



HAL
open science

QuanTI-FRET, un outil d'imagerie pour l'analyse de la mécanotransduction dans les cellules vivantes uniques

Alain Lombard

► To cite this version:

Alain Lombard. QuanTI-FRET, un outil d'imagerie pour l'analyse de la mécanotransduction dans les cellules vivantes uniques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALY055 . tel-03193230

HAL Id: tel-03193230

<https://theses.hal.science/tel-03193230v1>

Submitted on 8 Apr 2021

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 L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Physique pour les Sciences du Vivant

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Alain LOMBARD

Thèse dirigée par **Aurélié DUPONT**, Université Grenoble Alpes

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

QuanTI-FRET, un outil d'imagerie pour l'analyse de la mécanotransduction dans les cellules vivantes uniques

QuanTI-FRET, an imaging tool to study mechanotransduction in isolated living cells

Thèse soutenue publiquement le **14 décembre 2020**,
devant le jury composé de :

Monsieur ERIC FREYSSINGEAS

MAITRE DE CONFERENCES HDR, ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON, Rapporteur

Monsieur MATHIEU COPPEY

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION PARIS-CENTRE, Rapporteur

Madame LEA-LAETITIA PONTANI

CHARGE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION PARIS-CENTRE, Examinatrice

Monsieur PIERRE-ETIENNE WOLF

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION ALPES, Président

Madame IRINA MIHALCESCU

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Examinatrice



Résumé

De nombreux processus cellulaires élémentaires (migration, différenciation, mort) sont contrôlés par des ensembles d'acteurs reliés entre eux par des réactions en cascade. Certains de ces réseaux de signalisation convertissent des signaux mécaniques extérieurs à la cellule en signaux biochimiques internes, processus appelé mécanotransduction. Nous cherchons à étudier ces réseaux dans une approche de traitement du signal, pour déterminer expérimentalement un analogue de la fonction de transfert en espace et temps pour la mécanotransduction. Plus précisément, nous nous concentrons sur les réseaux de signalisation impliquant les Rho GTPases, acteurs majeurs dans la mécanotransduction. Dans le but de mesurer l'activité de certaines Rho GTPases en cellules vivantes, nous utilisons des biosenseurs FRET. Le FRET est un transfert d'énergie entre deux fluorophores, possible uniquement lorsqu'ils sont très proches l'un de l'autre (quelques nanomètres). Pour mesurer le FRET, nous imageons des cellules vivantes exprimant le biosenseur grâce à un microscope de fluorescence en champ large. Dans cette thèse, nous avons développé une méthode de mesure et d'analyse quantitative du FRET, dans la continuité d'un travail précédent. Ici, la calibration est faite directement sur les échantillons d'intérêt et non plus à l'aide d'étalons de FRET. Cette méthode d'autocalibration fait l'hypothèse que la stoechiométrie de la paire de fluorophores FRET est connue, et rend l'accès à cette méthode de FRET quantitatif plus aisé. Des facteurs quantitatifs et qualitatifs de contrôles de la qualité de la calibration permettent d'évaluer sa justesse. L'efficacité de FRET donne accès à l'activité en espace et en temps de certaines molécules des réseaux de signalisation. Enfin, des observations préliminaires sont réalisées, mettant en lumière certains comportements reliés entre morphologie des cellules et activité des Rho GTPases, ainsi que des limitations expérimentales dues au photoblanchiment des fluorophores. Pour finir, une méthode d'analyse très prometteuse est présentée, la décomposition en valeurs singulières, qui permet d'envisager des analyses poussées décorrélant espace et temps dans les films de biosenseurs, et permettant de supprimer les biais liés au photoblanchiment. Cette méthode ouvre la voie à une analyse quantitative non biaisée du fonctionnement spatio-temporel des réseaux de signalisation des Rho GTPases.

Abstract

Many elementary cellular processes (migration, differentiation, death) are controlled by a set of agents linked together by cascade reactions. Some of these signaling networks convert mechanical signals external to the cell into internal biochemical signals, a process called mechanotransduction. We seek to study these networks through a signal processing approach, in order to experimentally determine an analogous of the transfer function in time and space for mechanotransduction. More precisely, we focus on signalling networks in which Rho GTPases play a major role, main agents of mechanotransduction. In order to measure the activity of some Rho GTPases in live cells, we use FRET biosensors. FRET is an energy transfer between two fluorophores, occurring only when they are very close from each other (few nanometers). In order to measure FRET, we image live cells with the biosensor through a widefield fluorescence microscope. In this work, we set up a quantitative analysing and measuring method of the FRET, pursuing a precedent work. Here, calibration is directly done on samples of interest, not with FRET standards. This autocalibration method is based on the hypothesis that the stoichiometry of the FRET fluorophores pair is known, and makes the access to this quantitative FRET method easier. Quantitative and qualitative controlling factors of the calibration quality make give an estimation of its precision. The FRET efficiency gives access to the activity in space and time of some molecules of the signalling networks. Finally, preliminary observations on FRET films highlight some linked behaviours between cells morphology and Rho GTPases activity, and experimental limitations due to fluorophores photo-bleaching. Finally, an analysis method very promising is presented, the singular values decomposition, which allows considering advanced analysis decorrelating space from time in FRET films, and suppressing biases from the photobleaching. This method opens the path to a quantitative unbiased analysis of the spatio-temporal behaviour of Rho GTPases signalling networks.

Table des matières

1	État de l'art	15
1.1	Mécanotransduction	15
1.1.1	Rôle et éléments fondamentaux	15
1.1.2	Zoom sur les petites GTPases	18
1.1.3	Coordination spatio-temporelle de l'activité des Rho GTPases	20
1.1.4	Biosenseurs FRET	22
1.2	Fluorescence et FRET	25
1.2.1	Motivation	25
1.2.2	Principes physiques	26
1.2.3	Les différentes méthodes de mesure du FRET en cellules	29
1.3	Mesure de FRET quantitatif en cellules vivantes : QuanTI-FRET	31
1.3.1	Théorie	31
1.3.2	Calibration des facteurs de correction	35
1.3.3	Exploitation de la stoechiométrie	41
1.3.4	Discussion	44
2	Simplification de la méthode QuanTI-FRET : l'auto-calibration	47
2.1	Introduction	47
2.2	Théorie - lien avec le QuanTI-FRET 1.0	48
2.3	Résultats	50
2.3.1	Calibration des fuites spectrales	50
2.3.2	Auto-calibration	51
2.3.3	Estimation de la qualité de la calibration	52
2.4	Discussion	55
2.5	Conclusion	59
3	Perspectives	61
3.1	Premières observations	61
3.1.1	Observations du film d'épifluorescence	61
3.1.2	Observations du film de FRET	63
3.2	Dérive temporelle et photoblanchiment	64
3.2.1	Etude numérique de l'impact du photoblanchiment	65
3.2.2	Correction analytique de la dérive	66
3.3	Filtrage par décomposition en valeurs singulières (SVD)	68
3.3.1	Théorie : séparer les variables de temps et d'espace	68
3.3.2	Application au film FRET du biosenseur de RhoA	71
3.4	Microscopie en réflexion totale	74
3.5	Essais avec un biosenseur de Rac1	76

4	Conclusions	77
4.1	Récapitulatif	77
4.2	Perspectives	78
5	Matériel et méthodes - Annexes	82
5.1	Biosenseurs d'activité	82
5.1.1	Choix du biosenseur et de la Rho GTPase	82
5.1.2	Précautions d'usage et de bon fonctionnement	85
5.1.3	Utilisation pratique des biosenseurs en cellules vivantes	85
5.1.4	Difficultés de culture	86
5.1.5	Mycoplasmes	86
5.2	Mise en pratique expérimentale	87
5.2.1	Montage expérimental	87
5.2.2	Traitement d'images QuantTI-FRET	96
5.3	Spectres des fluorophores	101
5.4	Filtre qualité sur les cartes de FRET	103
5.5	Autocalibration	103
5.5.1	Bootstrap	103
5.6	Abréviations et vocabulaire technique	104
5.7	Transfections de Ce, Ve ou TFP sur fibroblastes 3T3	105
5.8	Milieu de culture	106
5.9	Réglage du microscope	106
6	Remerciements	107

Liste des tableaux

2.1	Valeurs de δ^{DE} et α^{BT} retenues. std = erreur standard, SEM = erreur sur la détermination de la moyenne, $N_{cell,BT} = 15$ et $N_{cell,DE} = 21$, ce qui correspond à $N_{pixels,BT} = 1.34 \times 10^3$ et $N_{pixels,DE} = 0.44 \times 10^3$	51
2.2	β^X et γ^M pour un percentile de 10-98 appliqué sur les pixels cellule par cellule, en écartant une cellule à la stoechiométrie aberrante. R^2 et $red\chi^2$ précision de l'ajustement.	52
2.3	Valeurs de l'estimateur qualité de la calibration selon les conditions, ainsi que β^X , γ^M et R^2	57

Table des figures

1.1	Schéma de principe de la mécanotransduction. Les cellules adhèrent sur le substrat (matrice extra-cellulaire) via les adhésions focales qui sont reliées au cytosquelette d'actine, responsable de la dynamique mécanique de la cellule. D'autres signaux provenant des canaux ioniques ou des jonctions cellules sont représentés. Certains de ces signaux, une fois intégrés peuvent provoquer une modulation de l'expression génique.	16
1.2	Fonctionnement des AFs. Représentation 3D d'une FA. L'accent est mis sur l'organisation en couches selon l'axe z, dont chacune a un rôle dans la transduction du signal mécanique [Kanchanawong et al., 2010].	17
1.3	Schéma de principe du cycle des petites GTPases, avec RhoA prise en exemple de GTPase. Rôle des GEF et GAP pour changer l'état de RhoA liée au GTP ou GDP.	19
1.4	A La première version du biosenseur de RhoA publiée en 2006 [Pertz et al., 2006]. B Images ratiométriques du FRET des biosenseurs de Rac1, Cdc42 et RhoA dans des fibroblastes de souris (MEF) en migration [Machacek et al., 2009]. On observe un gradient de l'activité de ces 3 Rho GTPases, plus intense à la périphérie des cellules. C Séquence d'images du ratio de FRET du biosenseur de RhoA dans les mêmes cellules. On voit que le pattern d'activation est très dynamique. Echelle $20\mu\text{m}$. D Récapitulatif de la coordination spatio-temporelle de RhoA, Rac1 et Cdc42 à la périphérie de ces cellules MEF en migration sans stimulation chimique. Une coordination différente a pu être observée par la suite après stimulation chimique [Martin et al., 2016].	21
1.5	Construction du biosenseur de Rac1 "DORA". Le changement d'affinité de Rac1 pour son effecteur PAK1 provoque un changement de conformation du biosenseur qui rapproche les deux fluorophores, augmentant ainsi l'efficacité de FRET [Timmerman et al., 2015]	23
1.6	Diagramme de Jablonski, d'après [Coullomb, 2018]. Après l'absorption de photons d'énergie suffisante, la fluorescence est une voie de relaxation radiative d'un fluorophore.	27
1.7	Efficacité de FRET en fonction de la distance, rayon de Förster. D'après [Lakowicz, 2013]	28

