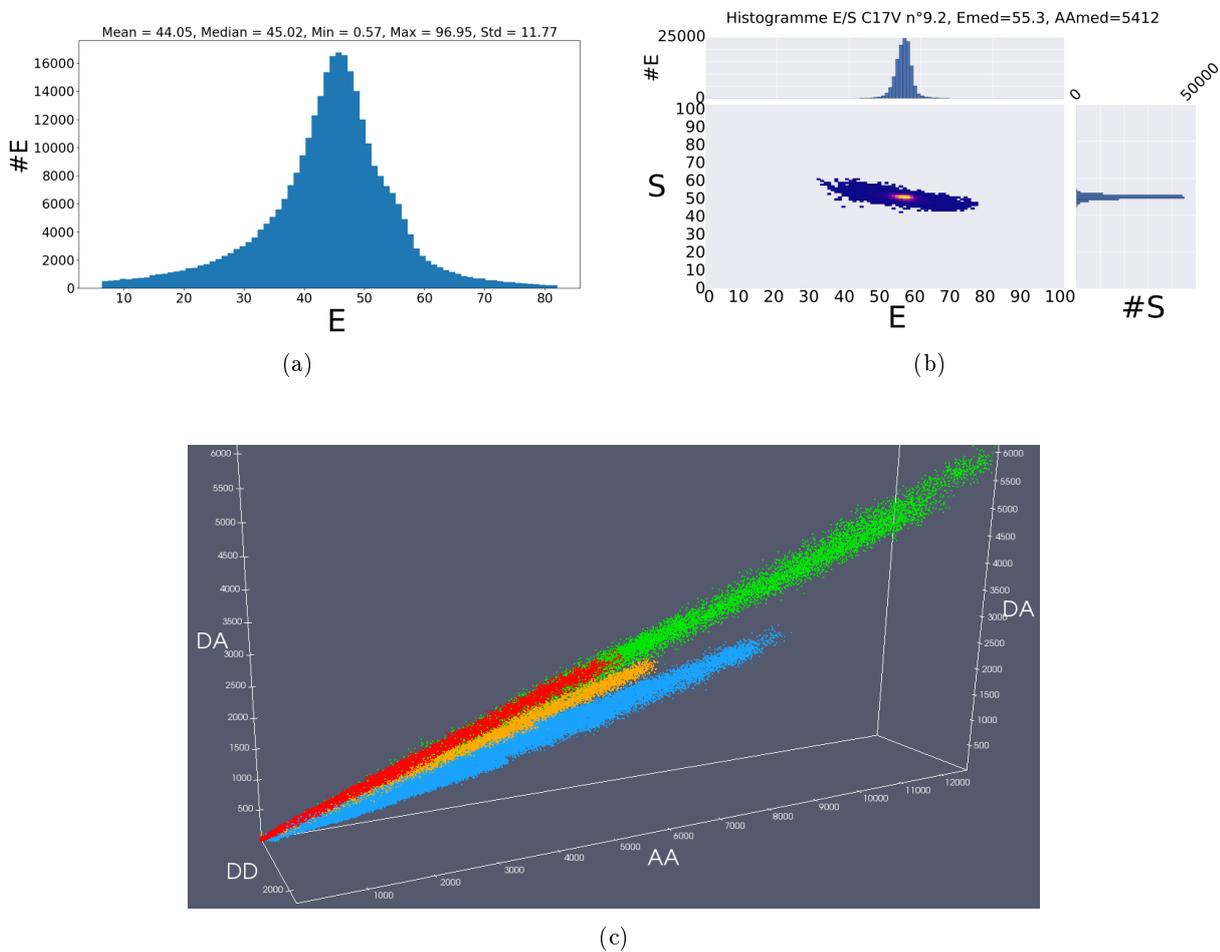


FIGURE 4.25 – Une cellule de très haute intensité de fluorescence présente un très haut E . (a) : Histogramme des efficacités de FRET des cellules C17V. (b) : Histogramme 2D E/S de la cellule C17V n°9.2, la médiane de E est beaucoup plus élevée que celle l'ensemble des cellules C17V. (c) : Nuages des points de mesure des standards FRET. En vert la cellule C17V n°9.2 suit la droite de FRET du nuage de points de C5V.

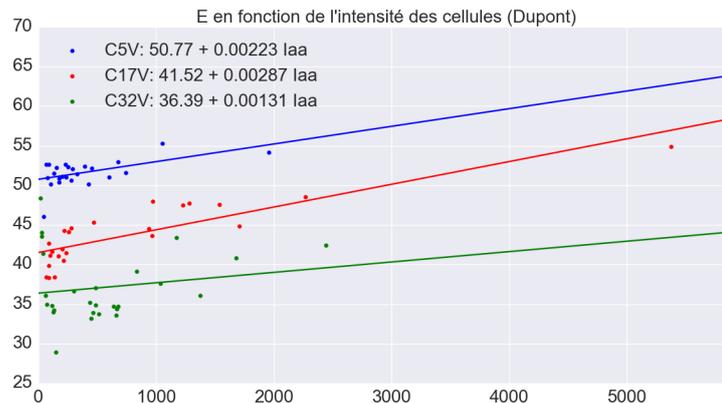
Cette cellule est remarquable par son intensité de fluorescence exceptionnellement élevée, qui nous alerte sur un phénomène inattendu, mais d'autres cellules relativement intenses montrent des médianes d'efficacité de FRET plus élevées que les cellules de plus faible intensité. En traçant pour chaque cellule sa médiane d'efficacité de FRET en fonction de sa médiane d'intensité dans le canal I_{AA} (figure 4.26a), on observe que les valeurs de E semblent croître légèrement avec I_{AA} . Il y a 2 causes possibles pour une

augmentation de E avec I_{AA} :

- une sous estimation de γ^{BT} ou γ^{DE} , ayant pour conséquence une surestimation du signal dans le canal I_{DA} et donc une surestimation de E
- la présence de FRET intermoléculaire : une plus haute intensité est le signe d'une plus grande concentration en fluorophores, donc d'une distance moyenne entre protéines de FRET standard plus faible. À partir d'une certaine concentration, les protéines sont assez proches les unes des autres pour qu'il y ait FRET entre le donneur d'une protéine et l'accepteur d'une protéine voisine.

Pour tester la première hypothèse, la sous estimation de γ^{BT} ou γ^{DE} , on s'intéresse aux valeurs médianes de E , S et I_{AA} de chaque cellule, qu'on désigne par la suite par E_{med} , S_{med} et AA_{med} . On note β_E le coefficient directeur des valeurs de E_{med} en fonction des valeurs de AA_{med} , et β_S et α_S le coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine des valeurs de S_{med} en fonction des valeurs de AA_{med} . Nous cherchons le couple de valeurs $\{\gamma^{BT}; \gamma^{DE}\}$ qui nous rapproche le plus des valeurs cibles $\beta_E = \beta_S = 0$ et $\alpha_S = 50\%$, qui correspondent à une non-augmentation de E et S avec l'intensité des cellules et une stœchiométrie toujours égale à 50%. Pour ce faire nous avons d'abord défini une fonction de coût selon l'écart des valeurs de β_E , β_S et α_S à leur valeur cible. Nous avons ensuite réalisé une descente de gradient (explications page 83) initialisée aux valeurs de γ^{BT} et γ^{DE} estimées précédemment. Cette méthode produit bien des valeurs optimales de γ^{BT} et γ^{DE} pour lesquelles E et S n'augmentent pas avec l'intensité des cellules, mais les valeurs de γ^{BT} et γ^{DE} sont négatives, ce qui n'a aucun sens physique.

Nous avons alors employé une autre méthode, dite de "force brute", qui consiste à parcourir tous les couples possibles de $\{\gamma^{BT}; \gamma^{DE}\}$ entre des bornes données et avec un pas fixé. À chaque couple de valeurs, on enregistre les valeurs de la fonction de coût définie précédemment, et de β_E , α_E (l'ordonnée à l'origine de E_{med} en fonction de AA_{med}), β_S et α_S . La carte de fonction de coût (figure 4.26b) montre un optimum (minimum local de la fonction de coût) pour les valeurs positives de γ^{BT} et γ^{DE} à $\gamma_{BT} = 4.2$ et $\gamma_{DE} = 0.25$, ce qui est respectivement environ 10 et 25 fois plus élevé que nos estimations initiales. La carte (figure 4.26f) de différence absolue entre la moyenne des valeurs de β_E pour les 3 standards et la valeur cible (qui vaut 0, puisqu'idéalement E n'augmente pas avec I_{AA}) montre une vallée optimale pour γ^{BT} compris entre 0 et 4.2 et γ^{DE} compris entre 0.5 et 0.25 respectivement. Une valeur de γ^{BT} égale à notre estimation implique une valeur de γ^{DE} 50 fois plus importante que notre estimation. Une valeur de γ^{DE} plus proche de notre estimation, bien qu'éloignée de cette dernière, implique une valeur de γ^{BT} 10 fois plus importante que notre estimation. Ces écarts entre valeurs optimales de coefficients et estimations d'après des mesures robustes sont bien trop importants pour valider l'hypothèse d'une mauvaise estimation initiale de γ^{BT} et γ^{DE} . On remarque que nos estimation initiales sont d'ailleurs de "l'autre côté du col" de la fonction de coût et de l'écart de β_E à zéro. Cela explique pourquoi la descente de gradient donnait des valeurs de γ^{BT} et γ^{DE} négatives, et cela conforte aussi nos estimations : si on veut augmenter légèrement γ^{BT} ou γ^{DE} pour diminuer l'accroissement de E avec I_{AA} , on empire le phénomène, jusqu'à ce qu'on dépasse un seuil de valeurs de γ^{BT} et γ^{DE} importantes.



(a)

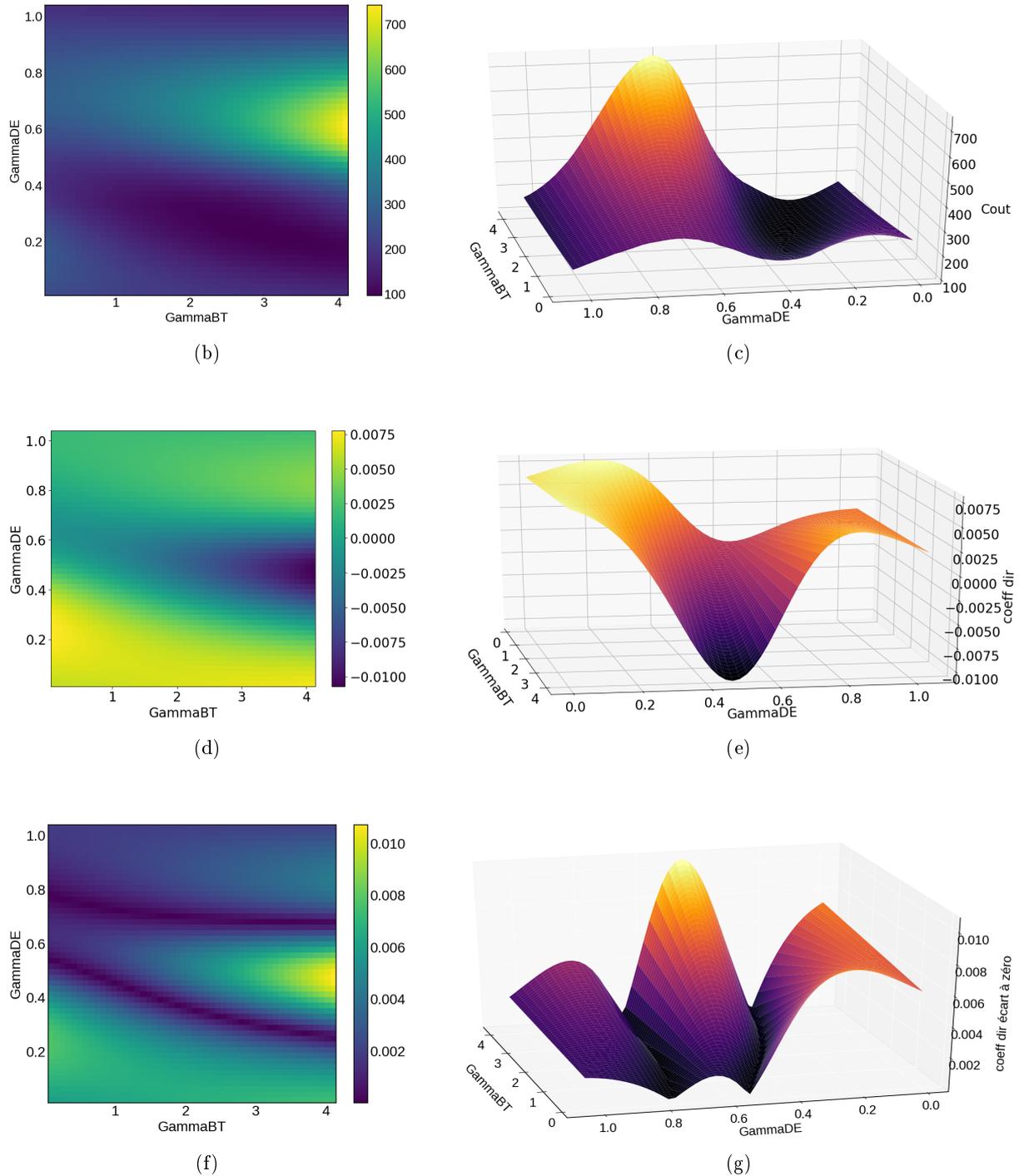


FIGURE 4.26 – Effets de la variations de γ^{BT} et γ^{DE} sur les coefficients directeurs de E en fonction de I_{AA} . (a) : L'efficacité de FRET médiane des cellules augmente avec leur intensité médiane dans le canal I_{AA} . (b,c) : Cartes 2D et 3D de la fonction de coût en fonction de γ^{BT} et γ^{DE} . (d,e) : Cartes 2D et 3D de β_E , le coefficient directeur de E en fonction de I_{AA} , en variant γ^{BT} et γ^{DE} . (f,g) : Cartes 2D et 3D de l'écart de β_E à zéro.

En observant de manière plus détaillée le tracé de E médian en fonction de I_{AA} médian (figure 4.27a), on remarque qu'en dessous d'un certain seuil, environ $I_{AA} = 250$, les efficacités de FRET des cellules C5V et C17V augmentent brusquement, alors que celles des cellules C32V diminuent fortement. Au delà de ce seuil, les efficacités de FRET pour les 3 espèces augmentent de manière similaire avec I_{AA} . De même, les valeurs de S en dessous de ce seuil d'intensité varient de manière beaucoup plus importante, jusqu'à atteindre $S = 61.5\%$, alors que leur distribution est plus resserrée autour de 50% après le seuil d'intensité. Nous pouvons donc choisir d'ignorer dans les analyses les cellules dont l'intensité médiane dans le canal I_{AA} est inférieure à 250, et les cartes de fonction de coût et de β_E en fonction du couple

$\{\gamma^{BT}; \gamma^{DE}\}$ produites sont très semblables aux cartes de la figure 4.26.

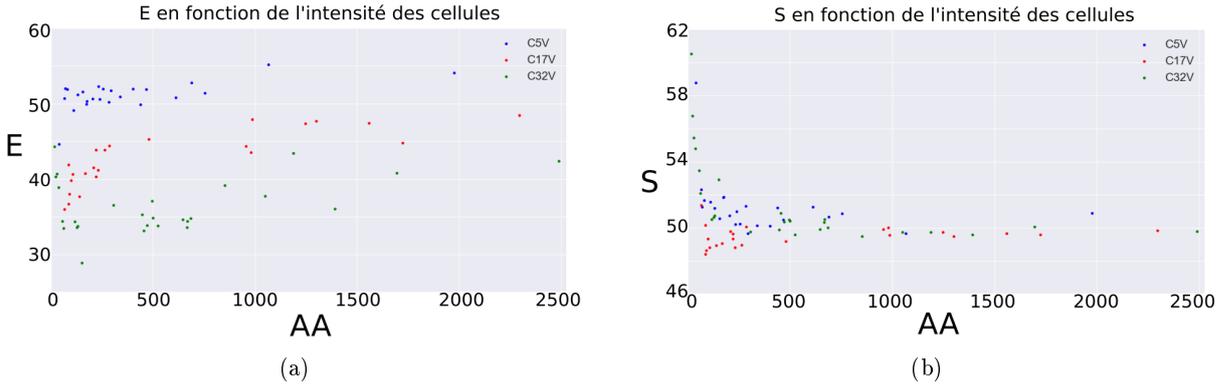


FIGURE 4.27 – (a) : Évolution de E avant et après le seuil d'intensité dans le canal I_{AA} , à environ $I_{AA} = 250$. (b) : Évolution de S en fonction de l'intensité dans le canal I_{AA} .

Il était donc très semblable que nos estimations de γ^{BT} et γ^{DE} n'étaient pas à l'origine de l'augmentation des valeurs d'efficacité de FRET en fonction des valeurs d'intensité, mais que ce phénomène était dû à du FRET intermoléculaire. Koushik *et al.* [162] vérifient la présence de FRET intermoléculaire par un ajustement de droite de E en fonction de l'intensité du signal pour s'assurer que leurs mesures "anormalement élevées" d'efficacités de FRET en présence de multiples accepteurs ne soient pas dues à ce phénomène. Si nos mesures sont affectées par le FRET intermoléculaire, cette méthode nous permet de déterminer le FRET en absence absolue de FRET intermoléculaire : en prenant la valeur de l'ordonnée à l'origine de E en fonction de I_{AA} , l'intensité est nulle, il n'y a donc virtuellement aucune protéine fluorescente, et donc aucun FRET intermoléculaire.

Ce phénomène d'augmentation de E avec l'intensité des cellules avait été observé en prenant pour chaque cellule la médiane de ses valeurs d'intensité et la médiane de ses valeurs d'efficacité de FRET. Pour vérifier que ces observations n'étaient pas un artefact dû à la sélection des médianes de E et I_{AA} , nous avons tracé l'histogramme 2D de E et I_{AA} pour les valeurs de l'ensemble des pixels des cellules d'une espèce. Sur la figure 4.28, un ajustement de droite (ligne rouge) met en évidence l'augmentation apparente des valeurs de E en fonction de l'intensité des cellules C17V, et ce pour chaque pixel.

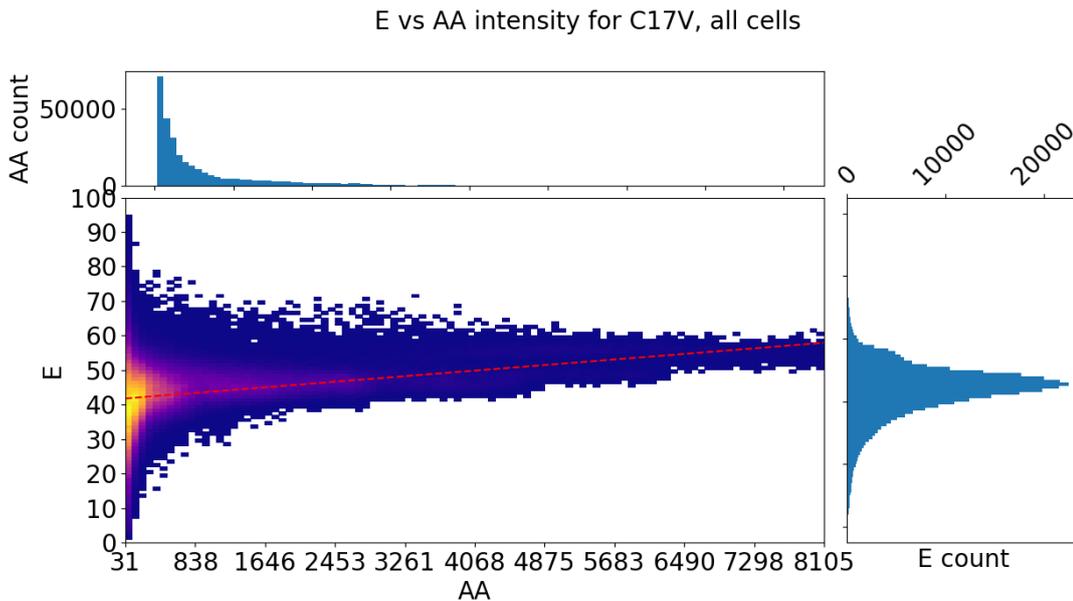


FIGURE 4.28 – Histogramme 2D de E et I_{AA} de toutes les valeurs des cellules C17V. La ligne rouge montre l'ajustement de droite.

Cependant, un examen plus attentif révèle que cet histogramme est composé de sous-ensembles de

points parfaitement horizontaux, qui correspondent chacun à une ou quelques cellules. On peut mettre en évidence ces sous-ensembles en compressant les comptes de l'histogramme 2D, par exemple en affichant la racine cubique du nombre de pixels comptés (figure 4.29a), le nuage de points correspondant à la cellule C17V n°9.2 est alors clairement discernable. De plus, les histogrammes 2D $E-I_{AA}$ de chaque cellule montrent sans exception un ensemble de points horizontal, c'est à dire que pour chaque cellule l'efficacité de FRET ne dépend pas de l'intensité de fluorescence. La cellule C17V n°9.2, qui est la cellule extrêmement intense à l'origine de toutes ces vérifications, présente elle aussi une indépendance des valeurs d'efficacité de FRET par rapport à l'intensité du signal de fluorescence mesuré (figure 4.29b).

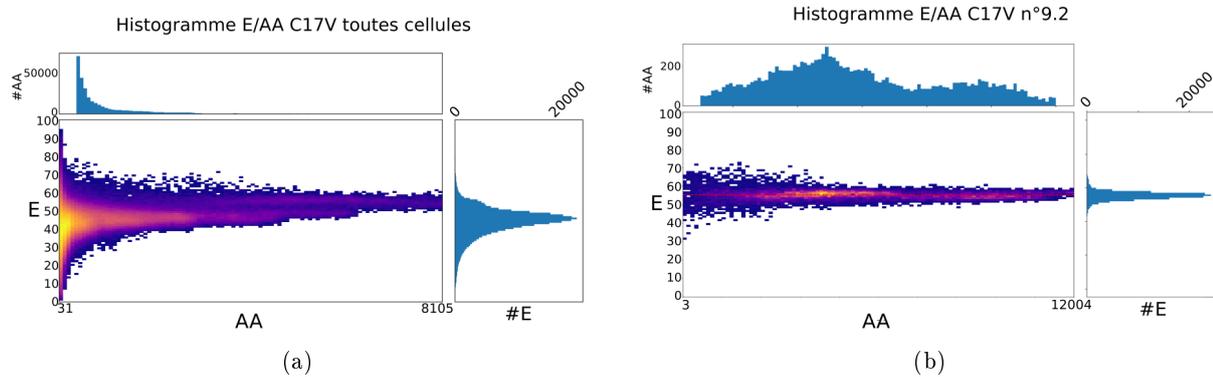


FIGURE 4.29 – (a) : Histogramme 2D de E et I_{AA} de toutes les valeurs des cellules C17V. Les comptes ont été compressés pour mettre en évidence les sous-ensembles de points. (b) : Histogramme 2D de E et I_{AA} pour la cellule très intense n°9.2. Son histogramme est plat, E n'augmente pas avec l'intensité des pixels.

Cette indépendance de E par rapport à l'intensité de fluorescence est un critère usuel pour affirmer qu'il n'y a pas de FRET intermoléculaire [162]. Cependant, ce critère n'est valable que lorsque la méthode de microscopie employée permet de corrélérer une variation locale d'intensité à une variation locale de concentration en fluorophores, comme c'est le cas pour le TIRF ou la microscopie confocale. Or nous utilisons un microscope en épifluorescence plein champ pour acquérir le signal de fluorescence des molécules présentes dans le volume d'observation. Pour un objectif de grossissement x60 et d'ouverture numérique 0.85, la profondeur de champ vaut $0,40\mu\text{m}$. L'épaisseur d'une cellule adhérent à un substrat varie elle d'environ $10\mu\text{m}$ au niveau du noyau [163] à $0,1\mu\text{m}$ pour les lamellipodes [164], voir moins pour des structures membranaires moins organisées en périphérie de la cellule. Ainsi, pour une concentration homogène de fluorophores dans une cellule, nous observons une variation d'intensité principalement due à une variation du volume effectif de cellule observé (figure 4.30). La variation d'intensité observée au sein de chaque cellule ne témoigne donc pas d'une variation de concentration en fluorophores. En revanche, la variation d'intensité médiane entre cellules est elle certainement due à une variation de concentration en fluorophores qui explique la probable présence de FRET intermoléculaire.

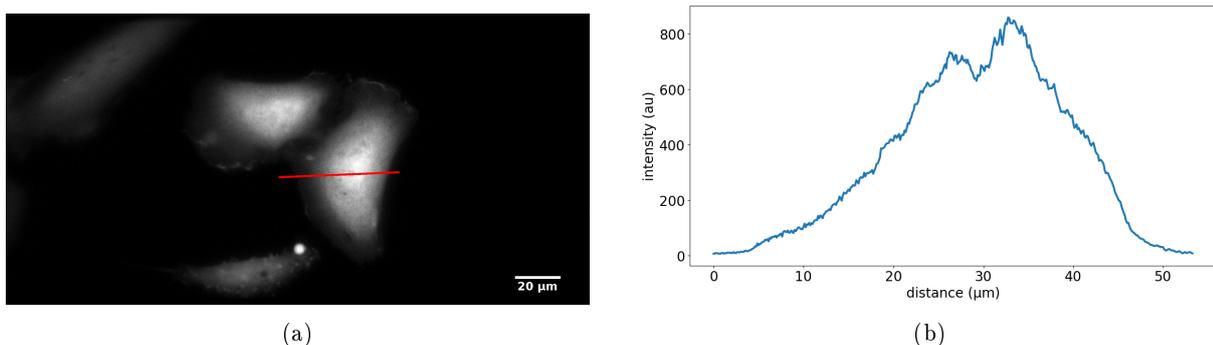


FIGURE 4.30 – (a) Cellule produisant le fluorophore C5V dont le profil d'intensité est tracé selon la ligne rouge. (b) Profil d'intensité de la cellule.

Notre méthode d'analyse de FRET produit donc des mesures de E et S indépendantes de l'intensité de fluorescence des cellules. La variation intercellulaire d'efficacité de FRET est certainement due à la présence de FRET intermoléculaire. Il est possible de prendre en compte ce phénomène au moyen de courbes de calibration comme à la figure 4.26a, qui nous permettent alors de déterminer la part de FRET intramoléculaire par rapport au FRET intermoléculaire.

Conclusion et perspectives

Récapitulatif

Cette thèse était motivée par la volonté d'étudier la réponse des cellules aux stimulations mécaniques. La mise au point des substrats actifs répond au besoin de la communauté de la mécanobiologie d'un système permettant de stimuler localement et dynamiquement des cellules adhérentes via une surface continue. Ces substrats sont constitués d'une couche de PDMS peu rigide (20 kPa) de 115 μm d'épaisseur dans laquelle sont incorporés sous la surface des micropiliers en fer doux d'environ 15 μm \times 30 μm . Deux électroaimants permettent de générer un champ magnétique qui exerce un couple sur les piliers, qui en s'alignant avec le champ déforment la surface de PDMS et les cellules qui y adhèrent. Des microbilles fluorescentes incrustées juste sous la surface de PDMS permettent de mesurer les déformations de cette surface. Nous pouvons inférer les forces qui s'exercent à la surface par TFM et contrôler ainsi la contrainte appliquée par les piliers à la surface et aux cellules, et nous pouvons mesurer la réponse mécanique des cellules qui exercent des forces de traction sur le substrat. Les contraintes de traction ou de compression exercées par les piliers aux cellules via le substrat sont locales, puisque leur amplitude décroît de moitié sur 20 μm , elles sont comparables aux contraintes qu'appliquent les cellules au substrat, et nous pouvons les contrôler dynamiquement en contrôlant l'intensité du courant d'entrée dans les électroaimants. Enfin, ces substrats sont compatibles avec la microscopie de fluorescence, ce qui nous a permis d'étudier comme preuve de principe l'activité protrusive de fibroblastes suite à une stimulation mécanique.

Nous avons par ailleurs essayé de mettre au point une méthode pour stimuler mécaniquement les cellules par des ondes acoustiques de surface. Cette partie de la thèse était motivée par des observations préliminaires qui nous faisaient penser que nous générions des ondes stationnaires à la surface d'une lamelle de verre, et que ces ondes étaient capables d'organiser spatialement des billes micrométriques, et donc potentiellement de stimuler mécaniquement des cellules à des échelles bien plus petites que celles que nous atteignons avec les substrats actifs. De nombreux montages expérimentaux ont été réalisés, et un de ces montages en particulier produisait des observations intéressantes. Lorsqu'un substrat en PAA sur une lamelle de verre et dans une chambre fermée était excité par un transducteur piézoélectrique collé de l'autre côté de la lamelle de verre, nous observions les déplacements des traceurs fluorescents à la surface du PAA qui suivaient des trajectoires circulaires, elliptiques ou rectilignes en variant la zone d'observation ou la fréquence d'excitation. Ce phénomène nous laissait entrevoir la possibilité de stimuler les cellules via des déformations de surface de trajectoires variables, mais il nous a été de plus en plus difficile de reproduire ces observations. J'ai donc consacré le reste de ma thèse à développer une nouvelle méthode de mesure de FRET en cellules vivantes.

En effet, dans le cadre de l'étude de la mécanotransduction, nous nous intéressons à la réponse biochimique des cellules et à la façon dont leur réseau de signalisation réagit suite à un signal mécanique. Nous employons pour cela des biosenseurs d'activité dont l'efficacité de FRET varie en fonction de l'activité d'une protéine d'intérêt impliquée dans la signalisation cellulaire. Notre montage expérimental est une adaptation de la technique de l'ALEX FRET : une source laser illumine l'échantillon de manière alternée à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore donneur puis de l'accepteur, et les images de fluorescence dans le canal d'émission du donneur et dans celui de l'accepteur sont acquises simultanément. Le minutage précis de l'excitation et la synchronisation entre le laser et la caméra sont réalisés au moyen

d'un contrôleur temps réel et d'un FPGA exécutant un programme écrit pour nos besoins. La théorie de l'analyse des données de FRET a été redéveloppée pour mettre au point une méthode d'analyse quantitative produisant des mesures d'efficacité de FRET E et de stœchiométrie S indépendantes du montage expérimental, et comparables entre types cellulaires et laboratoires. Nous obtenons des cartes de E qui nous permettent d'étudier à chaque instant comment l'activité de protéines varie au sein d'une même cellule. Les cartes de S nous permettent de contrôler la maturation des fluorophores des biosenseurs, et d'ignorer les zones où des facteurs tels que l'auto fluorescence des cellules ou l'environnement chimique sont trop importants et pourraient impacter les mesures de E . Notre méthode requière la détermination des facteurs de correction pour le débordement de spectre d'émission du donneur dans le canal accepteur γ^{BT} et pour l'excitation directe de l'accepteur à la longueur d'onde d'excitation du donneur γ^{DE} . Ces paramètres sont relativement répandus, et l'influence des paramètres d'acquisition, des méthodes de traitement d'images et des techniques de calcul des facteurs ont été examinées en détail. Enfin, pour réaliser des mesures réellement quantitatives, nous avons besoin des facteurs γ^M qui corrige la différence de signal mesuré lorsque une même quantité d'énergie est absorbée par un fluorophore donneur ou accepteur, et γ^X qui corrige la différence d'absorption d'énergie de chaque espèce. Une nouvelle méthode de détermination des ces facteurs a été développée, elle nécessite au moins 2 acquisitions qui diffèrent dans les valeurs d'efficacité de FRET et, similairement à d'autres méthodes, la stœchiométrie des échantillons est connue ou supposée. Cette méthode a été comparée expérimentalement à la méthode développée par LEE *et al.* [147] en utilisant les mêmes images de cellules produisant les standards FRET C5V, C17V et C32V. Les 2 méthodes produisent des résultats similaires, bien que la nôtre soit plus robuste aux différences de traitement des images¹. Nous avons observé une légère augmentation de E avec le niveau d'expression des cellules pour les 3 standards FRET. Les mesures de γ^{BT} et γ^{DE} ne semblent pas en être la cause, et si au sein de chaque cellule E n'augmente pas avec l'intensité de fluorescence, notre méthode d'acquisition ne nous permet pas de nous baser sur ces observations pour rejeter l'hypothèse du FRET intermoléculaire. Cette hypothèse reste donc la plus probable pour expliquer la légère augmentation de E avec l'intensité de fluorescence moyenne des cellules, et il est possible de prendre en compte ce phénomène au moyen de calibrations pour déterminer la part de FRET intra et intermoléculaire. Notre technique de FRET permet donc de mesurer quantitativement des efficacités de FRET, notamment de biosenseurs d'activité, avec une résolution spatiale identique à celle d'une technique classique de microscopie de fluorescence (inférieure à 1 μm) et une résolution temporelle de l'ordre de la seconde.

Perspectives

Concernant les substrats actifs, d'autres méthodes de fabrication des piliers sont à l'étude pour accroître leur rendement magnétique pour pouvoir éloigner les électroaimants du milieu d'observation. Une voie envisagée est la fabrication de piliers entièrement constitués de fer au lieu de piliers en silicium recouverts d'une couche de fer. L'organisation spatiale des piliers pourrait s'en trouver aussi améliorée, puisque elle est limitée par la force qu'exerce le gradient de champ magnétique généré par l'aimant permanent et mis en forme par le patron magnétique lors de la cuisson du PDMS. Un patron d'îlots avait été essayé, mais la force du gradient était trop faible par rapport aux forces de frottement visqueux du PDMS sur les piliers, cantonnant l'organisation spatiale des piliers à des lignes puisque le gradient généré était alors plus important. L'utilisation de polyacrylamide est aussi envisagée, elle nous permettrait d'atteindre des rigidités 5 fois plus faibles, et l'organisation spatiale des piliers en serait encore facilitée. En effet la viscosité de la solution de PAA non polymérisé est beaucoup plus faible que celle du PDMS non cuit, cependant si les problèmes d'oxydation des piliers ont été résolus, la très faible viscosité de la solution de PAA pose de nouveaux obstacles pratiques à franchir. Enfin, une avancée cruciale serait la capacité de contrôler le dépôt de protéines d'adhérence selon des motifs et à des positions contrôlées. Ce dernier point nous permettrait de contrôler la forme des cellules et leurs positions relatives aux piliers. Il est possible créer des motifs de protéines à la volée sans contact avec le substrat en illuminant la surface

1. À la demande des rapporteurs des analyses supplémentaires sur les incertitudes de mesure ont été effectuées. Il s'avère que notre méthode présente de plus faibles incertitudes de mesure. Plus de détails en Annexe B.3

avec un faisceau structuré spatialement grâce à une matrice de micro-miroirs (digital micromirror device DMD). Selon les technologies, cette illumination induit la greffe de protéines à la surface, ou détruit une brosse de polymère qui empêche les protéines d'intérêt de s'adsorber à la surface. Nous pourrions nous inspirer de ces solutions pour réaliser un programme chargé de détecter la position des micropiliers, et d'illuminer avec un faisceau structuré la surface au voisinage de ces piliers pour y greffer les protéines d'adhérence cellulaire par exemple.