1.8	Représentation schématisée de la séquence d'acquisition d'images. Dans un premier temps, on excite le donneur avec le laser L_D et on collecte simultanément dans les canaux d'émission donneur (I_{DD}) et accepteur (I_{DA}). Dans un deuxième temps, on excite directement l'accepteur avec le laser L_A et l'on collecte à nouveau dans les deux canaux d'émission, mais seule l'image I_{AA} est informative. L'acquisition simultanée des deux canaux d'émission est obtenue en les séparant chromatiquement et les repositionnant côte à côte sur la caméra (figurée en bleu).	32
1.9	Illustration des recouvrements de spectres. Les spectres d'absorption (lignes pointillées) et d'émission (lignes pleines) pour le fluorophore donneur mTFP1 (mauve) et pour le fluorophore accepteur Venus (vert) sont tracés en fonction de la longueur d'onde. Figurent également les longueurs des lasers d'excitation L_D et L_A et les filtres d'émission des deux canaux d'imagerie. On a explicité la zone responsable de l'excitation directe (DE) et celle responsable de la fuite spectrale du donneur dans le canal de l'accepteur (BT).	33
1.10	Représentation dans l'espace 3D défini par les trois canaux d'acquisition I_{DD}, I_{DA}, I_{AA} . (A) Dans cet espace, les pixels ayant la même valeur de FRET E forment une droite. L'ensemble des droites balayant les valeurs de E est contenu dans un plan. (B) L'objectif de la calibration est de déterminer le plan correspondant au jeu de paramètres expérimentaux. Cela nécessite de connaître la stoechiométrie des échantillons de calibration. La stoechiométrie fait varier l'inclinaison du plan de FRET par rapport au plan $I_{AA} = 0$	38
1.11	Résultats illustrés de la calibration avec les standards de FRET. A. Images de cellules exprimant les standards dans les trois canaux $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ et de l'image de FRET pour les trois standards C5V (lien court), C17V (lien moyen) et C32V (lien long). Les plus fortes valeurs de FRET sont mesurées avec les lien courts. Barre d'échelle : $20 \mu m$. Echelle de couleur : efficacité de FRET en %. B. Nuage de points dans l'espace 3D des $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ issu des pixels assemblés de toutes les cellules. En grisé le plan ajusté passe bien par les trois nuages de points des standards, dont les coefficients directeurs sont β^X et γ^M . C. Diagramme à moustaches des valeurs de FRET mesurées sur les trois standards, au sein de deux laboratoires différents dénommés [A] et [B] lors d'expériences indépendantes. Après la calibration par la méthode QuanTI-FRET, les mêmes valeurs médianes de FRET sont obtenues pour chaque standard.	39

1.12	Influence de la proportion entre donneur ou accepteur libre dans la cellule. A. Histogramme 2D E-S théorique : partant d'une population initiale caractérisée par (E_0 , $S_0 = 50\%$, point orange), le couple (E, S) évolue selon deux trajectoires selon que l'on ajoute du donneur libre ou de l'accepteur libre. Ces trajectoires tendent vers le disque bleu (accepteur seul) ou vert (donneur seul). B. Histogramme 2D E-S expérimental pour des constructions avec des valeurs de FRET différentes (V32V et C5V) ou des valeurs de stoechiométrie différentes (CVC et VCV) ou encore les donneurs seulement (Verulean) et accepteurs seulement (Venus). La seule correction apportée est celles des α^{BT} et δ^{DE} . C. Les mêmes données expérimentales en corrigeant en plus par les facteurs γ^X et β^M . D. Triplet d'une cellule exprimant C32V. Barre d'échelle 15 μm . E. Les cartes correspondantes de FRET et Stoechiométrie pures, puis la carte de FRET après filtrage par un filtre gaussien pondéré. F. Histogramme associé de la stoechiométrie et des poids (W) représenté par une ligne. G. Carte des poids W associés. H. Profils linéaires des trois cartes du E . Les flèches indiquent un endosome.	42
2.1	Résultats de l'autocalibration. A. Représentation 3D des nuages de points associés aux cellules Rh2G (bleu, une cellule particulière en magenta) dans l'espace $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$. Maillage gris : plan d'ajustement des données. B. Même ensemble vu de côté. C. Diagramme à moustaches des valeurs de stoechiométrie, cellule par cellule.	52
2.2	Histogrammes 2D pour les cellules de l'autocalibration Rh2G. A. Pour E et S (en pourcentages). B. Pour S et I_{AA} (en unités arbitraires). C. Pour E et I_{AA} (en u.a.).	54
2.3	Résultats de l'autocalibration avec les cellules Y27 (drogue) ajoutées aux Rh2G. A. Représentation 3D des nuages de points associés aux cellules Rh2G (bleu) et Y27 (vert) dans l'espace $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$. Maillage gris : plan d'ajustement des données. B. Même ensemble vu de côté. Le plan d'ajustement pour Rh2G uniquement en gris clair, le nouveau avec les deux conditions en noir. C. Histogrammes 2D E-S (en pourcentages) pour les cellules des deux conditions.	56
3.1	Photo-blanchiment. A. Cellule exemple prise au long de ce chapitre, cultivée sur un motif d'adhérence carré. On voit les trois canaux de fluorescence qui servent à calculer le FRET. B. Évolution temporelle moyennée sur toute la cellule de l'intensité de fluorescence dans les trois canaux. C. Évolution temporelle de la stoechiométrie moyennée sur toute la cellule. D. Histogramme 2D E-S sommé pour tout le film de la cellule A . E. Évolution temporelle de la probabilité de FRET E moyennée sur toute la cellule.	63
3.2	Simulation numérique du blanchissement. (a) Évolution des différentes populations. (b) Évolution associée du FRET et de S (pointillés). (c) Abaque des différentes évolutions de S en faisant varier E_0 . (d) Graphe de S en fonction du FRET, en bleu pour un film de cellule, en vert le résultat d'une simulation issue de l'abaque.	66
3.3	Influence du blanchiment des fluorophores sur l'histogramme 2D E-S, tiré de [Coullomb et al., 2020]	67

3.4	Principe de la réorganisation des films spatio-temporels. S est la matrice de Casorati.	69
3.5	Principe de la reconstitution du signal avec filtrage SVD. U_i les vecteurs propres spatiaux (unités arbitraires en code couleur), V_i les vecteurs propres temporels, unités arbitraires. On reconstruit le film de FRET avec les valeurs singulières comprises entre 2 et 10.	70
3.6	Séquence de protrusion sur la cellule sur motif carré. Haut. En intensité de fluorescence (u.a.). Milieu. En FRET filtré par le filtre qualité (pourcentage). Bas. En FRET filtré par SVD (u.a.) en ne gardant que les ordres 2 à 10.	72
3.7	Schéma optique du montage en TIRF	75
5.1	Construction du biosenseur de Rac1 DORA.	83
5.2	Construction de "RhoA-2G" seconde génération [Fritz et al., 2013]	83
5.3	Caractérisation de RhoA-2G [Fritz et al., 2013]	84
5.4	Influence de la puissance laser sur sa longueur d'onde	88
5.5	Première partie de l'excitation : réunion des deux faisceaux lasers bleu et vert.	89
5.6	Seconde partie de l'excitation : montage TIRF, mise en forme du faisceau et éclairage Köhler.	90
5.7	Partie imagerie : séparateur chromatique	91
5.8	Schéma du séparateur chromatique	91
5.9	Transmission des filtres pour l'ALEX-FRET. (a) Miroir dichroïque rejetant les lasers 445, 514 et 594. Le dichroïque seul est en bleu, l'ajout de réjecteurs de bandes ("notch") permet de rendre les dichroïques plus sélectifs en orange. Le laser 445 nm est en rouge, celui à 514nm en vert. (b) Détail autour du laser à 515nm.	93
5.10	Les quatre canaux d'intensité de fluorescence obtenus pour L_A et L_D , sur une cellule REF52 exprimant un biosenseur RhoA-2G, sur un motif carré.	94
5.11	Profil d'illumination. (a) Intensité de fluorescence reçue par la caméra, niveaux de gris. (b) et (c) Profils horizontaux d'intensité selon une ligne (moyennage 40 pixels) au milieu du champ de la caméra, canal DA et DD respectivement.	97
5.12	Impact de Wth sur le FRET filtré. (a) Wth=0.1, (b) Wth=0.2, (c) Wth=0.3, (d) Wth=0.4, (e) Wth=0.5 et (f) Wth=0.6	100
5.13	Comparaison du filtre qualité sur une cellule sur motif carré en variant la taille de la gaussienne spatiale (a) sigmaG=0.5 pixels (b) sG=1.0 pix (c) sG=1.5 pix (d) sG=2.0.	101
5.14	Spectres de mTFP1, Venus et Cerulean	102
5.15	Spectre mTFP1 et Venus	102
5.16	Détails pratiques pour le calcul du facteur de calibration. (a) Carte des poids filtrés. (b) Carte de W.E filtrée. (c) Carte de E filtrée. (d) Carte du kernel gaussien. L'intensité est en unités arbitraires selon un LUT plasma.	103
5.17	Résultats comparatifs des trois conditions des bootstrap sur (a) γ^M (b) β^X (c) l'écart type de γ^M (d) l'écart type de β^X , en fonction de la taille de l'échantillon en échelle logarithmique à chaque fois.	104

Introduction

L'ensemble des protéines à l'origine des décisions prises par les cellules forme un réseau d'une immense complexité, et dont la complexité de mieux en mieux connue rend désormais impossible une compréhension simple des différents paramètres. Des efforts croissants ont été consacrés à la recherche de nouveaux acteurs de ce réseau et leurs interactions, sans comprendre et simplifier les comportements globaux du réseau. La conscience de ce problème émerge dans de nombreux domaines. Par exemple, en biologie des bactéries, en combinant des méthodes expérimentales analytiques type spectrométrie de masse à des méthodes "coarse grain" du réseau protéomique métabolique, il a été possible de mettre en évidence des comportements simplifiés de ce réseau malgré sa grande complexité de structure [Hui et al., 2015].

Cette démarche est inspirée de celle qui a vu émerger la thermodynamique après le paradigme de Newton. Un système gazeux est constitué de trop d'acteurs pour pouvoir décrire à l'échelle de chaque molécule leurs positions et vitesses. La thermodynamique exécute une réduction de l'espace des paramètres (positions, vitesses) en construisant un ensemble restreint de grandeurs macroscopiques mesurables (pression, volume, énergies, entropie). Cet ensemble, de dimension considérablement plus réduite, permet de décrire globalement le comportement à l'échelle macroscopique, mais permet d'être prédictif et quantitatif là où la description microscopique était impuissante.

L'objectif global de l'équipe rejoint cet effort pour simplifier notre vision du traitement du signal cellulaire en utilisant des approches développées en physique et sciences de l'ingénieur. Nous nous intéressons donc à des *signaux* plutôt qu'à des *protéines* et cherchons les lois fondamentales de la transduction des signaux par les cellules sous la forme d'analogues des fonctions de transfert.

Notre objet d'étude est la mécanotransduction, un ensemble de mécanismes de signalisation cellulaire par lesquels les cellules eukaryotes ressentent des signaux mécaniques de leur environnement, les "interprètent" et y réagissent. Cela passe par la transduction d'un signal mécanique en un signal biochimique. Ces signaux sont spatio-temporels (*a minima* 3D : x, y , et t), ce qui représente une difficulté supplémentaire qui ne doit pas être contournée car elle est essentielle à ce processus biologique.

Pour aborder expérimentalement cette question, l'équipe a développé ces dernières années des substrats magnéto-actifs pour appliquer une contrainte mécanique contrôlée à des cellules adhérentes. Lors des premiers mois de ma thèse, j'ai produit les résultats indispensables demandés par les rapporteurs, pour valider la preuve de principe et donner un aperçu des réponses cellulaires [Bidan et al., 2018]. Nous disposons donc d'une méthode pour imposer un signal mécanique en entrée de notre *fonction de transfert*. Ces substrats et l'analyse d'image développée permettent également de quantifier la réponse mécanique de la cellule comme les forces qu'elle exerce sur le substrat ou ses changements morphologiques.

Pour mesurer de manière résolue dans le temps et l'espace la réponse biochimique, nous utiliserons des biosenseurs fluorescents. Ce sont des protéines inventées pour rapporter l'activité d'une protéine de signalisation, en général par le phénomène de FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Les séquences sont introduites dans les cellules, qui les produisent donc elles-mêmes. Lors de sa thèse, Alexis Coullomb a développé dans l'équipe une méthode, QuanTI-FRET, pour mesurer l'efficacité de FRET de manière quantitative dans des cellules vivantes [Coullomb et al., 2020], ouvrant donc la voie à la mesure de ces biosenseurs.