Le développement des ondes acoustiques pour la stimulation mécanique de cellules a été abandonné en grande partie pour des raisons de gestion de projet limité dans le temps. Cette voie reste toutefois intéressante, et de nombreuses pistes restent à explorer pour mettre au point un montage expérimental opérationnel. Le montage de PAA en chambre fermée renversée devrait être testé de nouveau avec une technique de fixation du transducteur à la lamelle moins destructive que le collage à la colle cyanolite suivi du décollage à l'acétone. D'autres configurations reposant sur le principe d'un transducteur qui génère une onde mécanique qui se propage sur la lamelle de verre sont aussi envisageables, mais nous pouvons aussi utiliser des substrats eux-mêmes piézoélectriques. Nous pourrions alors générer des ondes stationnaires dont la longueur d'onde serait largement inférieure à la taille des cellules.

Enfin, en ce qui concerne l'analyse quantitative de FRET, si de nombreuses questions que je me posais ont trouvé une réponse, une étude des conditions physico-chimiques incluant l'effet du pH, de la salinité et des espèces oxydantes réactives (ROS) sur les biosenseurs mériterait d'être menée. Ces informations nous permettraient de nous prémunir d'artefacts de variation d'efficacité de FRET lors de processus cellulaires connus pour présenter des changements notables en terme de pH ou de ROS tels que la migration ou la phagocytose. Sur notre montage expérimental, lors du suivi temporel de l'efficacité de FRET d'un biosenseur exprimé par une cellule, nous avons remarqué un saut dans les valeurs de E qui correspondait à l'instant suivant la réajustation de la mise au point après une perte progressive de cette dernière. Il me semble important de déterminer dans quelle mesure les valeurs de E varient lorsque la mise au point change, et quel est l'effet du halo produit par des zones extrêmement fluorescentes sur les valeurs de E des zones voisines. Ces 2 dernières questions auront toutefois une importance bien moindre lorsque le système de TIRF et de suivi de mise au point automatique seront fonctionnels sur notre microscope. Le système de TIRF répondrait aussi à 2 points plus critiques encore : un meilleur ratio signal / bruit qui nous permettrait d'observer des cellules avec un niveau d'expression plus faible, et un volume d'excitation constant par expérience, qui nous permettrait de comparer plus précisément l'évolution de E avec le niveau d'expression des cellules pour étudier la présence de FRET intermoléculaire. Pour conclure, la méthode est prête à être utilisée pour analyser l'état d'activité des kinases et des GTPases dont nous disposons des biosenseurs. Nous disposons des outils pour étudier l'activité des protéines en fonction de la morphodynamique des cellules, et de nombreuses collaborations sont en vue pour exploiter ce fabuleux outil.

Annexe A

Protocoles expérimentaux

A.1 Protocoles de transfection

Pour obtenir des cellules exprimant un plasmide qui code pour un fluorophore simple ou un biosenseur, nous décongelons les bactéries contenant ce plasmide et nous en faisons une culture. Puis nous purifions l'ADN plasmidique selon les étapes du protocole "Xtra Midi « Finalizers », high copy" :

1. Centrifuger dans un falcon de 50mL à 5000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Jeter le surnageant à la poubelle biologique.
2. Resuspendre avec le milieu RES 8 ml. Aspirer refouler pour bien diluer le culot.
3. Ajouter le milieu LYS 8 ml, remuer en fermant 5 fois. Incuber pendant 5 min à température ambiante.
4. Ajouter le milieu NEU 8 ml, agiter doucement en renversant le tube jusqu'à ce que le milieu devienne blanc.
5. Centrifuger à 6500 g pendant 10 min.
6. Placer la colonne avec son filtre dans falcon de 50 ml et les laver avec le milieu EQU 12 ml en le versant sur les bords du filtre.
7. Verser le lysat contenant l'ADN dans le filtre.
8. Laver le filtre de la colonne et la colonne avec le milieu EQU 5 ml.
9. Enlever le filtre, verser le milieu WASH 8 ml dans la colonne.
10. Mettre la colonne sur un tube NEUF (ADN récupéré ici)
11. Verser le milieu ELU 8 ml.
12. Passer au chapitre 7.3 sur Finalizer :
13. Enlever la colonne et ajouter l'isopropanol 3,5 ml, inverser 3 fois.
14. Passer la solution à travers les filtres à seringue
15. Passer 2 fois 2 ml d'éthanol à travers le filtre
16. Passer 3 fois de l'air à travers le filtre et attendre 5 min
17. Compléter la solution avec du TRIS pour obtenir par exemple 500 µl d'ADN à donner 1 µg µL⁻¹.
18. Quantifier l'ADN.

Nous pouvons ensuite réaliser la transfection à proprement parler :

- Le soir, resuspendre les cellules et les ensemercer sur une lamelle de verre de 35 mm de diamètre de façon à obtenir une confluence d'environ 70% le lendemain matin.
- Le lendemain matin, réaliser la transfection sur la lamelle :
 - (a) Préparer un tube avec 50 mL d'OptiMEM™ et 1 µg d'ADN circulaire d'intérêt
 - (b) Préparer un tube avec 50 mL d'OptiMEM™ et 2,5 µL de Lipofectamine 2000™ (L2K)
 - (c) Incuber pendant 5 min à température ambiante
 - (d) Verser goutte à goutte le mélange (OptiMEM + L2K) dans le tube (OptiMEM + ADN)
 - (e) Incuber 15 min
 - (f) Verser goutte à goutte la solution sur la lamelle et les cellules et homogénéiser
 - (g) Incuber 4 à 6h
 - (h) Rincer avec le milieu de culture ou du Fluorobrite™ (qui n'est pas fluorescent) et replacer l'échantillon dans l'incubateur
- Observer les cellules le lendemain, dans un milieu d'imagerie non fluorescent comme du PBS ou du milieu L-15 sans rouge de phénol.

Une variante plus rapide donne aussi de très bons résultats :

- Le matin, ensemercer les cellules sur une lamelle de verre en visant une confluence de 70-80%.
- En fin d'après-midi, lorsqu'elles ont bien adhéré, faire la transfection comme dans le paragraphe précédent.
- Incuber les cellules avec la L2K pendant la nuit au lieu des 4 à 6h indiquées précédemment.
- Le matin, rincer le milieu des cellules, on peut les observer dans la foulée.

A.2 Protocole de micro-impression de protéines sur PDMS

Pour l'impression de protéines par micro-contact, il faut réaliser un patron en résine photodurcissable sur une galette de silicium, puis un tampon en PDMS dur à partir de ce patron, et enfin imprimer sur un substrat les protéines adsorbées sur ce tampon : Fabrication du wafer :

1. Chauffer la galette de silicium pendant 20 min
2. Verser la résine SU-8 et spin-coater à 2750 rpm pendant 40 s (pour une épaisseur finale de 40 µm)
3. Laisser relaxer la résine pendant 1 h
4. Pré-cuire la résine à 65 °C pendant 15 min, puis à 95 °C pendant 2 h
5. Exposer aux UV à travers le masque à 800 mJ cm⁻²
6. Attendre 10 min
7. Post-cuire la résine à 65 °C pendant 15 min, puis à 95 °C pendant 40 min
8. Développer dans le PGMEA pendant 4 min, nettoyer à l'isopropanol
9. Finaliser avec une cuisson à 135 °C pendant 2 h

Fabrication du tampon :

1. Mélanger le PDMS avec son réticulant dans des proportions en poids Réticulant : PDMS valant 1 : 10

2. Dégazer 30 min sous cloche à vide
3. Nettoyer la galette en silicium avec de l'isopropanol et de l'air propre
4. Verser le mélange de PDMS sur le wafer dans une boîte de pétri
5. Cuire au four pendant 1h à 70°C
6. Décoller le PDMS cuit du wafer et le découper avec un cutter

Impression des protéines d'adhérence :

1. Préparer une solution de 97µl PBS + 2µl Fibronectine + 1µl Fibrinogène
2. Déposer cette solution sur le tampon et incuber 5 min
3. Aspirer la solution et bien sécher le tampon à l'argon propre
4. Poser le tampon sur le PDMS mou, appuyer *légèrement*
5. Décoller le tampon

Annexe B

Suppléments mathématiques sur le FRET

B.1 Équation d'efficacité de FRET d'après l'énergie absorbée

Une autre façon d'obtenir la formule permettant de calculer E est de considérer l'énergie absorbée par les fluorophores donneurs $\epsilon = n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D$, dont une partie ϵ^f va être transmise aux fluorophores accepteurs tandis que l'autre partie ϵ^{nf} "reste chez les donneurs". Nous pouvons alors choisir de définir l'efficacité de FRET comme le ratio entre l'énergie absorbée puis transmise par l'énergie absorbée totale :

$$E = \frac{\epsilon^f}{\epsilon^f + \epsilon^{nf}} = \frac{n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D E}{n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D E + n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D (1 - E)} \quad (B.1)$$

$$\text{or (4.3a)} \Leftrightarrow n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D (1 - E) = \frac{I_{DD}}{\phi_D \eta_{Ddet}^{Dem}} \quad (B.2)$$

$$\text{et (4.3b)} \Leftrightarrow n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D E = \frac{1}{\phi_A \eta_{Adet}^{Aem}} (I_{DA} - n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D (1 - E) \phi_D \eta_{Adet}^{Dem} - n^A L_{Aex} \sigma_{Aex}^A \phi_A \eta_{Adet}^{Aem}) \quad (B.3)$$

$$\Leftrightarrow n^D L_{Dex} \sigma_{Dex}^D E = \frac{1}{\phi_A \eta_{Adet}^{Aem}} (I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA}) \quad (B.4)$$

$$E = \frac{\frac{1}{\phi_A \eta_{Adet}^{Aem}} (I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA})}{\frac{1}{\phi_A \eta_{Adet}^{Aem}} (I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA}) + \frac{I_{DD}}{\phi_D \eta_{Ddet}^{Dem}}} \quad (B.5)$$

$$E = \frac{I_{DA}^{corr}}{I_{DA}^{corr} + I_{DD} \frac{\phi_A \eta_{Adet}^{Aem}}{\phi_D \eta_{Ddet}^{Dem}}} = \frac{I_{DA}^{corr}}{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}}$$

Nous obtenons donc bien avec les 2 méthodes une formule identique pour le calcul de l'efficacité de FRET à celle de ZAL ET GASCOIGNE [139] et de LEE *et al.* [147].

B.2 Équivalence mathématiques des méthode de détermination de γ^M et γ^X

Pour comparer mathématiquement les deux méthodes de détermination de γ^M et γ^X , celle de COULOMB et celle de LEE, nous considérons 2 points de mesure P^1 et P^2 de valeurs d'efficacité de FRET différentes E^1 et E^2 . Chaque point de mesure est un triplet de valeurs $\{I_{DD}; I_{DA}; I_{AA}\}$, nous avons donc les points de coordonnées $\{I_{DD}^1; I_{DA}^1; I_{AA}^1\}$ et $\{I_{DD}^2; I_{DA}^2; I_{AA}^2\}$. La méthode COULOMB consiste à calculer γ^M et γ^X en déterminant les coefficients du plan qui passe par l'origine d'un repère à 3 dimensions et par les points P^1 et P^2 . L'équation de plan est de la forme $ax + by = cz$ où x , y et z sont respectivement I_{DD} , I_{DA} et I_{AA} , et les coefficients a , b et c correspondent à $\gamma^M \gamma^X$, γ^X et $\frac{S}{1-S}$. Nous considérons $S = 0.5$,

donc $c = 1$. D'après l'équation cartésienne d'un plan passant par l'origine, les coefficients valent

$$a = (I_{DA}^1 I_{AA}^2 - I_{AA}^1 I_{DA}^2) \quad (\text{B.6})$$

$$b = (I_{AA}^1 I_{DD}^2 - I_{DD}^1 I_{AA}^2) \quad (\text{B.7})$$

$$c = (I_{DD}^1 I_{DA}^2 - I_{DA}^1 I_{DD}^2) \quad (\text{B.8})$$

donc :

$$\gamma^X = \frac{b}{c} = \frac{I_{DD}^1 I_{AA}^2 - I_{DD}^2 I_{AA}^1}{I_{DA}^2 I_{DD}^1 - I_{DA}^1 I_{DD}^2} \quad (\text{B.9})$$

et

$$\gamma^M = \frac{a/c}{b/c} = \frac{I_{DA}^1 I_{AA}^2 - I_{AA}^1 I_{DA}^2}{I_{AA}^1 I_{DD}^2 - I_{DD}^1 I_{AA}^2} \quad (\text{B.10})$$

Ce sont ces 2 expressions que nous cherchons à comparer avec celles obtenues avec la méthode LEE, qui se base sur la relation $1/S = 1 + \gamma^M \gamma^X + \gamma^X (1 - \gamma^M) E$. Dans cette méthode, en déterminant l'ordonnée à l'origine $\Omega = 1 + \gamma^M \gamma^X$ et le coefficient directeur $\Sigma = \gamma^X (1 - \gamma^M)$ de $1/S$ en fonction de E , les facteurs de corrections recherchés valent :

$$\gamma^X = \Sigma + \Omega - 1 \quad (\text{B.11})$$

et

$$\gamma^M = \frac{\Omega - 1}{\Sigma + \Omega - 1} \quad (\text{B.12})$$

Avec 2 points de mesure de coordonnées $\{x_1; y_1\}$ et $\{x_2; y_2\}$, les coefficients d'une droite d'équation $y = a \times x + b$ sont donnés par

$$a = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad (\text{B.13})$$

et

$$b = y_1 - \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \times x_1 \quad (\text{B.14})$$

donc

$$\Sigma = \frac{1/S_2 - 1/S_1}{E_2 - E_1} \quad (\text{B.15})$$

et

$$\Omega = 1/S_1 - \frac{1/S_2 - 1/S_1}{E_2 - E_1} \times E_1 \quad (\text{B.16})$$

donc

$$\gamma^X = \Sigma + \Omega - 1 \quad (\text{B.17})$$

$$= 1/S_1 - \frac{1/S_2 - 1/S_1}{E_2 - E_1} E_1 + \frac{1/S_2 - 1/S_1}{E_2 - E_1} - 1 \quad (\text{B.18})$$

$$= \frac{1}{S_1} + \frac{S_2 - S_1}{E_2 - E_1} \frac{E_1 - 1}{S_2 S_1} - 1 \quad (\text{B.19})$$

$$= \frac{S_2(E_2 - E_1) + (E_1 - 1)(S_2 - S_1) - S_2 S_1(E_2 - E_1)}{S_2 S_1(E_2 - E_1)} \quad (\text{B.20})$$

$$= \frac{S_2(E_2 - 1) - S_1(E_1 - 1) - S_2 S_1(E_2 - E_1)}{S_2 S_1(E_2 - E_1)} \quad (\text{B.21})$$

En remplaçant E_1 , E_2 , S_1 et S_2 par leur expression selon les valeurs d'intensité dans chaque canal $\{I_{DD}^1; I_{DA}^1; I_{AA}^1\}$ et $\{I_{DD}^2; I_{DA}^2; I_{AA}^2\}$:

$$\gamma^X = \frac{\frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \left(\frac{I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2} - 1 \right) - \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} \left(\frac{I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1} - 1 \right) - \frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1} \frac{I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2} + \frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} \frac{I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}}{\frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} \left(\frac{I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2} - \frac{I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1} \right)}$$
 (B.22)

$$= \frac{\frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{-I_{DD}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2} - \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} \frac{-I_{DD}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}}{\frac{I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} - \frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1}} - 1$$
 (B.23)

$$= \frac{\frac{(I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2)(I_{DD}^2 + I_{DA}^2)(I_{DD}^1 + I_{DA}^1)I_{DD}^1 - (I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1)(I_{DD}^1 + I_{DA}^1)(I_{DD}^2 + I_{DA}^2)I_{DD}^2}{(I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2)(I_{DD}^2 + I_{DA}^2)(I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1)(I_{DD}^1 + I_{DA}^1)}}{\frac{I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} - \frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1}} - 1$$
 (B.24)

$$= \frac{(I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2)I_{DD}^1 - (I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1)I_{DD}^2}{(I_{DD}^1 + I_{DA}^1)I_{DA}^2 - (I_{DD}^2 + I_{DA}^2)I_{DA}^1} - 1$$
 (B.25)

$$\gamma^X = \frac{I_{DD}^1 I_{AA}^2 - I_{DD}^2 I_{AA}^1}{I_{DA}^2 I_{DD}^1 - I_{DA}^1 I_{DD}^2}$$
 (B.26)

De même, pour γ^M :

$$\gamma^M = \frac{\Omega - 1}{\Sigma + \Omega - 1}$$
 (B.27)

$$= \frac{1/S_1 - \frac{1/S_2 - 1/S_1}{E_2 - E_1} E_1 - 1}{1/S_1 - \frac{1/S_2 - 1/S_1}{E_2 - E_1} E_1 + \frac{1/S_2 - 1/S_1}{E_2 - E_1} - 1}$$
 (B.28)

$$= \frac{\frac{1}{S_1} + \frac{S_2 - S_1}{E_2 - E_1} \frac{E_1}{S_2 S_1} - 1}{\frac{1}{S_1} + \frac{S_2 - S_1}{E_2 - E_1} \frac{E_1 - 1}{S_2 S_1} - 1}$$
 (B.29)

$$= \frac{S_2 E_2 - S_1 E_1 - S_1 S_2 (E_2 - E_1)}{S_2 (E_2 - 1) - S_1 (E_1 - 1) - S_2 S_1 (E_2 - E_1)}$$
 (B.30)

En remplaçant de nouveau E_1 , E_2 , S_1 et S_2 par leur expression selon les valeurs d'intensité dans chaque canal $\{I_{DD}^1; I_{DA}^1; I_{AA}^1\}$ et $\{I_{DD}^2; I_{DA}^2; I_{AA}^2\}$:

$$\gamma^M = \frac{\frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2} - \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} \frac{I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}}{\frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} \left(\frac{I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2} - \frac{I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1} \right)} \quad (\text{B.31})$$

$$= \frac{\frac{I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} - \frac{I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1}}{\frac{I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} - \frac{I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} \frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2}} \quad (\text{B.32})$$

$$= \frac{\frac{-I_{DD}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} + \frac{I_{DD}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1}}{\frac{I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2} \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} + \frac{I_{DA}^1}{I_{DD}^1 + I_{DA}^1 + I_{AA}^1} \frac{I_{DD}^2 + I_{DA}^2}{I_{DD}^2 + I_{DA}^2 + I_{AA}^2}} \quad (\text{B.33})$$

$$\gamma^M = \frac{I_{DA}^1 I_{AA}^2 - I_{AA}^1 I_{DA}^2}{I_{AA}^1 I_{DD}^2 - I_{DD}^1 I_{AA}^2} \quad (\text{B.34})$$

Nous obtenons donc pour les 2 méthodes des expressions identiques de γ^M et γ^X en fonction des points de mesure.

CHEN *et al.* [153] proposent de calculer γ^M (noté G dans la publication) en utilisant 2 constructions de paire donneur/accepteur d'efficacités de fret très différentes (dans leur publication : C5V et CTV). Alors γ^M est calculé selon :

$$\gamma^M = \frac{I_{DA}^1/I_{AA}^1 - I_{DA}^2/I_{AA}^2}{I_{DD}^2/I_{AA}^2 - I_{DD}^1/I_{AA}^1} \quad (\text{B.35})$$

L'équivalence avec l'expression (B.9) est directement observable. Dans le cas de γ^X , il faut prêter attention au facteur k de la publication. Dans cette dernière, la stœchiométrie est définie comme :

$$[D]/[A] = \frac{I_{DD} + I_{DA}/G}{I_{AA}k} \quad (\text{B.36})$$

C'est-à-dire que $k \leftrightarrow 1/(\gamma^M \gamma^X)$ avec nos notations. Une fois le facteur G connu, le signal de cellules produisant une construction portant un donneur et un accepteur permet de déterminer leur facteur k selon :

$$k = \frac{I_{DD} + I_{DA}/G}{I_{AA}} \quad (\text{B.37})$$

Si on traduit cette expression en fonction des coordonnées du point de mesure P_1 :

$$k = \frac{I_{DD}^1 + I_{DA}^1}{\frac{I_{DA}^1 I_{AA}^2 - I_{DA}^2 I_{AA}^1}{I_{AA}^1 I_{DD}^2 - I_{AA}^2 I_{DD}^1}} \quad (\text{B.38})$$

$$= \frac{I_{DD}^1 I_{DA}^1 I_{AA}^2 - I_{DD}^1 I_{AA}^1 I_{DA}^2 + I_{DA}^1 I_{AA}^1 I_{DD}^2 - I_{DA}^1 I_{AA}^2 I_{DD}^1}{I_{AA}^1 I_{DA}^1 I_{AA}^2 - I_{AA}^1 I_{AA}^1 I_{DA}^2} \quad (\text{B.39})$$

$$= \frac{I_{DA}^1 I_{DD}^2 - I_{DA}^2 I_{DD}^1}{I_{DA}^1 I_{AA}^2 - I_{DA}^2 I_{AA}^1} \quad (\text{B.40})$$

De notre côté, en utilisant les expressions (B.9) et (B.10) de nos γ^M et γ^X :

$$\frac{1}{\gamma^M \gamma^X} = \frac{1}{\frac{I_{DD}^1 I_{AA}^2 - I_{DD}^2 I_{AA}^1}{I_{DD}^1 I_{DA}^2 - I_{DD}^2 I_{DA}^1} \frac{I_{DA}^1 I_{AA}^2 - I_{DA}^2 I_{AA}^1}{I_{AA}^1 I_{DD}^2 - I_{AA}^2 I_{DD}^1}} \quad (\text{B.41})$$

$$= \frac{(I_{DD}^1 I_{DA}^2 - I_{DD}^2 I_{DA}^1)(I_{AA}^1 I_{DD}^2 - I_{AA}^2 I_{DD}^1)}{(I_{DD}^1 I_{AA}^2 - I_{DD}^2 I_{AA}^1)(I_{DA}^1 I_{AA}^2 - I_{DA}^2 I_{AA}^1)} \quad (\text{B.42})$$

$$\frac{1}{\gamma^M \gamma^X} = \frac{I_{DA}^1 I_{DD}^2 - I_{DA}^2 I_{DD}^1}{I_{DA}^1 I_{AA}^2 - I_{DA}^2 I_{AA}^1} = k \quad (\text{B.43})$$

Les 3 méthodes, de CHEN , LEE et COULLOMB sont donc équivalentes mathématiquement. Seule leur implémentation pratique, et les conséquences en terme de calculs (robustesse, sensibilité aux valeurs extrêmes, ...) diffèrent.

B.3 Incertitudes de mesure sur E et méthodes alternatives de calcul de E

Calcul des incertitudes sur E

Nous souhaitons calculer l'incertitude σ_E^2 de E pour les méthodes COULLOMB et LEE. Pour ces deux méthodes E est calculé selon :

$$E = \frac{I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA}}{I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD}} \quad (\text{B.44})$$

L'incertitude σ_E^2 de E vaut elle :

$$\begin{aligned} \sigma_E^2 = & \left(\frac{\partial E}{\partial I_{DD}} \right)^2 \sigma_{I_{DD}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial I_{DA}} \right)^2 \sigma_{I_{DA}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial I_{AA}} \right)^2 \sigma_{I_{AA}}^2 + \\ & \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^{BT}} \right)^2 \sigma_{\gamma^{BT}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^{DE}} \right)^2 \sigma_{\gamma^{DE}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^M} \right)^2 \sigma_{\gamma^M}^2 \end{aligned} \quad (\text{B.45})$$

avec

$$\frac{\partial E}{\partial I_{DD}} = \frac{\gamma^M (\gamma^{DE} I_{AA} - I_{DA})}{(I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD})^2} \quad (\text{B.46})$$

$$\frac{\partial E}{\partial I_{DA}} = \frac{\gamma^M I_{DD}}{(I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD})^2} \quad (\text{B.47})$$

$$\frac{\partial E}{\partial I_{AA}} = \frac{\gamma^M \gamma^{DE} I_{DD}}{(I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD})^2} \quad (\text{B.48})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^{BT}} = \frac{\gamma^M I_{DD}^2}{(I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD})^2} \quad (\text{B.49})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^{DE}} = \frac{\gamma^M I_{DD} I_{AA}}{(I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD})^2} \quad (\text{B.50})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^M} = \frac{(I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA}) I_{DD}}{(I_{DA} - \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD})^2} \quad (\text{B.51})$$

Les valeurs $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ sont directement mesurées, les valeurs $\{\gamma^{BT}, \gamma^{DE}, \gamma^M, \gamma^X\}$ sont elles calculées selon les procédures décrites p.77 et p.82, reste à déterminer $\{\sigma_{I_{DD}}^2, \sigma_{I_{DA}}^2, \sigma_{I_{AA}}^2, \sigma_{\gamma^{BT}}^2, \sigma_{\gamma^{DE}}^2, \sigma_{\gamma^M}^2, \sigma_{\gamma^X}^2\}$:

L'incertitude sur les mesures d'intensité de fluorescence est plus délicate à déterminer. Idéalement nous la calculerions selon les caractéristiques de mesure d'un signal lumineux par la caméra (biais, variance due aux bruit électronique . . .), mais cette méthode est difficile à mettre en place et la plus grande partie de l'incertitude sur l'intensité réelle de fluorescence vient du processus de soustraction du fond. En effet nous décidons d'enlever une même valeur à toutes les images pour un canal donné, alors que même en absence de fluorophore les valeurs des intensités mesurées sont distribuée autour d'une valeur spécifique à chaque canal (figure B.1).

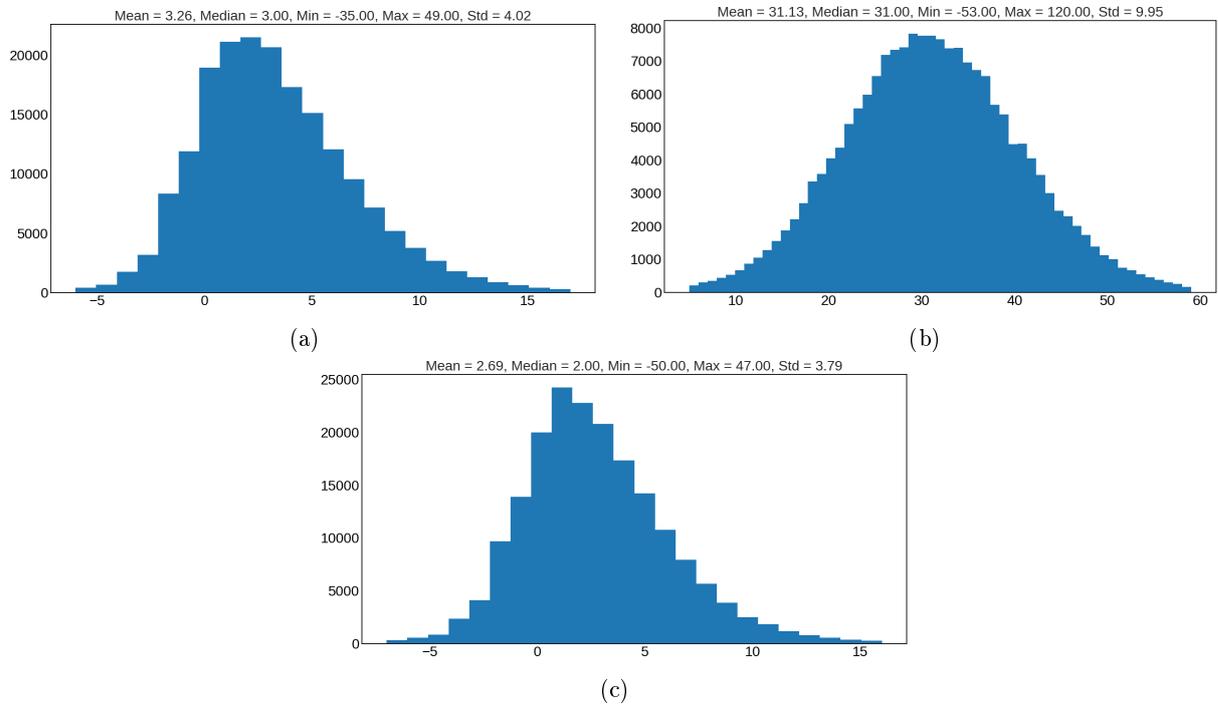


FIGURE B.1 – Histogramme des intensités dans une zone de fond (en dehors d'une cellule) pour les canaux I_{DD} (a), I_{DA} (b) et I_{AA} (c)

Nous utilisons donc l'écart-type de chaque distribution pour estimer l'incertitude de mesure d'intensité dans le canal correspondant :

$$\Delta\sigma_{I_{DD}} = 2.58\sigma_{I_{DD}} \approx 10.37 \quad (\text{B.52})$$

$$\Delta\sigma_{I_{DA}} = 2.58\sigma_{I_{DA}} \approx 25.67 \quad (\text{B.53})$$

$$\Delta\sigma_{I_{AA}} = 2.58\sigma_{I_{AA}} \approx 9.77 \quad (\text{B.54})$$

En ce qui concerne les incertitudes sur γ^{BT} et γ^{DE} , nous utilisons l'erreur type de la moyenne $s_{\bar{x}}$ des γ^{BT} et γ^{DE} obtenus pour les différentes cellules p.77 et p.78. L'écart type des facteurs est alors calculé selon

$$\sigma_{\gamma^{BT}} = \sqrt{\bar{n}s_{\bar{x}}} = 0.002 \quad (\text{B.55})$$

$$\sigma_{\gamma^{DE}} = \sqrt{\bar{n}s_{\bar{x}}} = 0.002 \quad (\text{B.56})$$

et les incertitudes valent

$$\Delta\sigma_{\gamma^{BT}} = 2.58\sigma_{\gamma^{BT}} \approx 0.005 \quad (\text{B.57})$$

$$\Delta\sigma_{\gamma^{DE}} = 2.58\sigma_{\gamma^{DE}} \approx 0.005 \quad (\text{B.58})$$

Enfin, l'incertitude sur γ^M et γ^X est calculée à partir des incertitudes des coefficients de la régression linéaire simple pour la méthode LEE et de la régression linéaire multiple pour la méthode COULLOMB. Pour obtenir l'incertitude sur les coefficients de régression nous utilisons la librairie python *statsmodels*.

Dans la méthode COULLOMB, nous réalisons la régression $aI_{DD} + bI_{DA} =$, puis nous obtenons $\gamma^X = b$ et $\gamma^M = a/b$. L'incertitude sur γ^X nous est donc directement donnée suite à la régression :

$$\sigma_{\gamma^X} = \sigma_b \approx 0 \quad (\text{B.59})$$

$$\Delta\gamma^X = 2.58 \sigma_{\gamma^X} \approx 0 \quad (\text{B.60})$$

et l'incertitude sur γ^M est calculée selon

$$\sigma_{\gamma^M} = \sqrt{\frac{\sigma_a^2}{b^2} + \frac{a^2}{b^2} \sigma_b^2} \approx 8.10^{-4} \quad (\text{B.61})$$

$$\Delta\gamma^M = 2.58 \sigma_{\gamma^M} \approx 2.10^{-3} \quad (\text{B.62})$$

Dans la méthode LEE, nous réalisons la régression $1/S = \Omega + \Sigma E$, puis nous obtenons γ^X et γ^M selon :

$$\gamma^X = \Sigma + \Omega - 1 \quad (\text{B.63})$$

$$\gamma^M = \frac{\Omega - 1}{\Sigma + \Omega - 1} \quad (\text{B.64})$$

$$\sigma_{\gamma^X} = \sqrt{\sigma_{\Sigma}^2 + \sigma_{\Omega}^2} \approx 4.10^{-3} \quad (\text{B.65})$$

$$\Delta\gamma^X = 2.58 \sigma_{\gamma^X} \approx 1.10^{-2} \quad (\text{B.66})$$

$$\sigma_{\gamma^M} = \frac{1}{(\Sigma + \Omega - 1)^2} \sqrt{(\Omega - 1)^2 \sigma_{\Sigma}^2 + (\Sigma + 2\Omega - 2)^2 \sigma_{\Omega}^2} \approx 8.10^{-3} \quad (\text{B.67})$$

$$\Delta\gamma^M = 2.58 \sigma_{\gamma^M} \approx 2.10^{-2} \quad (\text{B.68})$$

En examinant attentivement l'ajustement de courbe figure B.2b, on observe que la droite ajustée modélise pauvrement les données car $1/S$ semble ne pas dépendre tout à fait linéairement de E . Cela se traduit par un coefficient de détermination plus faible que celui de l'ajustement dans la méthode COULLOMB (tableau B.1), ainsi que par une incertitude plus élevée pour γ^M et γ^X .