Le but initial de mon travail de thèse était de combiner ces deux développements méthodologiques : substrats actifs et FRET quantitatif. Mais, j'ai dû faire face à beaucoup d'imprévus : le microscope est tombé en panne, dont la réparation en deux temps a finalement duré 6 mois, suivis d'une panne du laser principal. Au total, pendant 9 mois en deuxième année de thèse, je n'ai pas pu acquérir, ou j'ai dû jeter, des données expérimentales. A cela se sont ajoutées des difficultés d'ordre biologique, avec l'impossibilité (dans le temps imparti) de réaliser des étalons de calibration nécessaires pour utiliser la méthode QuanTI-FRET avec les biosenseurs choisis. Durant le temps sans microscope, j'ai repris la méthode QuanTI-FRET et notamment les aspects numériques (détails techniques mais chronophages). J'en ai profité pour reprendre la partie optique du montage. J'ai ainsi tenté l'ajout d'une option de TIRF (réflexion totale interne frustrée) qui n'a pas abouti à des résultats significatifs. J'ai également repris toute la chaîne d'excitation laser et de collection du signal de fluorescence, pour tenter d'améliorer le rapport signal à bruit en sortie. J'en ai également profité pour réfléchir aux analyses qu'il faudrait mettre en place pour extraire de l'information des expériences envisagées (corrélations diverses). Ces idées d'analyses n'ont pu être testées que sur quelques exemples en toute fin de thèse, deux exemples en seront donnés à titre de perspectives en fin de manuscrit.

Mon travail de thèse, à l'origine très ambitieux, s'est recentré sur l'adaptation de la méthode QuanTI-FRET en l'absence d'étalons de calibrations pour permettre une *autocalibration* directement avec les images de biosenseurs.

Le manuscrit se décompose en trois grandes parties. Une première partie introductive qui rassemble les éléments bibliographiques nécessaires à la compréhension des différents aspects de ma thèse, comprenant des éléments de fluorescence, sur les réseaux de signalisation, d'analyse d'image. Elle se termine par la description de la méthode QuanTI-FRET telle que développée par Alexis Coullomb. La deuxième partie détaille la méthode d'autocalibration qui simplifie le protocole de QuanTI-FRET en n'utilisant pas d'étalons, cela fait l'objet d'une publication en préparation. Enfin, la troisième partie présente les résultats préliminaires obtenus avec cette nouvelle méthode de calibration sur l'étude de biosenseurs FRET de RhoA, notamment à l'aide d'une méthode de décomposition en valeurs singulières.

Chapitre 1

État de l'art

1.1 Mécanotransduction

Bien qu'adoptant une démarche physicienne qui tait les détails des processus biochimiques élémentaires, il est nécessaire de connaître les processus moléculaires à l'oeuvre dans la mécanotransduction ainsi que ses enjeux. Dans une première partie de ce chapitre, nous présenterons les éléments essentiels de biologie à la compréhension du projet global sur le traitement du signal dans la mécanotransduction.

1.1.1 Rôle et éléments fondamentaux

La cellule doit constamment répondre et s'adapter aux stimuli de son environnement. La croissance, la division, l'apoptose ou la différenciation cellulaire sont autant de programmes que la cellule adapte aux signaux physiques et chimiques de son environnement. Un exemple frappant est celui de la migration. La plupart des cellules peuvent se diriger suivant une réponse spécifique aux composants chimiques qui l'entourent, très souvent suivant des gradients de concentration [Yang et al., 2016], on parle de chemotaxis (chimiotaxie). La cellule convertit le gradient extérieur d'attractant chimique en réponse mécanique (orientation de la migration) *via* le codage du gradient dans les réseaux de signalisation associés. Un autre exemple classique et surprenant est celui de la différenciation cellulaire en fonction de la rigidité du substrat sur lequel elles sont cultivées. [Engler et al., 2006] ont montré que des cellules souches peuvent se différencier en cellules nerveuses, musculaires ou d'os sur des substrats du plus mou au plus rigide.

Lorsque c'est un signal mécanique (force, cisaillement, rigidité), la manière dont la cellule s'adapte et répond est appelée mécanotransduction. Les cellules présentent alors un analogue du "sens du toucher". La mécanotransduction fait intervenir de nombreux réseaux de signalisation moléculaire dont nous allons étudier certains mécanismes. Les récepteurs sont nombreux, on retiendra parmi eux les adhésions focales qui créent le lien avec la matrice extra-cellulaire (MEC, ou substrat) et les jonctions entre cellules par ailleurs (figure 1.1). La migration est un exemple majeur de la manière dont se coordonnent spatialement et temporellement les signaux mécaniques et biochimiques. Les cellules migrent par exemple préférentiellement vers les zones de plus hautes rigidité [Lo et al., 2000]. En particulier, la migration 2D fonctionne de manière simplifiée comme un "tapis roulant" : la cellule crée des liaisons avec le substrat à l'extrémité avant vers où elle veut se déplacer, des forces de traction s'y établissent et croissent (recrutement et renforcement des complexes

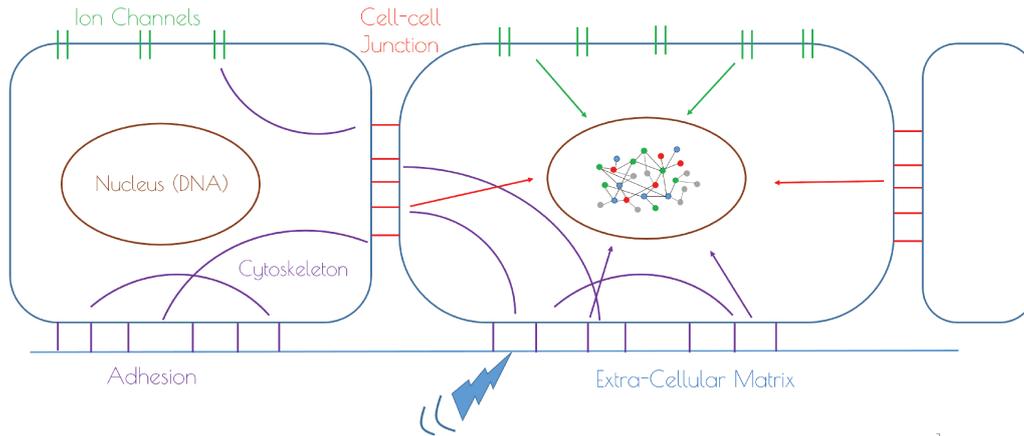


FIGURE 1.1 – Schéma de principe de la mécanotransduction. Les cellules adhèrent sur le substrat (matrice extra-cellulaire) via les adhésions focales qui sont reliées au cytosquelette d'actine, responsable de la dynamique mécanique de la cellule. D'autres signaux provenant des canaux ioniques ou des jonctions cellules sont représentés. Certains de ces signaux, une fois intégrés peuvent provoquer une modulation de l'expression génique.

d'adhésion). Conjointement, les liaisons à l'arrière de la cellule se renforcent également (RhoA y est donc également actif), jusqu'à que des valeurs seuil de différences de forces avant/arrière soient atteintes et que l'arrière se détache, faisant avancer la cellule par un mouvement analogue au "stick-slip" [Hennig et al., 2020]. Ce processus met en lumière la nécessité de coordonner l'avant et l'arrière de la cellule, tant pour le transport des "matériaux" que pour l'information pour le renforcement ou l'affaiblissement des liaisons [Lawson and Ridley, 2018].

Le cytosquelette d'actine Une cellule voit son architecture, ses propriétés mécaniques de déformation et de réponse à la contrainte, ainsi que sa mobilité, assurées par un ensemble d'acteurs et de structures appelé le cytosquelette. C'est un ensemble à la fois statique, qui assure des fonctions de structure physique capable de supporter des efforts, mais aussi hautement dynamique pour pouvoir se réarranger et modeler la forme de la cellule et les forces qu'elle exerce sur son environnement.

Un composant élémentaire et principal de la structure du cytosquelette, particulièrement important pour notre sujet, est l'actine. C'est un filament linéaire composé de sous-unités qui s'assemblent et se désassemblent à ses deux extrémités de manière dynamique. Le contrôle de cette dynamique, ainsi que les super-structures formées par des assemblages de filaments d'actine, est assuré par différentes protéines associées à l'actine et donnent lieu à différentes formes d'actine [Blanchoin et al., 2014]. Tous ces réseaux d'actine sont impliqués dans les mécanismes qui nous intéressent, mais l'actine branchée, pour son rôle dans la mobilité, et les faisceaux parallèles, indispensables dans les filopodes observés dans les protrusions membranaires, sont les acteurs principaux des phénomènes que nous allons étudier.

L'actine est contrôlée en particulier par des protéines particulières appelées GTPases que nous présenterons plus tard. Sa présence aux adhésions focales permet à la fois de mettre la cellule sous tension et d'exercer les forces de traction sur la MEC.

Adhésions focales L'adhésion cellulaire passe par les éléments du cytosquelette associés aux adhésions focales (AFs). Ces ensembles protéiques complexes jouent un premier rôle mécanique en permettant à la cellule de s'accrocher à la MEC et de tirer sur celle-ci. Le lien trans-membranaire est assuré par les intégrines (figure 1.2(a)). Concernant le cytosquelette associé aux AFs, il est composé de l'actine, notamment sous forme de fibres de stress, qui est mise en tension par la myosine II (moteur moléculaire). Cela lui permet d'établir sa structure 3D (qui est sous tension), et d'exercer les forces de traction sur le substrat qui lui permettent de migrer .

Le second rôle des AFs est d'acquérir, traiter et transmettre les signaux à l'origine de la mécanotransduction. Les signaux mécaniques (forces de traction, compression, rigidité des substrats, et leurs équivalents en dynamique) sont perçus à ce niveau, et codés de manière complexe par la chaîne de traitement récepteurs mécaniques-adaptateurs-cytosquelette en une information bio-chimique exploitable par la cellule. Par exemple, Taline et Vinculine ont des changements de conformation 3D qui modifient le comportement du cytosquelette [Rothenberg et al., 2018]. La taline en position ouverte se lie aux intégrines et à l'actine pour supporter de fortes charges ("Force transduction layer" de la figure 1.2). La vinculine en position ouverte se lie à la taline pour supporter également des fortes charges, mais également pour déclencher une voie de signalisation spécifique et déclencher un renforcement des AFs [Rothenberg et al., 2018], [del Rio et al., 2009]. D'autre part, le taux de chargement des myosines sur l'actine permet de différencier les substrats rigides ou peu rigides [Elosegui-Artola et al., 2016], [Gauthier and Roca-Cusachs, 2018], c'est-à-dire que c'est en tirant sur le substrat que la cellule "mesure" sa rigidité.

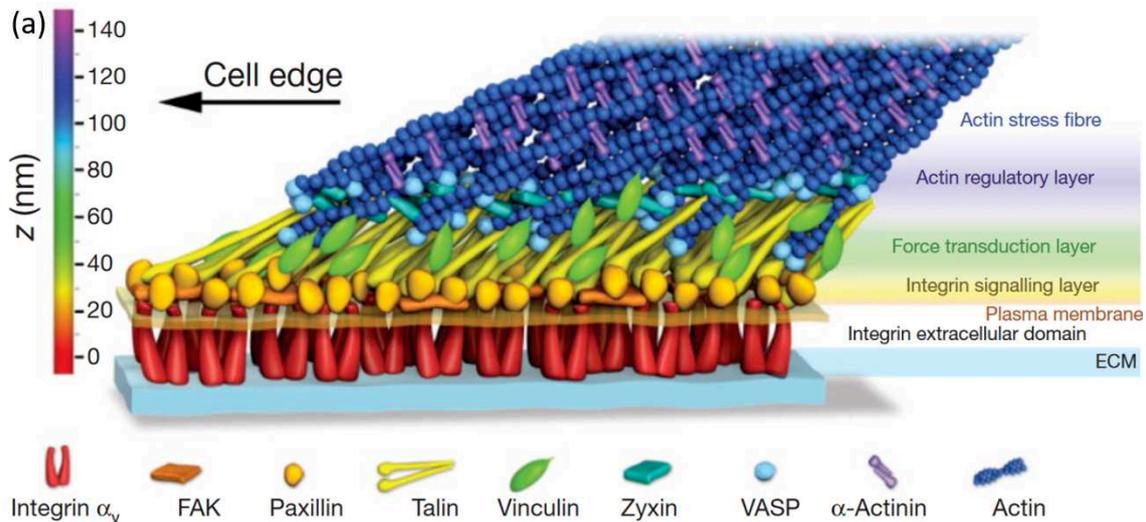


FIGURE 1.2 – Fonctionnement des AFs. Représentation 3D d'une FA. L'accent est mis sur l'organisation en couches selon l'axe z, dont chacune a un rôle dans la transduction du signal mécanique [Kanchanawong et al., 2010].