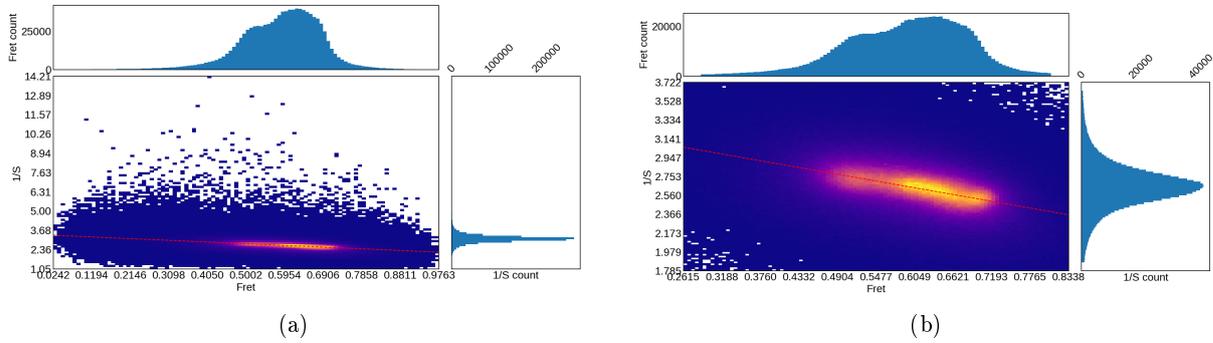


FIGURE B.2 – Histogramme de $1/S$ en fonction de E et ajustement de droite pour la méthode LEE. (a) vue de toutes les données. (b) zoom sur l'ajustement de droite.

Lors de la régression linéaire il est possible de donner plus de poids aux pixels de plus haute intensité, puisqu'une incertitude de mesure fixe sera moins importante relativement à leur valeur d'intensité que pour les pixels de plus faible intensité. Les incertitudes avec la méthode LEE (tableau B.1) sont alors réduite d'un facteur 2, mais restent un ordre de grandeur au dessus de celles de la méthode COULLOMB.

Méthode	LEE	COULLOMB	LEE pondéré	COULLOMB pondéré
R_{adj}^2	0.154	0.998	0.301	0.999
$\Delta\gamma^M$	2.10^{-2}	2.10^{-3}	1.10^{-2}	2.10^{-3}
$\Delta\gamma^X$	1.10^{-2}	≈ 0	5.10^{-3}	≈ 0

TABLE B.1 – Incertitudes sur γ^M et γ^X pour les méthodes LEE et COULLOMB

Comme l'incertitude dépend de l'intensité mesurée, il est possible de réaliser des cartes d'incertitude, où l'incertitude est estimée selon le signal dans les 3 canaux de chaque pixel. Sur les cartes d'incertitudes (figures B.3(a,b)) nous remarquons que l'incertitude sur E décroît avec le niveau de signal mesuré qui est plus important au centre des cellules qu'en bordure. Pour les 2 méthodes les incertitudes sont faibles, de l'ordre de 0.05% comparé à des efficacités de FRET de l'ordre de 50%, et la différence entre les méthodes est extrêmement faible. Sur la figure B.3(c) est tracé l'historgramme des différences d'incertitudes entre les 2 méthodes $\sigma_{coulomb} - \sigma_{lee}$, multipliée par un facteur 1000. L'historgramme est asymétrique avec une lourde queue à gauche, c'est-à-dire que les incertitudes calculées avec les facteurs γ^M et γ^X selon la méthode COULLOMB sont plus faibles qu'avec la méthode LEE. Cependant la différence relative est très faible, de l'ordre de 5%.

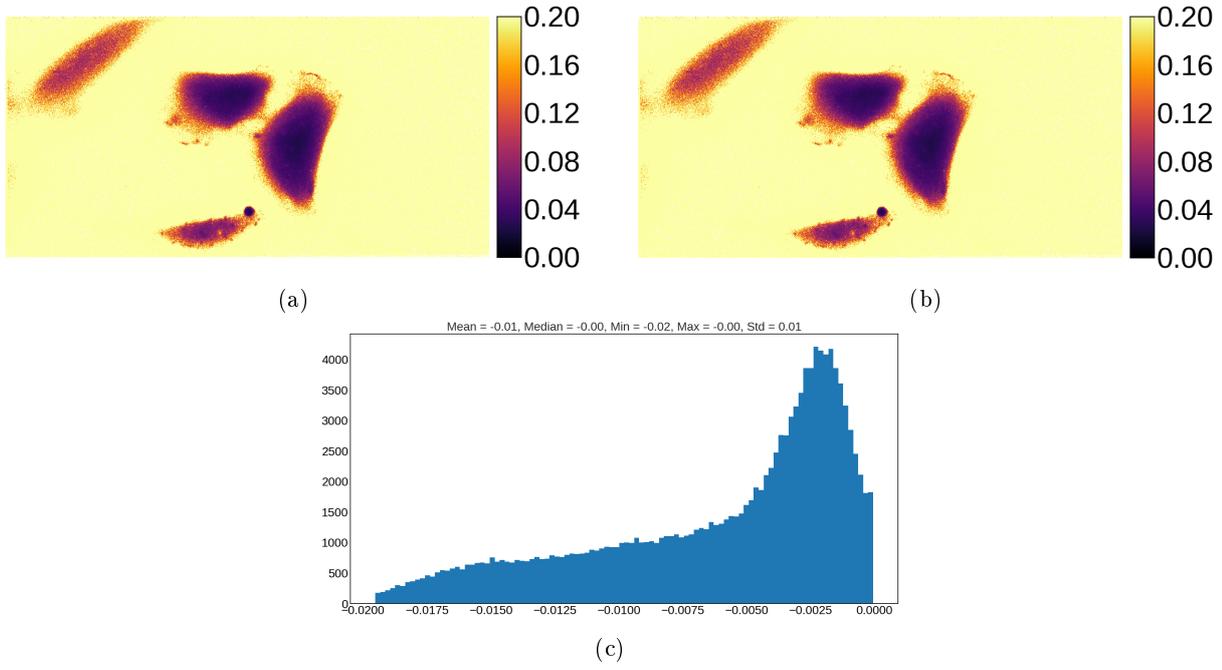


FIGURE B.3 – Cartes d’incertitudes sur E avec la méthode COULLOMB (a) et LEE (b). (c) Histogramme de la différence augmentée des incertitudes $(\sigma_{coullomb} - \sigma_{lee}) * 1000$

Il est aussi possible de mesurer E en se passant d’un des 3 canaux et en maintenant une hypothèse sur la valeur de S :

E sans I_{DD}

Équation de la stœchiométrie :

$$\gamma^X \gamma^M I_{DD} + \gamma^X I_{DA} - \gamma^X \gamma^{BT} I_{DD} - \gamma^{DE} \gamma^X I_{AA} = I_{AA} \frac{S}{1-S} \quad (\text{B.69})$$

$$(\text{B.69}) \Leftrightarrow I_{DD} = \frac{1}{\gamma^M - \gamma^{BT}} \left[I_{AA} \left(\gamma^{DE} + \frac{1}{\gamma^X} \frac{S}{1-S} \right) - I_{DA} \right] \quad (\text{B.70})$$

en remplaçant dans (B.44) :

$$E_{\circlearrowleft I_{DD}} = \gamma^X \gamma^M \frac{I_{DA}}{I_{AA}} - \gamma^{BT} \quad (\text{B.71})$$

$$\begin{aligned} \sigma_{E_{\circlearrowleft I_{DD}}}^2 = & \left(\frac{\partial E}{\partial I_{DA}} \right)^2 \sigma_{I_{DA}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial I_{AA}} \right)^2 \sigma_{I_{AA}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^{BT}} \right)^2 \sigma_{\gamma^{BT}}^2 + \\ & \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^X} \right)^2 \sigma_{\gamma^X}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^M} \right)^2 \sigma_{\gamma^M}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial S} \right)^2 \sigma_S^2 \end{aligned} \quad (\text{B.72})$$

$$\frac{\partial E}{\partial I_{DA}} = \frac{\gamma^X \gamma^M}{I_{AA}} \frac{1-S}{S} \quad (\text{B.73})$$

$$\frac{\partial E}{\partial I_{AA}} = -\gamma^X \gamma^M \frac{I_{DA}}{I_{AA}^2} \frac{1-S}{S} \quad (\text{B.74})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^{BT}} = -1 \quad (\text{B.75})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^X} = \gamma^M \frac{I_{DA}}{I_{AA}} \frac{1-S}{S} \quad (\text{B.76})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^M} = \gamma^X \frac{I_{DA}}{I_{AA}} \frac{1-S}{S} \quad (\text{B.77})$$

$$\frac{\partial E}{\partial S} = -\frac{I_{DA}}{I_{AA}} \frac{\gamma^X \gamma^M}{S^2} \quad (\text{B.78})$$

E sans I_{DA}

$$(\text{B.69}) \Leftrightarrow I_{DA} = I_{AA} \left(\frac{1}{\gamma^X} \frac{S}{1-S} + \gamma^{DE} \right) + I_{DD} (\gamma^{BT} - \gamma^M) \quad (\text{B.79})$$

en remplaçant dans (B.44) :

$$E_{\circlearrowleft I_{DA}} = 1 - \gamma^X \gamma^M \frac{I_{DD}}{I_{AA}} \frac{1-S}{S} \quad (\text{B.80})$$

$$\sigma_{E_{\circlearrowleft I_{DA}}}^2 = \left(\frac{\partial E}{\partial I_{DD}} \right)^2 \sigma_{I_{DD}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial I_{AA}} \right)^2 \sigma_{I_{AA}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^X} \right)^2 \sigma_{\gamma^X}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^M} \right)^2 \sigma_{\gamma^M}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial S} \right)^2 \sigma_S^2 \quad (\text{B.81})$$

$$\frac{\partial E}{\partial I_{DD}} = -\frac{\gamma^X \gamma^M}{I_{AA}} \frac{1-S}{S} \quad (\text{B.82})$$

$$\frac{\partial E}{\partial I_{AA}} = \gamma^X \gamma^M \frac{I_{DD}}{I_{AA}^2} \frac{1-S}{S} \quad (\text{B.83})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^X} = -\gamma^M \frac{I_{DD}}{I_{AA}} \frac{1-S}{S} \quad (\text{B.84})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^M} = -\gamma^X \frac{I_{DD}}{I_{AA}} \frac{1-S}{S} \quad (\text{B.85})$$

$$\frac{\partial E}{\partial S} = \frac{I_{DD}}{I_{AA}} \frac{\gamma^X \gamma^M}{S^2} \quad (\text{B.86})$$

E sans I_{AA}

$$(\text{B.69}) \Leftrightarrow I_{AA} = \frac{\gamma^X \gamma^M I_{DD} + \gamma^X I_{DA} - \gamma^X \gamma^{BT} I_{DD}}{\frac{S}{1-S} + \gamma^X \gamma^{DE}} \quad (\text{B.87})$$

en remplaçant dans (B.44) :

$$E_{\circlearrowleft I_{AA}} = \frac{I_{DA} - I_{DD} \left(\gamma^{BT} + \gamma^M \gamma^X \gamma^{DE} \frac{1-S}{S} \right)}{I_{DA} - I_{DD} (\gamma^{BT} - \gamma^M)} \quad (\text{B.88})$$

$$\begin{aligned} \sigma_{E_{\circlearrowleft I_{AA}}}^2 = & \left(\frac{\partial E}{\partial I_{DD}} \right)^2 \sigma_{I_{DD}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial I_{DA}} \right)^2 \sigma_{I_{DA}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^{BT}} \right)^2 \sigma_{\gamma^{BT}}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^{DE}} \right)^2 \sigma_{\gamma^{DE}}^2 + \\ & \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^X} \right)^2 \sigma_{\gamma^X}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial \gamma^M} \right)^2 \sigma_{\gamma^M}^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial S} \right)^2 \sigma_S^2 \end{aligned} \quad (\text{B.89})$$

$$\frac{\partial E}{\partial I_{DA}} = \frac{\gamma^M I_{DD} (1 + \gamma^X \gamma^M \frac{1-S}{S})}{(I_{DA} - I_{DD}(\gamma^{BT} - \gamma^M))^2} \quad (\text{B.90})$$

$$\frac{\partial E}{\partial I_{DD}} = -\frac{\gamma^M I_{DA} (1 + \gamma^X \gamma^{DE} \frac{1-S}{S})}{(I_{DA} - I_{DD}(\gamma^{BT} - \gamma^M))^2} \quad (\text{B.91})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^{BT}} = -\frac{\gamma^M I_{DD}^2 (1 + \gamma^X \gamma^M \gamma^{DE} \frac{1-S}{S})}{(I_{DA} - I_{DD}(\gamma^{BT} - \gamma^M))^2} \quad (\text{B.92})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^{DE}} = -\frac{I_{DD} \gamma^X \gamma^M \frac{1-S}{S}}{I_{DA} - I_{DD}(\gamma^{BT} - \gamma^M)} \quad (\text{B.93})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^X} = -\frac{I_{DD} \gamma^{DE} \gamma^M \frac{1-S}{S}}{I_{DA} - I_{DD}(\gamma^{BT} - \gamma^M)} \quad (\text{B.94})$$

$$\frac{\partial E}{\partial \gamma^M} = \frac{I_{DD}(\gamma^{BT} I_{DD} - I_{DA}) (1 + \gamma^X \gamma^{DE} \frac{1-S}{S})}{(I_{DA} - I_{DD}(\gamma^{BT} - \gamma^M))^2} \quad (\text{B.95})$$

$$\frac{\partial E}{\partial S} = -\frac{1}{S^2} \frac{\gamma^X \gamma^M \gamma^{DE}}{I_{DA} - I_{DD}(\gamma^{BT} - \gamma^M)} \quad (\text{B.96})$$

Annexe C

Propriétés des fluorophores et caractéristiques du montage expérimental

C.1 Propriétés des fluorophores et spectres des filtres

Protéine	Maximum d'excitation (nm)	Maximum d'émission (nm)	Coefficient d'extinction molaire	Rendement quantique	Structure in vivo	Brillance relative (% d'EGFP)
Cerulean	433	475	43,000	0.62	Monomer (Weak Dimer)	79
Venus	515	528	92,200	0.57	Monomer (Weak Dimer)	156

TABLE C.1 – Propriétés photo-physiques de Cerulean et Venus, d'après [165].

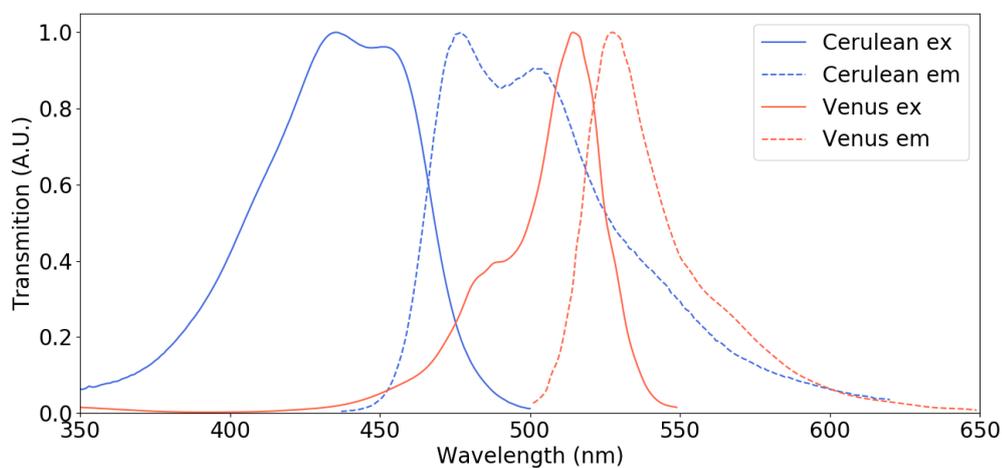


FIGURE C.1 – Spectres des fluorophores Cerulean et Venus

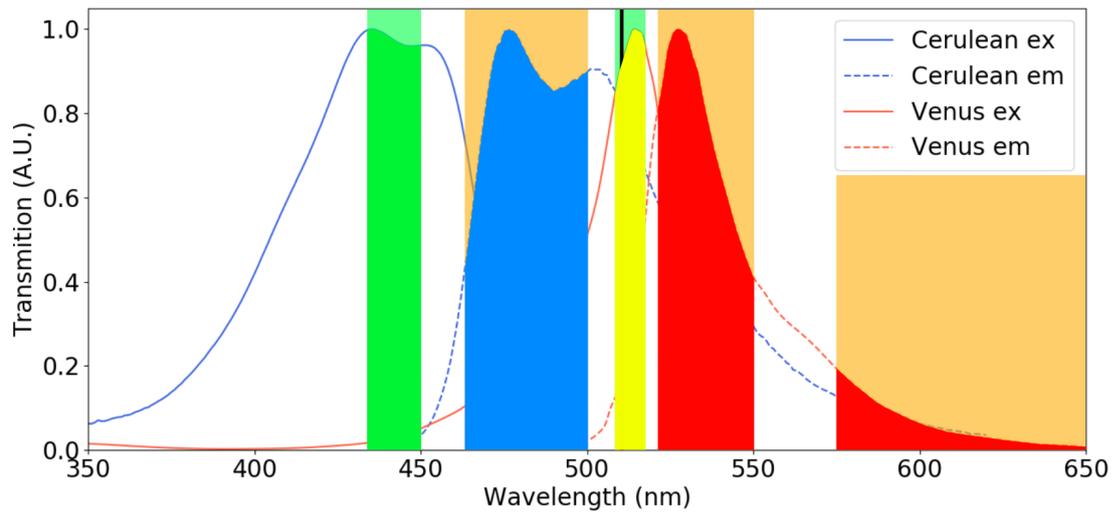


FIGURE C.2 – Spectres des fluorophores Cerulean et Venus ainsi que des plages effectives d'excitation et d'émission. Vert : plage d'excitation dans le canal Donneur. Bleu : plage d'émission dans le canal Donneur. Jane : plage d'excitation dans le canal Accepteur. Rouge : plage d'émission dans le canal Accepteur.

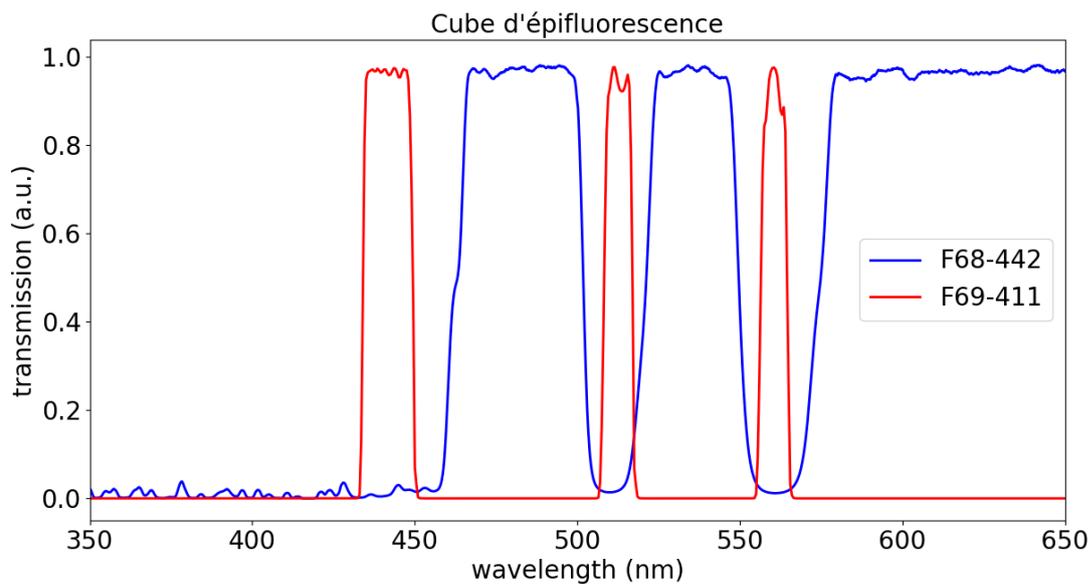


FIGURE C.3 – Spectre des filtres du cube de fluorescence :
 F69-411 ; Triple Line Laser Clean-up ZET : 442/514/561
 F68-442 ; BrightLine Triple Laser BS : 442/514/561

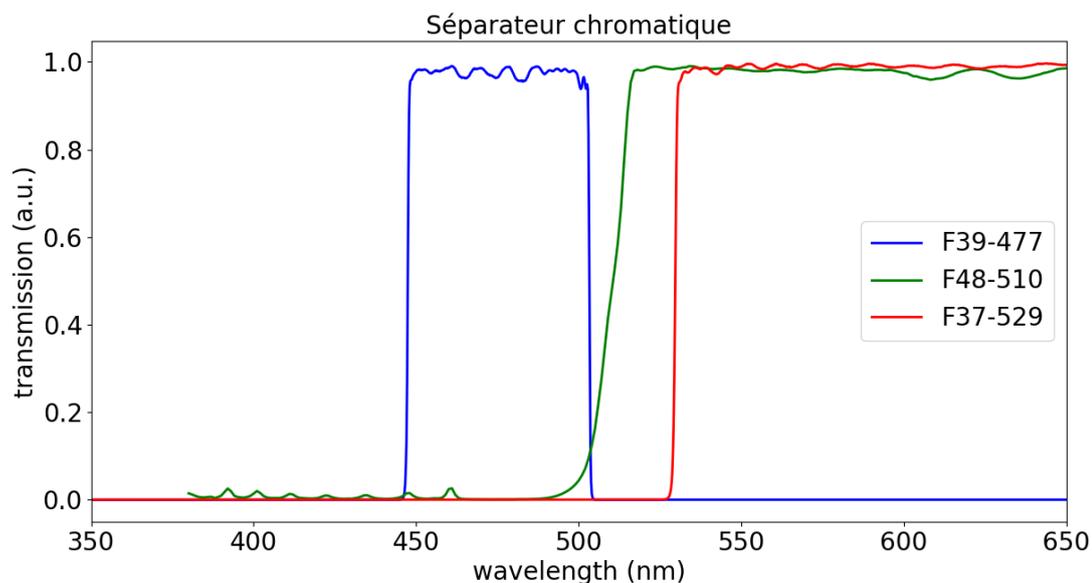


FIGURE C.4 – Spectre des filtres du séparateur chromatique 510 :
F39-477 ; 475/50 BrightLine HC Filter : 440-500BP
F48-510 ; Beamsplitter T510LPXRXT : 510LP
F37-529 ; 529/LP BrightLine HC Filter : 529LP

C.2 Caractéristiques de la caméra et du laser

Caractéristiques de la caméra

La caméra utilisée est une Orca Flash-4.0 v2. Les informations suivantes proviennent du manuel d'instructions "Digital Camera C11440-22CU/C11440-22CU01 Instruction manual Ver.1.3 February 2014" du constructeur Hamamatsu.

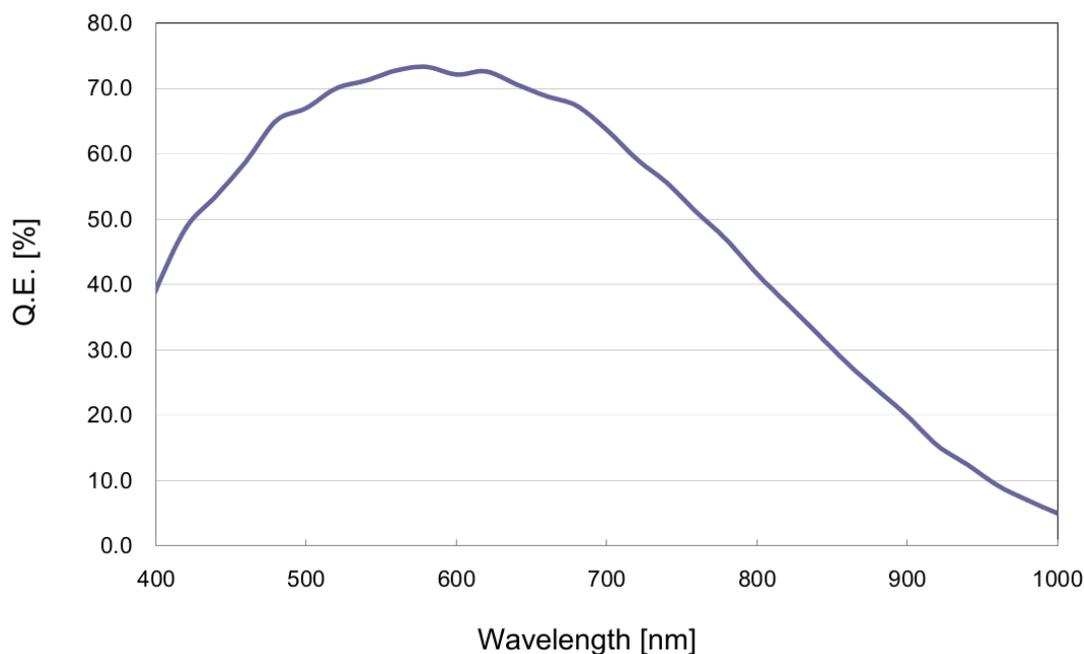


FIGURE C.5 – Réponse spectrale de la caméra

		Camera Link	USB 3.0
Imaging device		Scientific CMOS image sensor FL-400	
Effective number of pixels		2048 (H) × 2048 (V)	
Cell size		6.5 μm (H) × 6.5 μm (V)	
Effective area		13.312 mm (H) × 13.312 mm (V)	
Full well capacity (typ.)		30 000 electrons	
Readout noise (typ.)		1.3 electrons (median) 1.9 electrons (r.m.s) at standard scan 0.9 electrons (median) 1.5 electrons (r.m.s) at slow scan	
Dynamic range * ¹		33 000 : 1	
Cooling method		Peltier device + Forced air-cooled, Water-cooled	
Cooling temperature	at Forced air-cooled	- 10 °C (Ambient temperature: + 20 °C)	
	at Water-cooled	- 20 °C (Water temperature: + 20 °C)	
	at Maximum cooling	- 30 °C (typ.) (at Water-cooled; Water temp. 15 °C, Ambient temp. 20 °C)	
Frame rate Top: standard scan Bottom: slow scan	at Full resolution	100 frame/s 30 frame/s	30 frame/s
	at 1024 lines at center position	200 frame/s 60 frame/s	60 frame/s
	at 8 lines at center position	25 655 frame/s 7 696 frame/s	7894 frame/s
	at Horizontal 512 pixels at 8 lines at center position	—	25 655 frame/s
Readout mode	Normal readout mode	1×1	
	Binning readout mode	2×2,4×4 (Digital binning) * ²	
	Sub-array readout mode	Upper and lower symmetric area	Configurable for each vertical 8 pixels and horizontal 512 pixels.
Light sheet mode	Readout time	20 ms to 204.8 s	—
	Exposure time	9.7 μs to 10 s	—
	Readout mode	Full/Sub-array	—
Dark current	at - 10 °C	0.06 electron/pixel/s	
	at - 20 °C	0.02 electron/pixel/s	
	at - 30 °C	0.006 electron/pixel/s	
A/D bit		16 bit	
Linearity		Less than 3 %	
Exposure time (Standard scan)	Free running mode	1 ms to 10 s	
	Free running mode / Sub-array mode	38.96 μs to 10 s	
	External trigger mode	1 ms to 10 s	

FIGURE C.6 – Spécifications électroniques de la caméra

Caractéristiques du laser

Le laser employé est un Fianium WhiteLase™ SC450-8, l'AOTF provient du même constructeur. Les mesures de puissance délivrée ont été effectuées au moyen d'un puissance mètre dont le capteur était placé au niveau de l'objectif du microscope.

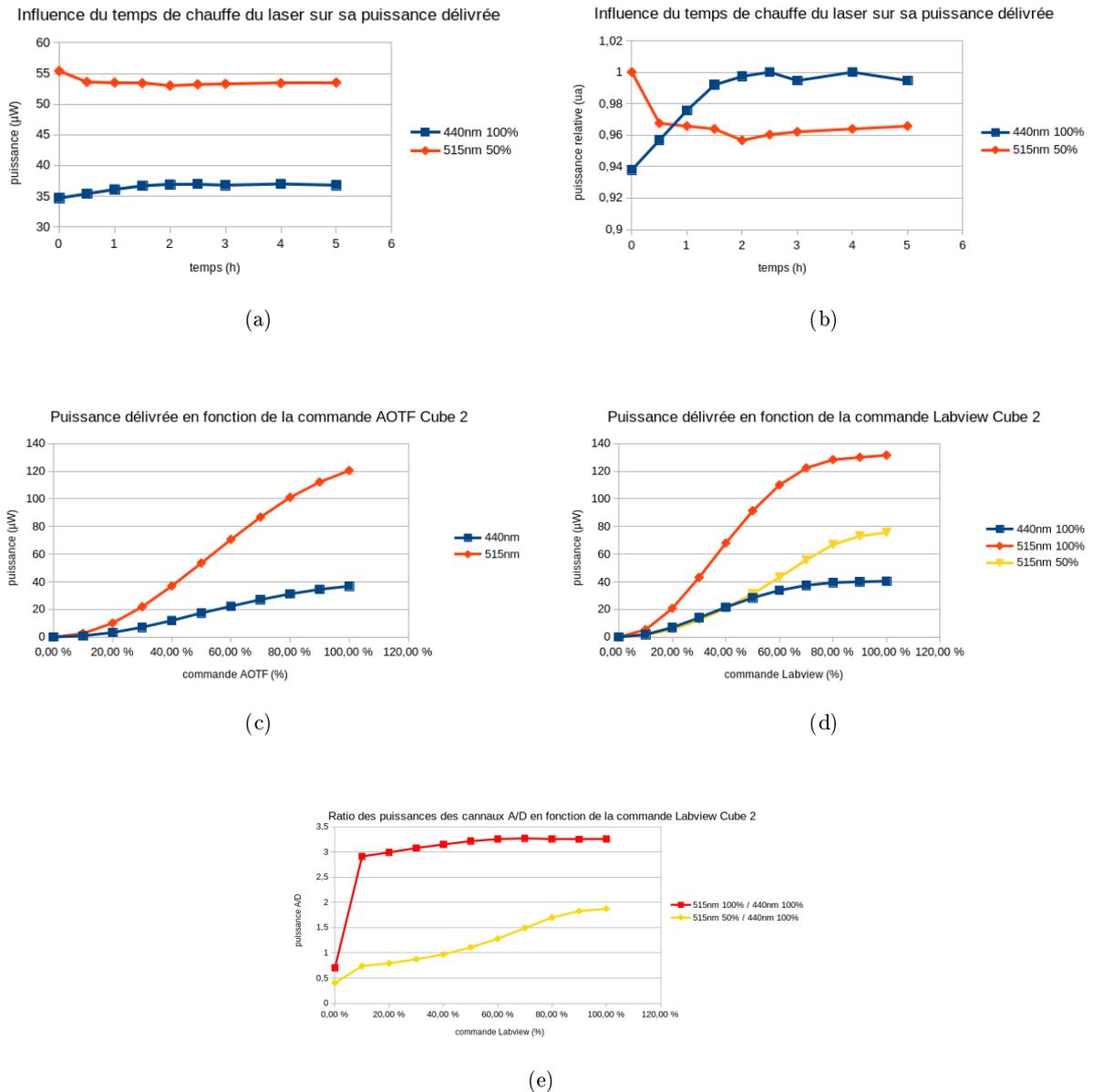


FIGURE C.7 – Puissance du laser pour les longueurs d’onde d’excitation et d’émission selon le temps de chauffe (a & b), selon la commande AOTF (c) et selon la commande Labview (d). Ratio des puissances entre les deux canaux selon la commande Labview pour 2 niveaux de commande AOTF (e).

Bibliographie

- [1] Chun-Min Lo, Hong-Bei Wang, Micah Dembo, and Yu-li Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*, 79(1) :144–152, 2000.
- [2] Adam J Engler, Shamik Sen, H Lee Sweeney, and Dennis E Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4) :677–689, 2006.
- [3] Sami Alom Ruiz and Christopher S Chen. Emergence of patterned stem cell differentiation within multicellular structures. *Stem cells*, 26(11) :2921–2927, 2008.
- [4] Claire M Wells and Maddy Parsons. *Cell migration : developmental methods and protocols*. Springer, 2011.
- [5] Marie-Pierre Valignat, Olivier Theodoly, Alexia Gucciardi, Nancy Hogg, and Annemarie C Lellouch. T lymphocytes orient against the direction of fluid flow during lfa-1-mediated migration. *Biophysical journal*, 104(2) :322–331, 2013.
- [6] Maggie A Ostrowski, Ngan F Huang, Travis W Walker, Tom Verwijlen, Charlotte Poplawski, Amanda S Khoo, John P Cooke, Gerald G Fuller, and Alexander R Dunn. Microvascular endothelial cells migrate upstream and align against the shear stress field created by impinging flow. *Biophysical journal*, 106(2) :366–374, 2014.
- [7] Boris Martinac. Mechanosensitive ion channels : molecules of mechanotransduction. *Journal of cell science*, 117(12) :2449–2460, 2004.
- [8] Bertrand Coste, Jayanti Mathur, Manuela Schmidt, Taryn J Earley, Sanjeev Ranade, Matt J Petrus, Adrienne E Dubin, and Ardem Patapoutian. Piezo1 and piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, 330(6000) :55–60, 2010.
- [9] Bifeng Pan, Gwenaëlle S Géléoc, Yukako Asai, Geoffrey C Horwitz, Kiyoto Kurima, Kotaro Ishikawa, Yoshiyuki Kawashima, Andrew J Griffith, and Jeffrey R Holt. Tmc1 and tmc2 are components of the mechanotransduction channel in hair cells of the mammalian inner ear. *Neuron*, 79(3) :504–515, 2013.
- [10] John M Tarbell and MY Pahakis. Mechanotransduction and the glycocalyx. *Journal of internal medicine*, 259(4) :339–350, 2006.
- [11] John M Tarbell and Eno E Ebong. The endothelial glycocalyx : a mechano-sensor and-transducer. *Science signaling*, 1(40) :pt8–pt8, 2008.
- [12] Veena Singla and Jeremy F Reiter. The primary cilium as the cell’s antenna : signaling at a sensory organelle. *science*, 313(5787) :629–633, 2006.
- [13] Nicolas F Berbari, Amber K O’Connor, Courtney J Haycraft, and Bradley K Yoder. The primary cilium as a complex signaling center. *Current biology*, 19(13) :R526–R535, 2009.
- [14] David A Hoey, Shane Tormey, Stacy Ramcharan, Fergal J O’Brien, and Christopher R Jacobs. Primary cilia-mediated mechanotransduction in human mesenchymal stem cells. *Stem cells*, 30(11) :2561–2570, 2012.