Réseau de signalisation : kinases et phosphorylation

Une fois que l'étape de traduction d'un signal mécanique en un signal biochimique a eu lieu (principalement au niveau des AFs mais pas uniquement), le signal biochimique doit

être propagé et intégré à d'autres signaux pour provoquer une réponse coordonnée. Ceci est assuré par le réseau de signalisation, c'est-à-dire par une chaîne de réactions, passant par des processus élémentaires de codage de l'information comme la phosphorylation.

Le processus de phosphorylation consiste à transférer un phosphate (PO_4^{3-}) sur un acide aminé (4 types seulement) particulier d'une protéine contenant une séquence spécifique. La source des phosphates est l'ATP (Adenosine TriPhosphate), plus principalement connue comme source d'énergie de l'organisme. Certaines protéines appelées kinases peuvent transférer un phosphate de l'ATP sur un acide aminé contenu dans une séquence spécifique d'une protéine cible. L'ajout de ce phosphate permet à un ensemble d'autres protéines d'interagir avec la protéine modifiée, mettant en action un ensemble d'interactants par réaction en chaîne : ce phosphate code pour une information, l'activité de cette voie de signalisation. Une autre façon de transmettre de l'information au sein de la cellule *via* des réactions chimiques est d'utiliser des molécules capables de basculer d'un état ON à OFF et réciproquement, ce sont par exemple les petites GTPases.

1.1.2 Zoom sur les petites GTPases

Les petites GTPases sont des interrupteurs moléculaires, entre un état ON et OFF. Cette transition passe par un cycle complexe entre les formes GDP- (Di-Phosphate) et GTP-liées (Tri-Phosphate). Il existe quatre grandes familles de petites GTPases [Lawson and Ridley, 2018] :

- Ras : responsable des réactions de transduction du signal en général : croissance, différenciation et apoptose.
- Rab : en charge du transport vésiculaire.
- Ran : en charge du transport nucléaire (analogue nucléaire de Ras).
- Rho : responsable de la régulation du cytosquelette d'actine donc mécanotransduction. C'est à cette sous-famille que nous allons nous intéresser plus particulièrement.

Les Rho GTPases sont les régulateurs en chefs de la réorganisation du cytosquelette, ayant des conséquences sur la migration cellulaire, l'initialisation de la polarisation de fibroblastes en migration, la polarisation de tissus sous flux hydrodynamique [Hall, 1998] [Hall, 2005], le développement neuronal [Hedrick et al., 2016] entre autres. Ces protéines sont étudiées à de nombreuses échelles : de la cellule unique *in vitro* au tissu entier *in vivo*, dans tous types d'organismes (de la bactérie à la cellule humaine eukaryote), et pour tout type cellulaire (de la cellule musculaire aux cellules neuronales [Hedrick et al., 2016]).

Les Rho GEFs (guanine nucleotide exchange factor) catalysent la libération du GDP d'une GTPase remplacé par un GTP, la faisant passer de l'état GDP (inactif) à GTP (actif) (voir figure 1.3). La vitesse de réaction pour passer de l'état GDP à GTP est très faible en soi, il y a absolument besoin de ce GEF pour passer d'un état à l'autre [Saraste et al., 1990]. La présence du phosphate additionnel altère la conformation 3D de la GTPase, la faisant passer d'un état inactif à actif. La réaction d'inactivation de la GTPase n'est pas l'inverse de l'activation et passe par un processus différent. Elle passe par l'hydrolyse de la GTP, libérant un phosphate inorganique, conduisant à la forme GDP de la GTPase. De même, cette réaction bien trop lente requiert une GAP (GTPase-activating protein). Comme dans le cas de l'ADN, le processus de retirer un phosphate est toujours cinétiquement très lent, ce qui assure par ailleurs la grande stabilité de l'ADN en solution [Saraste et al., 1990]. Le rôle de ces "activateurs de GTPases" est donc fondamental pour la régulation des processus physiologiques de la cellule. C'est le rapport entre l'activité des GEF sur celle des GAP (affinité, concentration) qui détermine la proportion de formes GTP sur GDP

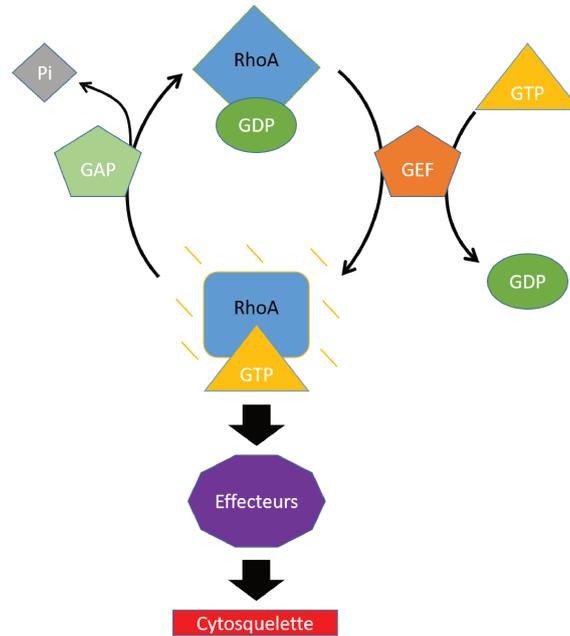


FIGURE 1.3 – Schéma de principe du cycle des petites GTPases, avec RhoA prise en exemple de GTPase. Rôle des GEF et GAP pour changer l'état de RhoA liée au GTP ou GDP.

de la GTPase, et donc le pourcentage d'activité ou d'inactivité de la voie de signalisation associée.

Une fois activée, la GTPase agit sur une ou un ensemble de protéines appelés effecteurs, qui agissent sur le cytosquelette *via* des réactions en cascade. Un effecteur est donc une protéine avec une affinité considérablement plus grande pour la forme GTP que GDP de la GTPase [Goedhart and van Unen, 2019].

Au sein du cytoplasme, des protéines appelés GDI (Guanosine nucleotide dissociation inhibitors) se lient aux Rho-GTPases, les rendant inactives. C'est pour cela que l'activité des Rho-GTPases se révèle principalement à la membrane des cellules où elles se lient avec des complexes qui les activent. Le GDI maintient les Rho-GTPases inactives dans le cytoplasme, et le détachement du GDI permet leur activation, conférant ainsi le caractère spatial de l'action des Rho-GTPases.

Dysfonctionnements et maladies Les petites GTPases sont impliquées dans de nombreuses maladies. Ras est lui-même un oncogène, l'une des origines fréquentes de cancer. A ce titre, de nombreuses recherches contre le cancer portent sur l'inhibition directe de Ras ou du réseau de signalisation associé [Saraste et al., 1990]. Lorsque Ras est oncogène, sa forme mutée est telle que la transition de l'état GTP vers GDP est bloquée, Ras reste dans la forme GTP et est toujours actif.

Très souvent ce ne sont pas les petites GTPases elles-mêmes mais les GEFs et GAPs qui, suite à des mutations, deviennent inactives ou défectueuses et engendrent des défauts de signalisation. Très souvent, la GAP est dysfonctionnelle, et la GTPase est plus souvent dans sa forme active. Dans le cadre de la neurofibromatosis qui crée des structures anormales sur la peau (de type cancers), la neurofibromine, qui est une GAP de Ras, est altérée par une mutation de son gène qui empêche l'hydrolyse du GTP [Saraste et al., 1990].

On peut citer d'autres maladies, qui ne sont pas des cancers, associées à des défauts dans le cycle ON/OFF de ces petites GTPases : scléroses, retinis pigmentosa.

Action de RhoA RhoA fait partie des Rho GTPases qui nous intéressent tout particulièrement, et sera la cible du biosenseur utilisé dans ce travail. Son activité est elle aussi très régulée en espace et en temps. Par exemple, p63RhoGEF, une GEF localisée à la membrane plasmique, active RhoA très rapidement après l'action des récepteurs couplés à une protéine G (GPCRs). Cette action localisée de RhoA au pourtour de la cellule est directement corrélée avec la polymérisation de l'actine [Van Unen et al., 2015]. Cette activité est particulièrement présente dans la formation des blebs (excroissances de membrane de forme sphérique, plutôt signe de mauvais état des cellules dans notre cas), mais aussi pour les AFs avec des intégrines [Lawson and Ridley, 2018]. Une fois encore, l'activité de la voie de signalisation est le résultat complexe de l'action spatio-temporelle des GEFs et GAPs, combinée avec la position précise des petites GTPases.

Action de Rac1 et Cdc42 Dans le cadre de tissus composés de plusieurs cellules, la protéine cadhérine-E inhibe la mobilité des cellules uniques au sein de la MEC. Néanmoins, certaines situations conduisent à une migration cellulaire coordonnée (cancer, réparation de blessure). Rac1 (resp. Cdc42) est classiquement vu comme un initiateur des lamellipodes (resp. filopodes) en régulant positivement ou négativement le complexe Arp2/3 qui crée de l'actine branchée dans les lamellipodes, alors que Cdc42 crée des faisceaux d'actine dans les filopodes. Rac1 joue un rôle important dans l'initiation de la migration de ces cellules, en stabilisant les protrusions vers l'avant de la cellule pour créer un mouvement directionnel et polariser les cellules [Lawson and Ridley, 2018].

1.1.3 Coordination spatio-temporelle de l'activité des Rho GTPases

La cellule se comporte en adéquation avec les informations qu'elle prend dans son environnement extérieur. En ce qui concerne la migration, pour qu'une décision soit prise, il faut qu'une inhomogénéité apparaisse dans ces signaux et soit reflétée dans la signalisation interne. Les premiers générateurs de gradients internes sont les diverses membranes : membrane plasmique et vésicules. Les protéines sont rendues actives à leur proximité seulement puis progressivement inactivées, conduisant à un gradient abrupt (voir figure 1.4B). Une fois accroché à la membrane, la Rho GTPase est activée et peut se lier à son effecteur pour induire la chaîne de cascade de signalisation [Goedhart and van Unen, 2019]. Par ailleurs, GEFs et GAPs forment des complexes qui contrôlent la régionalisation de l'activation des GTPases [Lawson and Ridley, 2018]. Il est important d'étudier le réseau de signalisation des Rho GTPases à leurs échelles caractéristiques. Ainsi, il faut des outils d'étude et de perturbation à l'échelle de la **seconde** et **micrométrique** au vu des travaux réalisés sur les GTPases [Goedhart and van Unen, 2019] (et voir la séquence d'images 1.4C).

La conception traditionnelle de l'activité spatio-temporelle des trois principales Rho GTPases - Rac1, Cdc42 et RhoA - est fondée sur des expériences minimales reposant sur la sur-expression d'une Rho GTPase. Elle stipule (en se restreignant aux fibroblastes) que Rac1 est à l'origine des lamellipodes et des froissements ("ruffles") de membrane, RhoA à l'origine des fibres de stress d'actine et des complexes d'adhésion focale et Cdc42 des filopodes à l'extrémité directrice [Hall, 1998]. Ce paradigme est progressivement remis en cause, ou tout du moins affiné [Goedhart and van Unen, 2019].

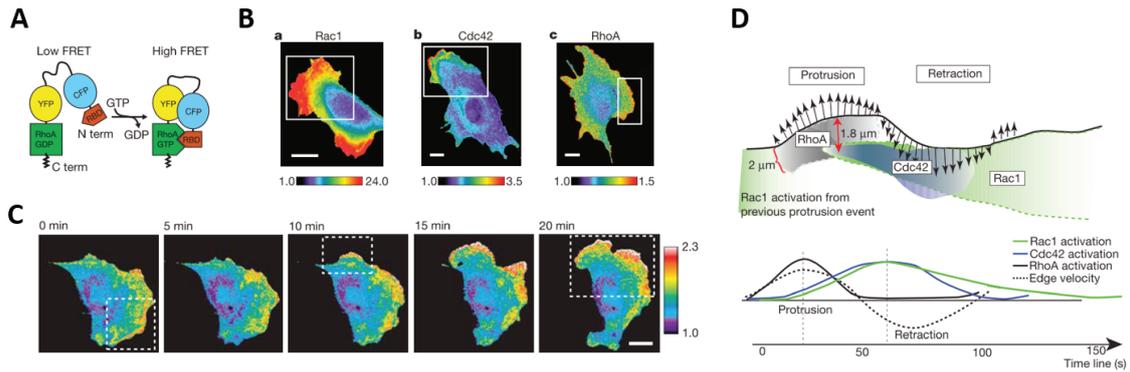


FIGURE 1.4 – **A** La première version du biosenseur de RhoA publiée en 2006 [Pertz et al., 2006]. **B** Images ratiométriques du FRET des biosenseurs de Rac1, Cdc42 et RhoA dans des fibroblastes de souris (MEF) en migration [Machacek et al., 2009]. On observe un gradient de l'activité de ces 3 Rho GTPases, plus intense à la périphérie des cellules. **C** Séquence d'images du ratio de FRET du biosenseur de RhoA dans les mêmes cellules. On voit que le pattern d'activation est très dynamique. Echelle $20\mu\text{m}$. **D** Récapitulatif de la coordination spatio-temporelle de RhoA, Rac1 et Cdc42 à la périphérie de ces cellules MEF en migration sans stimulation chimique. Une coordination différente a pu être observée par la suite après stimulation chimique [Martin et al., 2016].

Concernant le motif spatial d'expression lors de la migration cellulaire, Rac1 est actif principalement à l'extrémité directrice, menant à la polymérisation de l'actine et le renforcement des complexes d'adhésion focale, à l'origine des protrusions de membrane et de la migration cellulaire [Small et al., 2002]. RhoA serait impliqué dans la rétraction à l'arrière de la cellule, en favorisant la contraction du complexe actine-myosine en activant son effecteur ROCK [Hall, 2005]. L'activité de Cdc42 est gouvernée par les motifs spatiaux de ses GEFs, qui créent un fort gradient de Cdc42 qui optimise le choix de la direction lors de la migration. Rac1 nécessite l'action d'une GAP qui est localisée à une extrémité de la cellule, qui crée un gradient étendu de Rac1 qui détermine la vitesse de migration [de Beco et al., 2018].

On sait désormais que la coordination spatio-temporelle de ces trois protéines est plus complexe lorsqu'on ne sur-exprime (ou active constitutivement) pas l'une d'entre elles [Pertz, 2010]. Dans des cellules en migration, [Machacek et al., 2009] ont étudié la coordination spatio-temporelle des trois petites GTPases principales, RhoA, Cdc42 et Rac1 (Figure 1.4). Ils ont montré, dans leurs conditions expérimentales (fibroblastes de souris en migration sans stimulation chimique), que RhoA est activée au bord de la cellule de manière synchrone avec l'activité des protrusions. Cdc42 et Rac1 au contraire sont actifs $2\mu\text{m}$ derrière le bord avec un retard de 40s avec la membrane (Figure 1.4D). Ceci penche pour une action antagoniste de Rac1 et RhoA qui agissent en des zones et temps différenciés. RhoA serait plus impliqué dans l'initiation de la protrusion, tandis que Rac1 et Cdc42 dans le renforcement et la stabilisation des AFs en formation.

Une autre étude des corrélations entre morphologie et activité des petites GTPases a été publiée par [Yamao et al., 2015]. Ils montrent une corrélation entre l'activité de Rac1 et Cdc42 et les protrusions, à savoir que la protrusion **précède** l'activation de Rac1 et Cdc42, ce qui surprend à première vue, mais est en accord avec [Machacek et al., 2009]. A partir de l'activité de Rac1 et Cdc42 en périphérie, l'activité protrusive peut être prédite, à l'échelle

micrométrique, mais aussi à l'échelle de toute la cellule et de populations de cellules par simple intégration des signaux locaux des Rho GTPases. Au niveau macroscopique, les activités comparées de Rac1 et Cdc42 permettent de classer et prédire le comportement des cellules en deux classes, au mouvement aléatoire ou dirigé. Les activités de Rac1 et Cdc42 permettent notamment de prédire l'orientation des cellules polarisées [Yamao et al., 2015]. Enfin, l'activité locale des Rho GTPases semble avoir aussi un impact local sur la morphologie de la cellule, suivant un modèle de "tug of war" (une convolution de l'activité des Rho GTPases et de la fonction de réponse donne l'activité membranaire locale). A noter, que Yamao et al. utilisent des cellules HT-1080 fibrosarcoma qui possèdent la particularité d'une activité protrusive très intense, bien plus forte que celle des fibroblastes. Les résultats très forts et plutôt univoques semblent assez soumis à l'usage de cette lignée cellulaire.

Dans une autre étude utilisant des pseudo-neutrophiles (cellules PLB-985) attirés par des attractants chimiques, Cdc42 est montré comme initiateur des changements de direction, alors que Rac1, RhoA ou Ras n'en sont pas acteurs. Les signaux d'activité de Cdc42 précèdent les changements de direction et déterminent la direction de polarisation des cellules. Spatialement, RhoA et Cdc42 ont des gradients d'activité très marqués et opposés durant la migration, alors que Ras et Rac présentent des gradients faibles [Yang et al., 2016]. Enfin, Cdc42 et RhoA semblent avoir des temps caractéristiques de réponse aux sollicitations chimiques plus faibles que Rac1 et Ras, créant une réponse étalée dans le temps entre les GTPases. Une fois encore, il faut tempérer ce résultat car les neutrophiles sont des cellules immunitaires très particulières, à la migration extrêmement rapide, dotés de capacités de suivre des attractants chimiques considérables.

Au delà de la fonction de transfert, de nombreuses études [Yang et al., 2016], [Martin et al., 2016] montrent la limite d'une étude en simple corrélation entre l'activité moléculaire à un temps t et morphologique à t' . Il est nécessaire d'introduire la notion de mémoire des événements d'activité moléculaire, en s'inspirant de la solution des potentiels retardés. Dans le cadre biologique, il est souhaitable de déterminer la réponse morphologique spatio-temporelle en intégrant un ensemble de variations locales et brutales des signaux moléculaires sur une certaine durée temporelle [Yamao et al., 2015].

1.1.4 Biosenseurs FRET

Il est courant en microscopie de fluorescence de mesurer la concentration ou la localisation d'une protéine et ses dynamiques spatio-temporelles. Ces informations sont très importantes, mais dans le cas des réseaux de signalisation, il est bien plus important de savoir si la protéine étudiée est active ou inactive. C'est l'état d'activation de la GTPase qui renseigne sur le signal biochimique. Une GTPase activée entraîne l'action de ses effecteurs en aval qui mettent en oeuvre la réponse morphologique de la cellule. Alternativement, on pourrait imager la présence des activateurs (GAPs) ou inactivateurs (GEFs, GDI) des GTPases pour mesurer l'activité du réseau [Müller et al., 2020].

Nous avons vu qu'il est crucial de conserver l'information spatio-temporelle et en temps réel de l'activité d'une protéine de signalisation, en particulier des petites GTPases. Une approche classique de biologie cellulaire consiste à lyser les cellules, puis à quantifier le ou les composants d'intérêt. On perd alors toute sensibilité sur la spatialisation de l'activité, et il faut répéter cette opération à divers temps dans des conditions rigoureusement identiques pour reconstruire un profil temporel. L'usage des biosenseurs permet d'aller bien au-delà de ces limitations. Il est possible de réaliser les images 2D et au cours du temps de l'activité des biosenseurs (voir figure 1.4C par exemple). Les études précédemment citées recourent

à des biosenseurs dits "d'activité" dont la fluorescence donne une information sur l'activité d'une protéine et non sur sa localisation. A partir de leur signal de fluorescence, nous devons être capables de distinguer lorsque la protéine est dans un état actif et lorsqu'elle est dans un état inactif. Il n'existe pas que des biosenseurs FRET. Chaque sujet d'étude possède les biosenseurs adaptés au système.

Les premiers biosenseurs fluorescents ont eu pour cible la concentration locale en ions Calcium. Le tout premier biosenseur génétiquement modifié serait un biosenseur luminescent, reposant sur la luminescence naturelle de la luciférase, et a permis de mesurer directement les variations de Calcium dans les mitochondries en 1992 [Rizzuto et al., 1992]. Par la suite, l'équipe de R.Y. Tsien, qui reçut le prix Nobel pour la découverte et le développement de la GFP, a développé le premier biosenseur FRET [Miyawaki et al., 1997]. Celui-ci, dénommé Cameleon, permettait de mesurer les signaux calciques intra-cellulaires en temps réel.

Enfin, il n'y a pas que des biosenseurs FRET d'activité, mais également des biosenseurs FRET de mesure de force [Grashoff et al., 2010]. Le biosenseur de force possède un lien équivalent à un ressort qui relie le fluorophore Donneur et le fluorophore Accepteur. Des expériences de calibration très précises et des constructions de contrôle du biosenseur (sans lien, avec lien double, en changeant la position des fluorophores, ...), permettent de déterminer la raideur du ressort équivalent reliant les fluorophores. Une calibration permet d'obtenir la courbe théorique reliant la variation de FRET et la force exercée sur le biosenseur. La mesure du FRET donne ensuite une mesure de force [Gayrard and Borghi, 2016]. En ce qui concerne les biosenseurs d'activité des petites GTPases, prenons l'exemple du biosenseur de Rac1 nommé "Dora" (utilisé durant cette thèse par ailleurs) [Timmerman et al., 2015]. La figure 1.5 montre la construction de ce biosenseur. Le donneur est ici Cerulean ("Cer") et l'accepteur Venus, ou plus précisément des permutations circulaires de ces deux fluorophores. La séquence du biosenseur contient la GTPase, Rac1, et un effecteur, PAK1. Lorsque Rac1 est liée au GTP, son affinité pour PAK1 devient plus forte et le biosenseur passe en conformation "fermée", ce qui a pour conséquence de rapprocher les deux fluorophores et donc d'augmenter l'efficacité de FRET.