- [15] Muhammad H Zaman, Linda M Trapani, Alisha L Sieminski, Drew MacKellar, Haiyan Gong, Roger D Kamm, Alan Wells, Douglas A Lauffenburger, and Paul Matsudaira. Migration of tumor cells in 3d matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29) :10889–10894, 2006.
- [16] Theresa A Ulrich, Elena M de Juan Pardo, and Sanjay Kumar. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer research*, 69(10) :4167–4174, 2009.
- [17] Xiaoyue Ma, Maureen E Schickel, Mark D Stevenson, Alisha L Sarang-Sieminski, Keith J Gooch, Samir N Ghadiali, and Richard T Hart. Fibers in the extracellular matrix enable long-range stress transmission between cells. *Biophysical journal*, 104(7) :1410–1418, 2013.
- [18] Ido Nitsan, Stavit Drori, Yair E Lewis, Shlomi Cohen, and Shelly Tzlil. Mechanical communication in cardiac cell synchronized beating. *Nature Physics*, 12(5) :472–477, 2016.
- [19] Katharina Austen, Pia Ringer, Alexander Mehlich, Anna Chrostek-Grashoff, Carleen Kluger, Christoph Klingner, Benedikt Sabass, Roy Zent, Matthias Rief, and Carsten Grashoff. Extracellular rigidity sensing by talin isoform-specific mechanical linkages. *Nature cell biology*, 17(12) :1597, 2015.
- [20] Iain D Campbell and Mark H Ginsberg. The talin–tail interaction places integrin activation on firm ground. *Trends in biochemical sciences*, 29(8) :429–435, 2004.
- [21] Wolfgang H Ziegler, Robert C Liddington, and David R Critchley. The structure and regulation of vinculin. *Trends in cell biology*, 16(9) :453–460, 2006.
- [22] J Thomas Parsons, Alan Rick Horwitz, and Martin A Schwartz. Cell adhesion : integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9) :633, 2010.
- [23] Christopher E Turner. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature cell biology*, 2(12) :E231, 2000.
- [24] Tracee S Panetti. Tyrosine phosphorylation of paxillin, fak, and p130cas : effects on cell spreading and migration. *Front Biosci*, 7(January) :d143–d150, 2002.
- [25] Martin Rühl, Manfred Johannsen, Jane Atkinson, Dirk Manski, Ergün Sahin, Rajan Somasundaram, Ernst Otto Riecken, and Detlef Schuppan. Soluble collagen vi induces tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase and activates the map kinase erk2 in fibroblasts. *Experimental cell research*, 250(2) :548–557, 1999.
- [26] Rony Seger and Edwin G Krebs. The mapk signaling cascade. *The FASEB journal*, 9(9) :726–735, 1995.
- [27] Hermann Aberle, Hillel Schwartz, and Rolf Kemler. Cadherin-catenin complex : protein interactions and their implications for cadherin function. *Journal of cellular biochemistry*, 61(4) :514–523, 1996.
- [28] Frauke Drees, Sabine Pokutta, Soichiro Yamada, W James Nelson, and William I Weis. α -catenin is a molecular switch that binds e-cadherin- β -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, 123(5) :903–915, 2005.
- [29] Craig D Buckley, Jiongyi Tan, Karen L Anderson, Dorit Hanein, Niels Volkman, William I Weis, W James Nelson, and Alexander R Dunn. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science*, 346(6209) :1254211, 2014.
- [30] Kevin D Costa, William J Hucker, and Frank C-P Yin. Buckling of actin stress fibers : a new wrinkle in the cytoskeletal tapestry. *Cell motility and the cytoskeleton*, 52(4) :266–274, 2002.
- [31] Ovijit Chaudhuri, Sapun H Parekh, and Daniel A Fletcher. Reversible stress softening of actin networks. *Nature*, 445(7125) :295, 2007.

- [32] George W Greene, Travers H Anderson, Hongbo Zeng, Bruno Zappone, and Jacob N Israelachvili. Force amplification response of actin filaments under confined compression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2) :445–449, 2009.
- [33] Anthony C Schramm, Glen M Hocky, Gregory A Voth, Laurent Blanchoin, Jean-Louis Martiel, and M Enrique. Actin filament strain promotes severing and cofilin dissociation. *Biophysical Journal*, 112(12) :2624–2633, 2017.
- [34] A Jégou, MF Carrier, and G Romet-Lemonne. Formin mdial senses and generates mechanical forces on actin filaments. *nat commun* 2013 ; 4 : 1883 ; pmid : 23695677. *Nature communications*, 2013.
- [35] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular biology of the cell*. 2002.
- [36] Olivier Hamant, Marcus G Heisler, Henrik Jönsson, Pawel Krupinski, Magalie Uyttewaal, Plamen Bokov, Francis Corson, Patrik Sahlin, Arezki Boudaoud, Elliot M Meyerowitz, et al. Developmental patterning by mechanical signals in arabidopsis. *science*, 322(5908) :1650–1655, 2008.
- [37] Alexandre Persat. Bacterial mechanotransduction. *Current opinion in microbiology*, 36 :1–6, 2017.
- [38] Christopher C DuFort, Matthew J Paszek, and Valerie M Weaver. Balancing forces : architectural control of mechanotransduction. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(5) :308, 2011.
- [39] Yuki Tsukada, Kazuhiro Aoki, Takeshi Nakamura, Yuichi Sakumura, Michiyuki Matsuda, and Shin Ishii. Quantification of local morphodynamics and local gtpase activity by edge evolution tracking. *PLoS computational biology*, 4(11) :e1000223, 2008.
- [40] Matthias Machacek, Louis Hodgson, Christopher Welch, Hunter Elliott, Olivier Pertz, Perihan Nalbant, Amy Abell, Gary L Johnson, Klaus M Hahn, and Gaudenz Danuser. Coordination of rho gtpase activities during cell protrusion. *Nature*, 461(7260) :99, 2009.
- [41] Anna-Karin E Johnsson, Yanfeng Dai, Max Nobis, Martin J Baker, Ewan J McGhee, Simon Walker, Juliane P Schwarz, Shereen Kadir, Jennifer P Morton, Kevin B Myant, et al. The rac-fret mouse reveals tight spatiotemporal control of rac activity in primary cells and tissues. *Cell reports*, 6(6) :1153–1164, 2014.
- [42] Karl Deisseroth. Optogenetics. *Nature methods*, 8(1) :26, 2011.
- [43] Jared E Toettcher, Orion D Weiner, and Wendell A Lim. Using optogenetics to interrogate the dynamic control of signal transmission by the ras/erk module. *Cell*, 155(6) :1422–1434, 2013.
- [44] Robert J Pelham and Yu-li Wang. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25) :13661–13665, 1997.
- [45] Adam J Engler, Ludovic Richert, Joyce Y Wong, Catherine Picart, and Dennis E Discher. Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films : correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surface Science*, 570(1-2) :142–154, 2004.
- [46] Adam Engler, Lucie Bacakova, Cynthia Newman, Alina Hategan, Maureen Griffin, and Dennis Discher. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophysical journal*, 86(1) :617–628, 2004.
- [47] Stefan Kippenberger, August Bernd, Maike Guschel, Jutta Müller, Roland Kaufmann, Stefan Loitsch, and Jürgen Bereiter-Hahn. Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via map kinases. *Journal of investigative dermatology*, 114(3) :408–412, 2000.
- [48] Guillaume T Charras and Mike A Horton. Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation. *Biophysical journal*, 82(6) :2970–2981, 2002.

- [49] Ning Wang, James P Butler, and Donald E Ingber. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260(5111) :1124–1127, 1993.
- [50] Ramaswamy Krishnan, Chan Young Park, Yu-Chun Lin, Jere Mead, Richard T Jaspers, Xavier Trepas, Guillaume Lenormand, Dhananjay Tambe, Alexander V Smolensky, Andrew H Knoll, et al. Reinforcement versus fluidization in cytoskeletal mechanoresponsiveness. *PloS one*, 4(5) :e5486, 2009.
- [51] Nathan J Sniadecki, Alexandre Anguelouch, Michael T Yang, Corinne M Lamb, Zhijun Liu, Stuart B Kirschner, Yaohua Liu, Daniel H Reich, and Christopher S Chen. Magnetic microposts as an approach to apply forces to living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37) :14553–14558, 2007.
- [52] Kazuaki Nagayama, Takuya Inoue, Yasuhiro Hamada, and Takeo Matsumoto. A novel patterned magnetic micropillar array substrate for analysis of cellular mechanical responses. *Journal of biomechanics*, 65 :194–202, 2017.
- [53] Jimmy Le Digabel, Nicolas Biais, Jérôme Fresnais, Jean-François Berret, Pascal Hersen, and Benoit Ladoux. Magnetic micropillars as a tool to govern substrate deformations. *Lab on a Chip*, 11(15) :2630–2636, 2011.
- [54] Margo T Frey, Irene Y Tsai, Thomas P Russell, Steven K Hanks, and Yu-li Wang. Cellular responses to substrate topography : role of myosin ii and focal adhesion kinase. *Biophysical journal*, 90(10) :3774–3782, 2006.
- [55] Ulrich S Schwarz and Jérôme RD Soiné. Traction force microscopy on soft elastic substrates : A guide to recent computational advances. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1853(11) :3095–3104, 2015.
- [56] Lev D Landau and EM Lifshitz. Theory of elasticity, vol. 7. *Course of Theoretical Physics*, 3 :109, 1986.
- [57] Ulrich S Schwarz, Nathalie Q Balaban, Daniel Riveline, A Bershadsky, Benjamin Geiger, and SA Safran. Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data : the effect of localized force and the need for regularization. *Biophysical journal*, 83(3) :1380–1394, 2002.
- [58] Ammar Azioune, Marko Storch, Michel Bornens, Manuel Théry, and Matthieu Piel. Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab on a chip*, 9(11) :1640–1642, 2009.
- [59] Qingzong Tseng, Irene Wang, Eve Duchemin-Pelletier, Ammar Azioune, Nicolas Carpi, Jie Gao, Odile Filhol, Matthieu Piel, Manuel Théry, and Martial Balland. A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels. *Lab on a chip*, 11(13) :2231–2240, 2011.
- [60] Hyun Ju Choi, Nam Hyun Kim, Bong Hyun Chung, and Gi Hun Seong. Micropatterning of biomolecules on glass surfaces modified with various functional groups using photoactivatable biotin. *Analytical biochemistry*, 347(1) :60–66, 2005.
- [61] Andre Bernard, Jean Philippe Renault, Bruno Michel, Hans Rudolf Bosshard, and Emmanuel Delamarche. Microcontact printing of proteins. *Advanced Materials*, 12(14) :1067–1070, 2000.
- [62] James E Kennedy. High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours. *Nature reviews cancer*, 5(4) :321, 2005.
- [63] Joo Ha Hwang and Lawrence A Crum. Current status of clinical high-intensity focused ultrasound. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 2009. EMBC 2009. Annual International Conference of the IEEE*, pages 130–133. IEEE, 2009.

- [64] Gail Ter Haar. Therapeutic ultrasound. *European Journal of Ultrasound*, 9(1) :3–9, 1999.
- [65] Claus-Dieter Ohl, Manish Arora, Roy Ikin, Nico De Jong, Michel Versluis, Michael Delius, and Detlef Lohse. Sonoporation from jetting cavitation bubbles. *Biophysical journal*, 91(11) :4285–4295, 2006.
- [66] Diane Dalecki. Mechanical bioeffects of ultrasound. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 6 :229–248, 2004.
- [67] Henrik I Elsner and Erik B Lindblad. Ultrasonic degradation of dna. *DNA*, 8(10) :697–701, 1989.
- [68] Mark Ward, Junru Wu, and Jen-Fu Chiu. Ultrasound-induced cell lysis and sonoporation enhanced by contrast agents. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 105(5) :2951–2957, 1999.
- [69] Randy L King, Julian R Brown, William T Newsome, and Kim Butts Pauly. Effective parameters for ultrasound-induced in vivo neurostimulation. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 39(2) :312–331, 2013.
- [70] Yusuf Tufail, Anna Yoshihiro, Sandipan Pati, Monica M Li, and William J Tyler. Ultrasonic neuromodulation by brain stimulation with transcranial ultrasound. *nature protocols*, 6(9) :1453, 2011.
- [71] LR Duarte. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Archives of orthopaedic and traumatic surgery*, 101(3) :153–159, 1983.
- [72] Lutz Claes and Bettina Willie. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1-3) :384–398, 2007.
- [73] Nghiem Doan, Peter Reher, Sajeda Meghji, and Malcolm Harris. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 57(4) :409–419, 1999.
- [74] Hyun Jung Lee, Byung Hyune Choi, Byoung-Hyun Min, Young Sook Son, and So Ra Park. Low-intensity ultrasound stimulation enhances chondrogenic differentiation in alginate culture of mesenchymal stem cells. *Artificial organs*, 30(9) :707–715, 2006.
- [75] D Schumann, R Kujat, J Zellner, MK Angele, M Nerlich, E Mayr, and P Angele. Treatment of human mesenchymal stem cells with pulsed low intensity ultrasound enhances the chondrogenic phenotype in vitro. *Biorheology*, 43(3, 4) :431–443, 2006.
- [76] Ryohei Takeuchi, Akihito Ryo, Noriko Komitsu, Yuko Mikuni-Takagaki, Atsuko Fukui, Yuta Takagi, Toshihiko Shiraishi, Shin Morishita, Yoshiyuki Yamazaki, Ken Kumagai, et al. Low-intensity pulsed ultrasound activates the phosphatidylinositol 3 kinase/akt pathway and stimulates the growth of chondrocytes in three-dimensional cultures : a basic science study. *Arthritis research & therapy*, 10(4) :R77, 2008.
- [77] Sardar MZ Uddin and Yi-Xian Qin. Enhancement of osteogenic differentiation and proliferation in human mesenchymal stem cells by a modified low intensity ultrasound stimulation under simulated microgravity. *PLoS One*, 8(9) :e73914, 2013.
- [78] Chih-Hsin Tang, Rong-Sen Yang, Tsang-Hai Huang, Dah-Yuu Lu, Woei-Jer Chuang, Tur-Fu Huang, and Wen-Mei Fu. Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and akt pathway in osteoblasts. *Molecular pharmacology*, 69(6) :2047–2057, 2006.
- [79] Rong-Sen Yang, Win-Li Lin, Ying-Zhen Chen, Chih-Hsin Tang, Tsang-Hai Huang, Bing-Yuh Lu, and Wen-Mei Fu. Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. *Bone*, 36(2) :276–283, 2005.

- [80] H Watabe, T Furuhashi, N Tani-Ishii, and Y Mikuni-Takagaki. Mechanotransduction activates $\alpha 5 \beta 1$ integrin and pi3k/akt signaling pathways in mandibular osteoblasts. *Experimental cell research*, 317(18) :2642–2649, 2011.
- [81] Claire M Mahoney, Mark R Morgan, Andrew Harrison, Martin J Humphries, and Mark D Bass. Therapeutic ultrasound bypasses canonical syndecan-4 signaling to activate rac1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13) :8898–8909, 2009.
- [82] James Roper, Andrew Harrison, and Mark D Bass. Induction of adhesion-dependent signals using low-intensity ultrasound. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (63), 2012.
- [83] Kenjiro Bandow, Yoshiaki Nishikawa, Tomokazu Ohnishi, Kyoko Kakimoto, Kazuhisa Soejima, Sadahiro Iwabuchi, Kazuto Kuroe, and Tetsuya Matsuguchi. Low-intensity pulsed ultrasound (lipus) induces rankl, mcp-1, and mip-1 β expression in osteoblasts through the angiotensin ii type 1 receptor. *Journal of cellular physiology*, 211(2) :392–398, 2007.
- [84] Nicholas P Whitney, Allyson C Lamb, Tobias M Louw, and Anuradha Subramanian. Integrin-mediated mechanotransduction pathway of low-intensity continuous ultrasound in human chondrocytes. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 38(10) :1734–1743, 2012.
- [85] Kotaro Sena, Robert M Leven, Khurram Mazhar, Dale R Sumner, and Amarjit S Viridi. Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 31(5) :703–708, 2005.
- [86] Arnaud Gleizal, Shuli Li, Jean-Baptiste Pialat, and Jean-Luc Beziat. Transcriptional expression of calvarial bone after treatment with low-intensity ultrasound : an in vitro study. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 32(10) :1569–1574, 2006.
- [87] AJ Mortimer and M Dyson. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound in medicine and Biology*, 14(6) :499–506, 1988.
- [88] Cheri X Deng, Fred Sieling, Hua Pan, and Jianmin Cui. Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 30(4) :519–526, 2004.
- [89] Javad Parvizi, Vladimir Parpura, James F Greenleaf, and Mark E Bolander. Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes. *Journal of orthopaedic research*, 20(1) :51–57, 2002.
- [90] Érika Costa Alvarenga, Renata Rodrigues, Afonso Caricati-Neto, Fernando Costa Silva-Filho, Edgar J Paredes-Gamero, and Alice T Ferreira. Low-intensity pulsed ultrasound-dependent osteoblast proliferation occurs by via activation of the p2y receptor : role of the p2y1 receptor. *Bone*, 46(2) :355–362, 2010.
- [91] DongHee Park, Bong-Kwang Jung, Hyunjin Park, Hyungbeen Lee, Gyudo Lee, Jingam Park, Unchul Shin, Jong Ho Won, Yong Jun Jo, Jin Woo Chang, et al. Sound packing dna : packing open circular dna with low-intensity ultrasound. *Scientific reports*, 5 :9846, 2015.
- [92] Natalya Mizrahi, Enhua H Zhou, Guillaume Lenormand, Ramaswamy Krishnan, Daphne Weihs, James P Butler, David A Weitz, Jeffrey J Fredberg, and Eitan Kimmel. Low intensity ultrasound perturbs cytoskeleton dynamics. *Soft matter*, 8(8) :2438–2443, 2012.
- [93] Yaxin Hu, Jennifer MF Wan, and CH Alfred. Cytomechanical perturbations during low-intensity ultrasound pulsing. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 40(7) :1587–1598, 2014.
- [94] Masahiro Kumeta, Daiji Takahashi, Kunio Takeyasu, and Shige H Yoshimura. Cell type-specific suppression of mechanosensitive genes by audible sound stimulation. *PloS one*, 13(1) :e0188764, 2018.