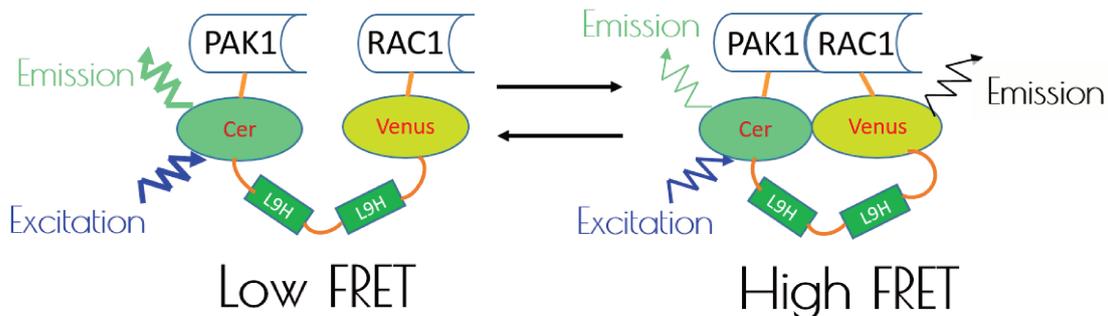


FIGURE 1.5 – Construction du biosenseur de Rac1 "DORA". Le changement d'affinité de Rac1 pour son effecteur PAK1 provoque un changement de conformation du biosenseur qui rapproche les deux fluorophores, augmentant ainsi l'efficacité de FRET [Timmerman et al., 2015]

Design d'un biosenseur FRET

On a vu sur l'exemple du biosenseur "Dora" le principe général d'un biosenseur FRET : le changement d'activité de la protéine cible doit provoquer un changement de conformation qui rapproche les deux fluorophores. La construction du biosenseur est primordiale. C'est un travail minutieux et d'une grande complexité, réalisé par des spécialistes. Les enjeux sont de parvenir à la plus grande gamme dynamique de FRET : entre une activité nulle et maximale de la protéine cible, il faut que le FRET varie le plus possible [Palmer and Tsien, 2006]. Tout commence bien sûr par le design général du biosenseur : en général pour les GTPases la séquence de la GTPase est incluse dans le biosenseur alors que pour les kinases on peut mettre la séquence cible de la phosphorylation et une séquence qui reconnaît cette phosphorylation. Dans ce dernier cas, on va sonder la réaction de phosphorylation de la kinase. D'autres approches permettent de sonder directement le changement de conformation de la kinase elle-même [Bertolin et al., 2016]. Les fluorophores peuvent être placés de part et d'autre des éléments provoquant le changement de conformation pour amplifier le changement de distance. Cela dit, ce n'est pas toujours le schéma le plus intuitif qui a l'effet le plus important. En pratique il est quasiment impossible de prédire quel design sera le plus efficace et le développement d'un biosenseur passe par des étapes d'optimisation.

En anticipant sur le paragraphe suivant décrivant le phénomène du FRET en détails, nous pouvons déjà noter que le FRET entre protéines fluorescentes permet de mesurer des distances comprises entre 3 et 8nm. C'est ce changement de distance qu'il faut viser avec le changement conformationnel que l'on veut détecter. Une limitation existe cependant, les protéines fluorescentes type GFP ont une structure en tonneau de 3nm de diamètre avec le chromophore en son centre. Le FRET entre protéines fluorescentes ne pourra donc pas sonder des distances inférieures à 3nm entre chromophores dans le cas idéal des deux protéines fluorescentes collées l'une à l'autre ; en pratique certainement davantage que 3nm. On le verra également dans la suite, les propriétés photophysiques des fluorophores utilisés influent fortement sur l'efficacité de FRET, notamment le recouvrement de leurs spectres. Ainsi, le choix de la paire de fluorophores est cruciale. L'optimisation va jusqu'à tester des permutations circulaires de la séquence d'acides aminés de chaque fluorophore comme c'est le cas pour le biosenseur présenté en figure 1.5. Finalement, la structure du biosenseur joue sur la façon dont il sera maturé et exprimé dans la cellule, et notamment transmis au cours des divisions cellulaires. Comme la majorité des fluorophores est issue de variations de la Green Fluorescent Protein (GFP), ils possèdent des homologies de séquences très fortes. Cela crée des recombinaisons lors des divisions cellulaires, et rend complexe souvent la réalisation de lignées stables exprimant le biosenseur. L'optimisation d'un biosenseur est propre à une lignée cellulaire.

En deux mots, nous venons de voir que le développement des biosenseurs en est encore à ses débuts. Il faut aussi garder en tête que leur utilisation est elle aussi critique, car de nombreux artefacts peuvent brouiller le bon fonctionnement des réseaux de signalisation associés.

De nombreux mécanismes de compensation se mettent place pour contrer les modifications qui peuvent être apportées au réseau de signalisation. Lors d'une sur-expression d'une Rho GTPase, les quantités de Rho GTPase ajoutées perturbent les quantités endogènes suite à une compétition entre ces deux protéines et au réservoir limité de GDI qui leur est commun

[Boulter et al., 2010]. De même dans le cas de techniques de Knock-out très largement utilisées en biologie cellulaire, un phénomène d'adaptation se met en place qui rend les résultats plus difficiles à interpréter.

D'autre part, le biosenseur utilisé doit être d'une sensibilité similaire à la protéine qu'il cherche à représenter. Pour ne pas modifier les équilibres chimiques entre les substrats et les produits de la protéine cible, le biosenseur doit présenter la même spécificité aux mêmes substrats. La cinétique de réaction du biosenseur (entre le changement de conformation de la protéine cible et la variation de FRET associée) doit être négligeable devant celle des phénomènes biochimiques étudiés. Enfin, le biosenseur peut comporter une partie qui le localise à certains endroits (ancrage à la membrane pour limiter le bruit de fond du cytosol) ou certaines organelles, pour améliorer le SNR ou se rapprocher de la localisation de la protéine endogène [Palmer et al., 2011].

1.2 Fluorescence et FRET

Le *Transfert d'Énergie par Résonance* ou FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est un phénomène particulier de la fluorescence que nous avons évoqué pour présenter les biosenseurs. En biophysique, ce phénomène a d'abord été beaucoup utilisé dans des expériences de molécule unique où ses performances ont été poussées à l'extrême. Nous verrons ensuite ce qu'il en est dans des expériences en cellules ou en tissu.

1.2.1 Motivation

Le FRET en molécule unique L'utilisation du FRET quantitatif en biophysique vient surtout des expériences *in vitro* avec des protéines purifiées et en particulier des méthodes de "molécule unique". Dans ce cas, puisque l'on observe une seule paire de fluorophores à la fois, il est possible de compter les photons et effectivement de mesurer des distances nanométriques [Lerner et al., 2018]. La mesure se fait en solution en ayant en général immobilisé la protéine marquée sur une surface. Cela permet donc de mesurer des éléments de structure impossible à visualiser en RMN (mesure d'ensemble) ou cristallographie. Par exemple, Muschielok et al. ont adapté le principe du GPS (Global Positioning System) à l'échelle d'une protéine [Muschielok et al., 2008] pour déterminer la position d'une partie flexible de l'ARN au cours de la transcription par la ARN polymérase. Ils ont combiné des expériences où les "fluorophores satellites" étaient positionnés en différents points connus de la structure et mesuré le FRET avec le "fluorophore antenne" situé sur la partie dont la position était inconnue, une triangulation comparable au GPS donnait la région la plus probable en 3D.

Un autre intérêt majeur du FRET est qu'il permet de mesurer des distances nanométriques avec une résolution temporelle venant de l'optique, c'est-à-dire de l'ordre de la centaine de millisecondes. On a ainsi accès à la dynamique conformationnelle d'enzymes et on peut visualiser véritablement le mécanisme moléculaire. Par exemple, Kapanidis et al. ont démontré le mécanisme moléculaire de l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase [Kapanidis et al., 2006]. En allant décortiquer les dynamiques observées à l'échelle de chaque molécule, certains groupes arrivent même à obtenir non seulement les différentes conformations adoptées par une enzyme mais aussi les constantes de vitesse entre chaque conformation [Kim et al., 2014].

Le FRET en cellules ou dans le vivant En configuration *in vivo* dans des cellules vivantes, le FRET est le plus souvent utilisé pour des échantillons dont la concentration en couples donneur/accepteur est bien trop importante pour être dans une configuration de molécule unique / FCS. Dans chaque pixel imagé, il y a en moyenne bien plus qu'un couple, ainsi le FRET est une mesure statistique de l'efficacité de FRET d'une population de fluorophores. L'extension du FRET au domaine *in vivo* a longtemps été jugée difficile, et nous montrons dans ce travail que c'est réalisable dans des cellules vivantes avec des méthodes d'analyse et de calcul du FRET semblables à celles développées en molécule unique.

Les biosenseurs FRET permettent de mesurer des forces à l'échelle du pN *in vivo* [Gayrard and Borghi, 2016]. Un biosenseur FRET est utilisé pour mesurer la force exercée à l'échelle moléculaire au niveau des adhésions focales [del Rio et al., 2009] et [Grashoff et al., 2010]. Il révèle le mécanisme de mécanotransduction au niveau des AFs mettant en jeu la taline et la vinculine. Dans ce cas, les fluorophores donneur et accepteur sont reliés entre eux par un lien élastique, au niveau de la partie qui s'étire de la vinculine [Grashoff et al., 2010].

A l'échelle d'un tissu entier, le FRET a été mesuré dans des souris. Des souris exprimant nativement un biosenseur de RhoA sont directement imagées pour déterminer le comportement spatio-temporel de RhoA *in vivo* [Nobis et al., 2018]. Des contraintes en compression sont utilisées pour étudier la réponse de RhoA lors de la formation des ostéocytes. Les biosenseurs FRET sont encore relativement peu utilisés à l'échelle de la cellule voire du tissu ou de l'animal, comparé à la fluorescence simple. Cela est probablement dû à la difficulté à mettre en place les expériences, les biosenseurs et à avoir des résultats fiables.

1.2.2 Principes physiques

Avant de décrire la méthode de FRET quantitative développée dans l'équipe, revenons d'abord aux principes physiques.

La fluorescence Toute molécule possède des états électroniques, états quantiques dans lesquels peut se trouver le nuage électronique de la cellule. La représentation usuelle de ces états en fluorescence est appelée diagramme de Jablonski et est présentée figure 1.6.

Chaque état électronique est représenté par une barre épaisse (niveau fondamental) et un ensemble de barres fines (levée de dégénérescence liée aux états vibrationnels).

Lorsque la molécule fluorophore reçoit le rayonnement laser, l'énergie acquise fait passer le système de l'état fondamental S_0 à l'état excité S_1 ou un de ses sous-niveaux (absorption, temps de vie femtoseconde). Une partie de cette énergie est perdue (ou convertie) en énergie mécanique (chocs) par relaxation vibrationnelle qui ramène le système au niveau fondamental de l'état S_1 (temps caractéristique picoseconde). Ce processus est extrêmement rapide. Ensuite le système a deux voies de désexcitation radiative pour revenir au fondamental. Soit il passe par des états triplets dits "noirs", sans émission de lumière, puis se désexcite par phosphorescence (processus lent, temps de vie 10^{-3} s à plusieurs heures en tant que transitions "interdites"). Soit il émet un photon et relaxe vers un sous-niveau de l'état fondamental (fluorescence, durée de vie typique nanoseconde 10^{-9} s). Il revient finalement à S_0 à nouveau par relaxation vibrationnelle non radiative. Une relaxation non-radiative de S_0 à S_1 est également possible mais les fluorophores sont optimisés pour utiliser principalement la voie de fluorescence. Suite aux transitions non radiatives ou aux chocs avec d'autres molécules, le fluorophore peut être définitivement modifié, c'est le phénomène

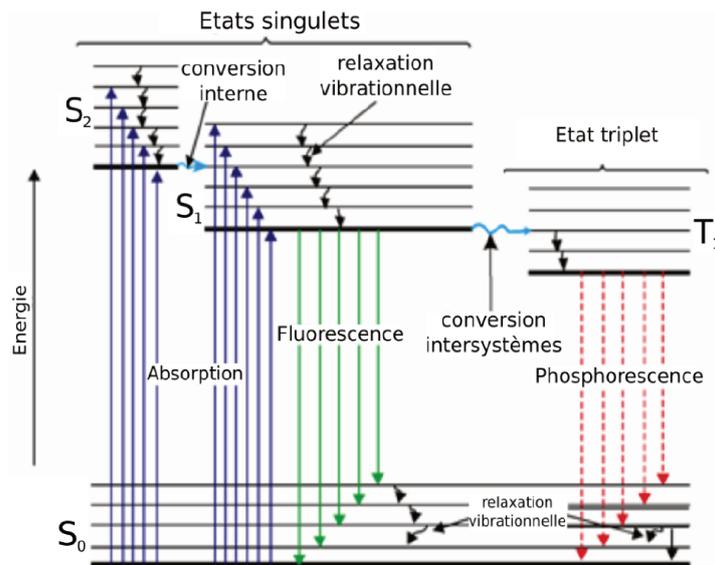


FIGURE 1.6 – Diagramme de Jablonski, d'après [Coullomb, 2018]. Après l'absorption de photons d'énergie suffisante, la fluorescence est une voie de relaxation radiative d'un fluorophore.

de désactivation (*quenching*).

Cette présentation succincte permet d'appréhender quelques propriétés de la fluorescence :

- Un fluorophore ne peut pas être excité par un rayonnement d'énergie trop faible. Autrement dit, pour un fluorophore excitable dans le bleu, il ne peut pas être excité par un rayonnement dans le rouge.
- Loi de Kasha : la relaxation vibrationnelle est si rapide que le spectre d'émission ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation.
- Comme les niveaux fondamentaux et excités ont plusieurs sous-niveaux (un quasi continuum), on parle de spectres d'excitation et d'émission : le fluorophore peut être excité à différentes longueurs d'ondes et émettre à plusieurs, selon une courbe appelée spectre qui traduit l'efficacité de ces processus.
- Décalage de Stokes : le photon émis est d'énergie inférieure au rayonnement incident. Le spectre d'émission est décalé vers les longueurs d'ondes plus élevées.
- Principe de Franck-Condon : le noyau est considéré immobile durant le processus de fluorescence. Les niveaux vibrationnels des états excités sont semblables à ceux de l'état fondamental. Comme ils définissent la forme du spectre, spectre d'excitation et d'émission sont quasi-identiques, images en miroir.

Chaque fluorophore est caractérisé par :

- son coefficient d'extinction molaire ϵ
- son rendement quantique ϕ
- son temps de vie τ

Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Si l'on approche suffisamment deux fluorophores l'un de l'autre, il peut y avoir une troisième voie de désexcitation depuis l'état excité. Un transfert d'énergie a lieu entre ces deux fluorophores, appelé Förster Resonance Energy Transfer (FRET).

Si un de ces fluorophores, appelé donneur (D), a son spectre d'émission qui recouvre en partie le spectre d'excitation de l'autre, accepteur (A), alors on peut considérer qu'il y a interaction entre dipôles electro-magnétiques. La théorie générale de cette interaction donne le taux de transfert d'énergie comme :

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \times \frac{9000 \ln(10)}{128 \pi^5 N_A n^4} \times \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1.2.1)$$

avec :

- r la distance D-A
- Q_D rendement quantique du fluorophore donneur en absence de l'accepteur
- κ^2 orientation relative des deux dipôles
- τ_D temps de vie du donneur en l'absence de l'accepteur
- N_A nombre d'Avogadro
- n indice de réfraction du milieu (environ 1.4 dans le cytoplasme)
- F_D densité spectrale d'émission normalisée de D
- ϵ_A coefficient d'extinction molaire de A

On retiendra de cette formule qu'elle dépend de r la distance séparant les deux fluorophores. Cette dépendance est très forte comme pour toute interaction dipôle-dipôle ($1/r^6$). On définit R_0 le rayon de Förster tel que $k_T(R_0)$ vaut la moitié du taux maximal (voir figure 1.7). R_0 vaut entre 5 et 6nm pour des paires de protéines fluorescentes. On peut alors réécrire :

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1.2.2)$$

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

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad (1.2.3)$$

E peut être mesurée avec des ratios d'intensité ou avec les temps de vie des fluorophores Donneur.

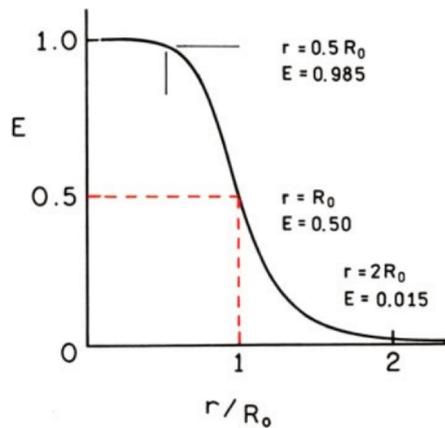


FIGURE 1.7 – Efficacité de FRET en fonction de la distance, rayon de Förster. D'après [Lakowicz, 2013]

La figure 1.7 illustre la radicalité du phénomène de FRET. E varie de 1 à presque 0 en à peine deux fois le rayon de Förster. Le FRET est extrêmement sensible à la distance

r, et la pente de $E(r)$ très forte illustre cette sensibilité extrême qui permet la mesure de distance infimes. La contrepartie est que la construction des paires FRET est extrêmement complexe, r devant se trouver entre 3 et 8nm, alors que les fluorophores sont composés d'un chromophore entouré d'une structure 3D en tonneau de la protéine fluorescente, de diamètre $\approx 3\text{nm}$.

Concrètement, les fluorophores et l'assemblage d'un donneur et d'un accepteur adéquat requièrent des compétences bio-chimiques très importantes. Nous nous contenterons de choisir des biosenseurs déjà développés et publiés.

1.2.3 Les différentes méthodes de mesure du FRET en cellules

Depuis les années 2000, le FRET s'est imposé comme une méthode extrêmement précise pour mesurer des distances aux échelles nanométriques. De nombreuses méthodes permettent une mesure plus ou moins quantitative de l'efficacité de transfert, E.

FRET ratiométrique sans corrections La méthode la plus simple à mettre en oeuvre consiste à manipuler des jeux de filtres et mesurer des ratio d'intensité de fluorescence. On utilise deux jeux de filtres : le premier permet d'illuminer le couple FRET à la longueur d'onde d'excitation optimale du donneur et de collecter l'intensité de fluorescence émise par le donneur dans son canal usuel de détection I_{DD} . Le deuxième jeu de filtres permet d'exciter toujours le donneur, mais cette fois le filtre d'émission est changé pour collecter la fluorescence émise par l'accepteur dans son canal usuel de détection I_{DA} .

Il existe une grande diversité de méthodes et de facteurs de correction pour calculer ensuite l'efficacité de FRET, faisant en général intervenir le ratio $\frac{I_{DA}}{I_{DD}}$ ou $\frac{I_{DA}}{I_{DD}+I_{DA}}$. Ce rapport veut déterminer la proportion d'énergie transmise à l'accepteur par le donneur sur l'énergie lumineuse totale transmise. Néanmoins, elle souffre de différents biais qui rendent cette interprétation inexacte [Berney and Danuser, 2003]. Ces biais sont explicités dans la partie 1.3.1, mais on peut brièvement citer les débordements de spectres et les excitations directes des accepteurs par le donneur, ainsi que les différences de rendement quantique et d'efficacité de détection de fluorescence entre les deux fluorophores. On ne peut donc pas interpréter ce ratio simplement comme une efficacité de FRET, mais il faut le corriger, c'est ce que propose la méthode QuantTI-FRET développée précédemment dans l'équipe[Coullomb et al., 2020].

Les avantages de cette méthode, outre sa simplicité de mise en oeuvre sur un microscope conventionnel d'épifluorescence, sont sa robustesse (calibration avec une seule équation), sa justesse (méthode quantitative, valeurs de E indépendantes de l'instrument), son relativement faible coût, et la rapidité d'exécution pour observer des phénomènes dynamiques.

FLIM C'est la méthode réputée être la plus exacte et qui souffre le moins de biais d'interprétations car elle ne dépend que du fluorophore donneur. Mais c'est également la plus complexe et coûteuse à mettre en oeuvre, car elle requiert une maîtrise extrême de la synchronisation des instruments d'acquisition. Pour cela, elle fait appel à des outils électroniques pointus.

Comme le FRET est une autre voie de désexcitation qui s'offre au fluorophore donneur, il affecte le temps de vie des donneurs. Ainsi la loi d'évolution temporelle (simplifiée) de la population des fluorophores dans l'état excité devient :

$$S1(t) = S1(t = 0) e^{-t/\tau} \tag{1.2.4}$$

où τ est le temps de vie du donneur en présence de l'accepteur. En l'absence d'accepteur, le temps de vie du donneur est $\tau_D = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$. τ_D est composé du taux d'émission k_r habituel ("radiatif" pour la fluorescence), ainsi que k_{nr} taux de transitions non radiatives (chocs). En présence d'accepteur, dans le cas du FRET donc, on ajoute le terme k_T dû à ce transfert ("T") non radiatif : $\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_D} + k_T$.

Ainsi l'efficacité de FRET peut s'écrire comme le rapport $E = \frac{k_T}{\frac{1}{\tau_D} + k_T}$.

L'efficacité de FRET peut alors être mesurée en comparant le τ des donneurs en présence et absence des accepteurs. La difficulté et le besoin de matériel très précis dans le temps se comprend ici : il faut mesurer des temps de l'ordre de 10^{-9} s avec des astuces sur la manière de découper la décroissance des fluorophores (soit en temporel, soit en fréquentiel) [Padilla-Parra et al., 2009].

La grande force de cette méthode, contrairement aux autres, est son indépendance vis à vis de l'intensité de fluorescence absolue, la puissance du laser, la concentration en fluorophores, les différences entre chemins optiques du ratiométrique. En revanche, le τ peut être influencé par différents facteurs de l'environnement (pH, réactions d'oxydo-réduction) et créer du photo-blanchiment. L'autofluorescence peut aussi biaiser le résultat du FRET. En revanche, le principal défaut de cette méthode, et qui entre autres ne nous l'a pas faite choisir, est sa lenteur d'exécution. La résolution temporelle ne descend pas sous la minute dans le cas conventionnel avec ajustement de courbe pour calculer τ . Plusieurs méthodes récentes permettent de s'affranchir de l'ajustement de courbe, en particulier le fastFLIM développé par l'équipe de M. Tramier peut en principe imager à 1s par image [Leray et al., 2013].

Microscopie de polarisation Le FRET se manifeste également par l'anisotropie de la fluorescence émise par le donneur. En tant qu'interaction dipôle-dipôle, le facteur κ^2 dans la formule du taux de transfert d'énergie (équation 1.2.1) prend en compte l'orientation relative entre donneur et accepteur. De même, le dipôle Donneur est en interaction avec le laser d'excitation et son orientation joue. Si le laser d'excitation est polarisé, seuls les fluorophores donneurs alignés avec la direction de polarisation seront excités. Ils exciteront alors des fluorophores accepteurs avec un angle différent prenant en compte le temps de diffusion angulaire des donneurs, qui créeront alors une fluorescence émise dont la polarisation est différente de celle de l'excitation. En filtrant les rayonnements émis de même polarisation que celle de l'excitation, on conserve la fluorescence émise par FRET. En quantifiant la perte de polarisation de la fluorescence, on a accès à l'efficacité de FRET. L'avantage principal de cette méthode est sa capacité à quantifier l'homo-FRET, *ie* le FRET entre fluorophores identiques. En revanche, cette méthode a besoin de beaucoup de photons, et de bons rapports signal-à-bruits sont difficiles à obtenir avec des biosenseurs dans des cellules vivantes.

Photo-blanchiment des fluorophores Le FRET peut également être vu comme la diminution de la fluorescence des donneurs en présence des accepteurs. Le photo-blanchiment des accepteurs rétablit la fluorescence des donneurs et ce gain de fluorescence est lié au FRET. Le jeu sur le photo-blanchiment de la population d'accepteurs permet la mesure du FRET sous certaines hypothèses.

Cette méthode est très limitée, notamment car elle détruit les fluorophores accepteurs, et empêche ainsi toute étude au cours du temps.

1.3 Mesure de FRET quantitatif en cellules vivantes : QuanTI-FRET

La méthode développée dans l'équipe, QuanTI-FRET, est une variation du FRET ratio-métrique, c'est-à-dire qu'elle est basée sur la mesure des intensités de fluorescence relatives du fluorophore donneur et du fluorophore accepteur. Un travail théorique a été fait afin de calibrer chaque situation expérimentale et de corriger les intensités de fluorescence pour obtenir un rapport de FRET quantitatif, c'est-à-dire reproductible sur un autre instrument ou dans une autre équipe. Elle est inspirée des travaux réalisés en molécule unique [Kapanidis et al., 2006] et rejoint une approche développée en parallèle par la communauté de microscopistes travaillant à l'échelle de la cellule [Gordon et al., 1998]. Cette partie reprend les travaux d'Alexis Coullomb relatés dans sa thèse [Coullomb, 2018] et dans son article [Coullomb et al., 2020].