- [95] Stuart Ibsen, Ada Tong, Carolyn Schutt, Sadik Esener, and Sreekanth H Chalasani. Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications*, 6 :8264, 2015.
- [96] Marcel Minnaert. Xvi. on musical air-bubbles and the sounds of running water. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 16(104) :235–248, 1933.
- [97] Rémi Dangla, Sungyon Lee, and Charles N Baroud. Trapping microfluidic drops in wells of surface energy. *Physical review letters*, 107(12) :124501, 2011.
- [98] Philippe Nghe, Sarah Boulineau, Sebastian Gude, Pierre Recouvreux, Jeroen S van Zon, and Sander J Tans. Microfabricated polyacrylamide devices for the controlled culture of growing cells and developing organisms. *PloS one*, 8(9) :e75537, 2013.
- [99] Nadia Zaari, Padmavathy Rajagopalan, Sooyoung K Kim, Adam J Engler, and Joyce Y Wong. Photopolymerization in microfluidic gradient generators : microscale control of substrate compliance to manipulate cell response. *Advanced Materials*, 16(23-24) :2133–2137, 2004.
- [100] Ianis Bernard, Alexander A Doinikov, Philippe Marmottant, David Rabaud, Cédric Poulain, and Pierre Thibault. Controlled rotation and translation of spherical particles or living cells by surface acoustic waves. *Lab on a Chip*, 17(14) :2470–2480, 2017.
- [101] Xiaoyun Ding, Sz-Chin Steven Lin, Brian Kiraly, Hongjun Yue, Sixing Li, I-Kao Chiang, Jinjie Shi, Stephen J Benkovic, and Tony Jun Huang. On-chip manipulation of single microparticles, cells, and organisms using surface acoustic waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28) :11105–11109, 2012.
- [102] Lothar Schmid, David A Weitz, and Thomas Franke. Sorting drops and cells with acoustics : acoustic microfluidic fluorescence-activated cell sorter. *Lab on a Chip*, 14(19) :3710–3718, 2014.
- [103] Viraj Madusanka. Jablonski diagram. Web course, 2017.
- [104] Joseph R Lakowicz. Principles of fluorescence spectroscopy, (1999), 2004.
- [105] Carsten Grashoff, Brenton D Hoffman, Michael D Brenner, Ruobo Zhou, Maddy Parsons, Michael T Yang, Mark A McLean, Stephen G Sligar, Christopher S Chen, Taekjip Ha, et al. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466(7303) :263, 2010.
- [106] Nicolas Borghi, Maria Sorokina, Olga G Shcherbakova, William I Weis, Beth L Pruitt, W James Nelson, and Alexander R Dunn. E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell–cell contacts upon externally applied stretch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31) :12568–12573, 2012.
- [107] Beth L Pruitt, Alexander R Dunn, William I Weis, and W James Nelson. Mechano-transduction : from molecules to tissues. *PLoS biology*, 12(11) :e1001996, 2014.
- [108] Akihiko Tsuji, Hiroyuki Koshimoto, Yoshihiro Sato, Masahiko Hirano, Yukari Sei-Iida, Satoshi Kondo, and Kaname Ishibashi. Direct observation of specific messenger rna in a single living cell under a fluorescence microscope. *Biophysical journal*, 78(6) :3260–3274, 2000.
- [109] Kim E Sapsford, Steven Sun, Jesse Francis, Yordan Kostov, Avraham Rasooly, Dorothy Farrell, Hedi Mattoussi, and Igor L Medintz. Energy transfer-based biosensing of protease activity measured using an electroluminescent platform. In *Frontiers in Pathogen Detection : From Nanosensors to Systems*, volume 7167, page 71670X. International Society for Optics and Photonics, 2009.
- [110] Hui-hua Li, Douglas S Lyles, Michael J Thomas, Wei Pan, and Mary G Sorci-Thomas. Structural determination of lipid-bound apoA-I using fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47) :37048–37054, 2000.

- [111] Thomas D Pollard, William C Earnshaw, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Graham Johnson. *Cell Biology E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2016.
- [112] Robert Roskoski. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(1) :1–14, 2005.
- [113] Yingxiao Wang, Elliot L Botvinick, Yihua Zhao, Michael W Berns, Shunichi Usami, Roger Y Tsien, and Shu Chien. Visualizing the mechanical activation of src. *Nature*, 434(7036) :1040, 2005.
- [114] Chen Sun, Mingxing Ouyang, Zhenning Cao, Sai Ma, Hamzeh Alqublan, Nammalwar Sriranganathan, Yingxiao Wang, and Chang Lu. Electroporation-delivered fluorescent protein biosensors for probing molecular activities in cells without genetic encoding. *Chemical Communications*, 50(78) :11536–11539, 2014.
- [115] Henry R Bourne, David A Sanders, and Frank McCormick. The gtpase superfamily : conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305) :117, 1991.
- [116] Kazuhiro Aoki and Michiyuki Matsuda. Visualization of small gtpase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *nature protocols*, 4(11) :1623, 2009.
- [117] Naoki Mochizuki, Shigeko Yamashita, Kazuo Kurokawa, Yusuke Ohba, Takeharu Nagai, Atsushi Miyawaki, and Michiyuki Matsuda. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of ras and rap1. *Nature*, 411(6841) :1065, 2001.
- [118] EP Buurman, R Sanders, A Draaijer, HC Gerritsen, JJF Van Veen, PM Houpt, and YK Levine. Fluorescence lifetime imaging using a confocal laser scanning microscope. *Scanning*, 14(3) :155–159, 1992.
- [119] HC Gerritsen, MAH Asselbergs, AV Agronskaia, and WGJHM Van Sark. Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes : acquisition speed, photon economy and lifetime resolution. *Journal of microscopy*, 206(3) :218–224, 2002.
- [120] W Becker, A Bergmann, MA Hink, K König, K Benndorf, and C Biskup. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microscopy research and technique*, 63(1) :58–66, 2004.
- [121] Desmond O’Connor. *Time-correlated single photon counting*. Academic Press, 2012.
- [122] Sergi Padilla-Parra, Nicolas Audugé, Maïté Coppey-Moisan, and Marc Tramier. Quantitative fret analysis by fast acquisition time domain flim at high spatial resolution in living cells. *Biophysical journal*, 95(6) :2976–2988, 2008.
- [123] Hiroshi Yamada, Sergi Padilla-Parra, Sun-Joo Park, Toshiki Itoh, Mathilde Chaineau, Ilaria Monaldi, Ottavio Cremona, Fabio Benfenati, Pietro De Camilli, Maïté Coppey-Moisan, et al. Dynamic interaction of amphiphysin with n-wasp regulates actin assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49) :34244–34256, 2009.
- [124] Michelle A Digman, Valeria R Caiolfa, Moreno Zamai, and Enrico Gratton. The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis. *Biophysical journal*, 94(2) :L14–L16, 2008.
- [125] A Leray, C Spriet, D Trinel, R Blossey, Yves Usson, and L Heliot. Quantitative comparison of polar approach versus fitting method in time domain flim image analysis. *Cytometry Part A*, 79(2) :149–158, 2011.
- [126] Hernan E Grecco, Pedro Roda-Navarro, and Peter J Verveer. Global analysis of time correlated single photon counting fret-flim data. *Optics Express*, 17(8) :6493–6508, 2009.

- [127] Janos Matko, Attila Jenei, Laszlo Matyus, Marcel Ameloot, and Sandor Damjanovich. Mapping of cell surface protein-patterns by combined fluorescence anisotropy and energy transfer measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 19(1) :69–73, 1993.
- [128] DS Lidke, P Nagy, BG Barisas, R Heintzmann, Janine Nicole Post, KA Lidke, AHA Clayton, DJ Arndt-Jovin, and TM Jovin. Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rflim and emfret), 2003.
- [129] Marc Tramier, Tristan Piolot, Isabelle Gautier, Vincent Mignotte, Jacques Coppey, Klaus Kemnitz, Christiane Durieux, and Maité Coppey-Moisan. [homo-fret versus hetero-fret to probe homodimers in living cells. In *Methods in enzymology*, volume 360, pages 580–597. Elsevier, 2003.
- [130] Vladimir M Mekler. A photochemical technique to enhance sensitivity of detection of fluorescence resonance energy transfer. *Photochemistry and photobiology*, 59(S1) :615–620, 1994.
- [131] EB Van Munster, GJ Kremers, MJW ADJOB-HERMANS, and Th WJ Gadella. Fluorescence resonance energy transfer (fret) measurement by gradual acceptor photobleaching. *Journal of microscopy*, 218(3) :253–262, 2005.
- [132] Russell M Young, J Kenneth Arnette, Deborah A Roess, and B George Barisas. Quantitation of fluorescence energy transfer between cell surface proteins via fluorescence donor photobleaching kinetics. *Biophysical journal*, 67(2) :881–888, 1994.
- [133] Taekjip Ha, Alice Y Ting, Joy Liang, W Brett Caldwell, Ashok A Deniz, Daniel S Chemla, Peter G Schultz, and Shimon Weiss. Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(3) :893–898, 1999.
- [134] Maxime Dahan, Ashok A Deniz, Taekjip Ha, Daniel S Chemla, Peter G Schultz, and Shimon Weiss. Ratiometric measurement and identification of single diffusing molecules. *Chemical Physics*, 247(1) :85–106, 1999.
- [135] Atsushi Miyawaki, Juan Llopis, Roger Heim, J Michael McCaffery, Joseph A Adams, Mitsuhiro Ikura, and Roger Y Tsien. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645) :882, 1997.
- [136] C. M. Silva M. M. Yang Youvan, D. C. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Biotechnology*, 1997.
- [137] Gerald W Gordon, Gail Berry, Xiao Huan Liang, Beth Levine, and Brian Herman. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 74(5) :2702–2713, 1998.
- [138] Zongping Xia and Yuechueng Liu. Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophysical journal*, 81(4) :2395–2402, 2001.
- [139] Tomasz Zal and Nicholas RJ Gascoigne. Photobleaching-corrected fret efficiency imaging of live cells. *Biophysical journal*, 86(6) :3923–3939, 2004.
- [140] Timo Zimmermann, Jens Rietdorf, Andreas Girod, Virginie Georget, and Rainer Pepperkok. Spectral imaging and linear un-mixing enables improved fret efficiency with a novel gfp2–yfp fret pair. *FEBS letters*, 531(2) :245–249, 2002.
- [141] Christopher Thaler, Srinagesh V Koushik, Paul S Blank, and Steven S Vogel. Quantitative multi-photon spectral imaging and its use for measuring resonance energy transfer. *Biophysical journal*, 89(4) :2736–2749, 2005.

- [142] Wolfgang Becker, Axel Bergmann, Christoph Biskup, Thomas Zimmer, Nikolaj Klöcker, and Klaus Benndorf. Multiwavelength tcspe lifetime imaging. In *Multiphoton microscopy in the biomedical sciences II*, volume 4620, pages 79–85. International Society for Optics and Photonics, 2002.
- [143] Pieter De Beule, Dylan M Owen, Hugh B Manning, Clifford B Talbot, Jose Requejo-Isidro, Christopher Dunsby, James McGinty, Richard KP Benninger, Daniel S Elson, Ian Munro, et al. Rapid hyperspectral fluorescence lifetime imaging. *Microscopy research and technique*, 70(5) :481–484, 2007.
- [144] Karim Lekadir, Daniel S Elson, Jose Requejo-Isidro, Christopher Dunsby, James McGinty, Neil Galletly, Gordon Stamp, Paul MW French, and Guang-Zhong Yang. Tissue characterization using dimensionality reduction and fluorescence imaging. In *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, pages 586–593. Springer, 2006.
- [145] Taekjip Ha, Thilo Enderle, DF Ogletree, Daniel S Chemla, Paul R Selvin, and Shimon Weiss. Probing the interaction between two single molecules : fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13) :6264–6268, 1996.
- [146] Achillefs N Kapanidis, Nam Ki Lee, Ted A Laurence, Sören Doose, Emmanuel Margeat, and Shimon Weiss. Fluorescence-aided molecule sorting : analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24) :8936–8941, 2004.
- [147] Nam Ki Lee, Achillefs N Kapanidis, You Wang, Xavier Michalet, Jayanta Mukhopadhyay, Richard H Ebright, and Shimon Weiss. Accurate fret measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. *Biophysical journal*, 88(4) :2939–2953, 2005.
- [148] Emmanuel Margeat, Achillefs N Kapanidis, Philip Tinnefeld, You Wang, Jayanta Mukhopadhyay, Richard H Ebright, and Shimon Weiss. Direct observation of abortive initiation and promoter escape within single immobilized transcription complexes. *Biophysical journal*, 90(4) :1419–1431, 2006.
- [149] WM Reichert and GA Truskey. Total internal reflection fluorescence (tirf) microscopy. i. modelling cell contact region fluorescence. *Journal of cell science*, 96(2) :219–230, 1990.
- [150] Daniel Axelrod. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2(11) :764–774, 2001.
- [151] Edgar Gutierrez, Eugene Tkachenko, Achim Besser, Prithu Sundd, Klaus Ley, Gaudenz Danuser, Mark H Ginsberg, and Alex Groisman. High refractive index silicone gels for simultaneous total internal reflection fluorescence and traction force microscopy of adherent cells. *PLoS One*, 6(9) :e23807, 2011.
- [152] Adam Hoppe, Kenneth Christensen, and Joel A Swanson. Fluorescence resonance energy transfer-based stoichiometry in living cells. *Biophysical journal*, 83(6) :3652–3664, 2002.
- [153] Huanmian Chen, Henry L Puhl 3rd, Srinagesh V Koushik, Steven S Vogel, and Stephen R Ikeda. Measurement of fret efficiency and ratio of donor to acceptor concentration in living cells. *Biophysical journal*, 91(5) :L39–L41, 2006.
- [154] Mark A Rizzo, Gerald H Springer, Butch Granada, and David W Piston. An improved cyan fluorescent protein variant useful for fret. *Nature biotechnology*, 22(4) :445, 2004.
- [155] Andrew S LaCroix, Katheryn E Rothenberg, Matthew E Berginski, Aarti N Urs, and Brenton D Hoffman. Construction, imaging, and analysis of fret-based tension sensors in living cells. In *Methods in cell biology*, volume 125, pages 161–186. Elsevier, 2015.

- [156] Takeharu Nagai, Keiji Ibata, Eun Sun Park, Mie Kubota, Katsuhiko Mikoshiba, and Atsushi Miyawaki. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology*, 20(1) :87, 2002.
- [157] Abraham Savitzky and Marcel JE Golay. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical chemistry*, 36(8) :1627–1639, 1964.
- [158] Vincent Steinmetz. Traitement d'images. Web course, 2017.
- [159] Sandipan Dey. Some image processing and computational photography : Convolution, filtering and edge detection with python. Web course, 2017.
- [160] H. Lohninger. Fundamentals of statistics. Web course, 2014.
- [161] Srinagesh V Koushik, Huanmian Chen, Christopher Thaler, Henry L Puhl III, and Steven S Vogel. Cerulean, venus, and venusy67c fret reference standards. *Biophysical journal*, 91(12) :L99–L101, 2006.
- [162] Srinagesh V Koushik, Paul S Blank, and Steven S Vogel. Anomalous surplus energy transfer observed with multiple fret acceptors. *PloS one*, 4(11) :e8031, 2009.
- [163] N ria Gavara and Richard S Chadwick. Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips. *Nature nanotechnology*, 7(11) :733, 2012.
- [164] J Victor Small, Theresia Stradal, Emmanuel Vignal, and Klemens Rottner. The lamellipodium : where motility begins. *Trends in cell biology*, 12(3) :112–120, 2002.
- [165] Nikon Instruments Inc. Introduction to fluorescent proteins. Web article, 2018.