1.3.1 Théorie

Pour obtenir le plus d'informations possible de l'échantillon, nous suivons un schéma d'excitation multiple notamment introduit par Kapanidis et al. en molécule unique [Kapanidis et al., 2006]. En deux mots, en alternant rapidement la longueur d'onde d'excitation et en divisant l'émission en deux canaux sur la caméra, nous obtenons en deux clichés successifs quatre images (voir figure 1.8) :

1. I_{DD} intensité mesurée dans le canal "donneur" après excitation à la longueur d'onde du donneur,
2. I_{DA} intensité mesurée dans le canal "accepteur" après excitation à la longueur d'onde du donneur,
3. I_{AA} intensité mesurée dans le canal "accepteur" après excitation à la longueur d'onde de l'accepteur,
4. I_{AD} intensité mesurée dans le canal "donneur" après excitation à la longueur d'onde de l'accepteur.

En pratique, l'excitation est composée de deux lasers d'intensité L_D et L_A dont les longueurs d'ondes sont choisies pour exciter au mieux les fluorophores Donneur et respectivement les fluorophores Accepteur (voir figure 1.9). Les deux canaux d'émission obtenus sur la caméra correspondent à l'intensité de fluorescence qui a été divisée spectralement de sorte que dans le canal "donneur" on collecte principalement la fluorescence émise par les fluorophores Donneur et respectivement, dans le canal "accepteur" on collecte principalement la fluorescence émise par les fluorophores Accepteur (voir figure 1.9 et en matériel et méthodes, partie 5.2.1).

La quatrième image I_{AD} ne contient aucune information : le rayonnement fluorescent émis ne peut être qu'à une longueur d'onde supérieure à celle de l'excitation, il n'est donc pas possible que l'accepteur émette un signal dans le canal donneur lorsqu'il est excité par L_A . Elle est donc rejetée. En principe, seuls I_{DD} et I_{DA} seraient suffisant pour calculer l'efficacité de FRET. Ce serait le cas si les photons provenant du donneur et de l'accepteur étaient détectés avec la même efficacité et uniquement dans leur canal respectif. En pratique, ce n'est pas réalisable et plusieurs corrections doivent être envisagées pour obtenir des valeurs de FRET reproductibles et indépendantes de l'instrument. La troisième image, I_{AA} , est indépendante de l'efficacité de FRET mais est nécessaire pour calculer toutes les corrections nécessaires.

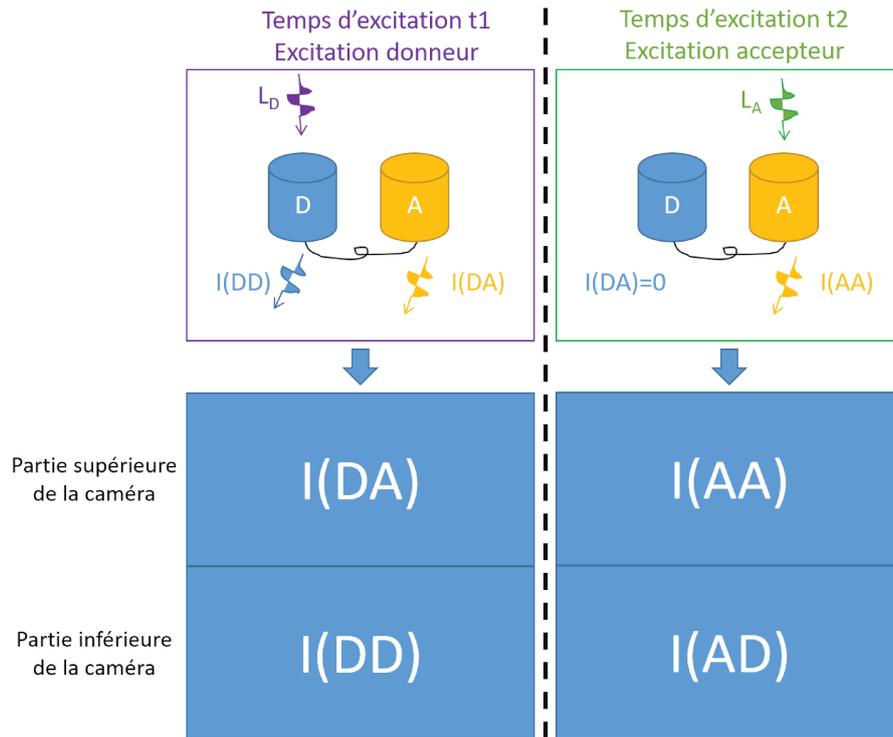


FIGURE 1.8 – Représentation schématisée de la séquence d’acquisition d’images. Dans un premier temps, on excite le donneur avec le laser L_D et on collecte simultanément dans les canaux d’émission donneur (I_{DD}) et accepteur (I_{DA}). Dans un deuxième temps, on excite directement l’accepteur avec le laser L_A et l’on collecte à nouveau dans les deux canaux d’émission, mais seule l’image I_{AA} est informative. L’acquisition simultanée des deux canaux d’émission est obtenue en les séparant chromatiquement et les repositionnant côte à côte sur la caméra (figurée en bleu).

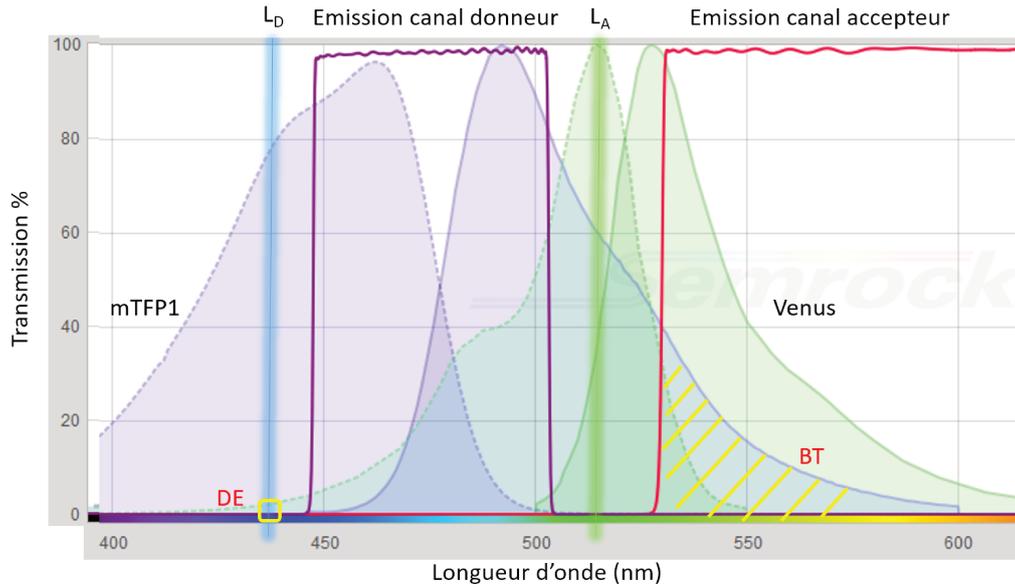


FIGURE 1.9 – Illustration des recouvrements de spectres. Les spectres d'absorption (lignes pointillées) et d'émission (lignes pleines) pour le fluorophore donneur mTFP1 (mauve) et pour le fluorophore accepteur Venus (vert) sont tracés en fonction de la longueur d'onde. Figurent également les longueurs des lasers d'excitation L_D et L_A et les filtres d'émission des deux canaux d'imagerie. On a explicité la zone responsable de l'excitation directe (DE) et celle responsable de la fuite spectrale du donneur dans le canal de l'accepteur (BT).

Du fait de la caméra qui acquiert les images, notre unité de raisonnement minimal est le pixel. Celui-ci est plus petit que la résolution optique. Il fait $0.125 \times 0.125 \mu\text{m}^2$, et contient donc une grande quantité de fluorophores. D'autre part, l'échelle de temps de la fluorescence est la nanoseconde alors que nous acquérons les images à l'échelle de la seconde. Nous aurons donc un raisonnement probabiliste et sur des populations. Détaillons maintenant les contributions à l'origine des trois images :

* I_{AA} L'intensité collectée sur la caméra provient des n^A fluorophores contenus dans le volume d'observation conjugué avec le pixel de la caméra, qui émettent un signal de fluorescence $L_A \times \sigma_A^A \phi_A$ selon l'intensité qu'ils reçoivent du laser (L_A) et leur rendement quantique conjugué à leur section efficace ($\sigma_A^A \phi_A$) en tant que dipôles soumis à un rayonnement, et ceci est pondéré par l'efficacité de détection (η_A^A).

$$I_{AA} = n^A L_A \times \sigma_A^A \phi_A \eta_A^A \quad (1.3.1)$$

* I_{DD} De même :

$$I_{DD} = n^D L_D \times \sigma_D^D \phi_D \eta_D^D \times (1 - E) \quad (1.3.2)$$

à la différence près qu'il faut prendre en compte la probabilité de transférer l'énergie par FRET E . Les photons émis à la suite de FRET sont détectés dans l'image I_{DA} et non dans I_{DD}

* I_{DA} C'est dans cette image que l'on s'attend à mesurer le FRET puisqu'elle correspond à la fluorescence collectée dans le canal accepteur après excitation à la longueur d'onde du donneur. Cette image est plus complexe que les deux précédentes car trois contributions se somment, le signal venant du phénomène de FRET mais aussi de deux termes de fuites spectrales :

- l'émission des accepteurs excités par le transfert d'énergie FRET avec la probabilité E

$$n^D L_D \times \sigma_D^D \phi_A \eta_A^A \times E \quad (1.3.3)$$

- l'émission des donneurs, qui n'ont pas transféré d'énergie par FRET mais dont une partie de la fluorescence est collectée dans le canal accepteur

$$n^D L_D \times \sigma_D^D \phi_D \eta_A^D \times (1 - E) \quad (1.3.4)$$

(terme de Bleed Through "BT")

- l'émissions des accepteurs qui ont une certaine probabilité d'être directement excités par le laser donneur (L_D)

$$n^A L_D \times \sigma_D^A \phi_A \eta_A^A \quad (1.3.5)$$

(terme de Direct Excitation "DE")

Ainsi on écrit :

$$I_{DA} = n^D L_D \sigma_D^D \phi_A \eta_A^A E + n^D L_D \sigma_D^D \phi_D \eta_A^D (1 - E) + n^A L_D \sigma_D^A \phi_A \eta_A^A \quad (1.3.6)$$

avec les notations suivantes :

- n^i la quantité de fluorophores d'espèce i (A pour accepteur ou D pour donneur)
- L_i intensité du laser d'excitation pour l'espèce i
- σ_i^j section efficace d'absorption du fluorophore j à la longueur d'excitation i
- ϕ_i rendement quantique du fluorophore i
- η_i^j efficacité de détection d'un photon émis par le fluorophore j dans le canal d'acquisition i
- E efficacité ou probabilité de FRET

La connaissance du triplet d'images (I_{DD} , I_{DA} , I_{AA}) et de l'excitation est insuffisante pour déterminer E (il y a trop d'inconnues dans les combinaisons de n , σ , ϕ et η). La détermination théorique de certains paramètres photo-physiques est possible, avec des moyens de physique quantique, mais ces paramètres dépendent tellement de l'environnement du fluorophore que ce ne serait pas plus précis de les calculer *ab initio*. Nous utilisons donc une approche pragmatique pour éviter la détermination systématique des 12 inconnues.

Tout d'abord, nous pouvons simplifier les expressions en définissant deux facteurs de correction pour les fuites spectrales α^{BT} (pour le "bleedthrough" du donneur) et δ^{DE} pour l'excitation directe de l'accepteur. De plus, nous introduisons un facteur pour corriger les différences d'efficacité de détection dans les deux canaux γ^M ainsi qu'un autre pour corriger les différences d'efficacité d'excitation par les deux lasers β^X :

$$\alpha^{BT} = \frac{\eta_A^D}{\eta_D^D}, \delta^{DE} = \frac{L_D \sigma_D^A}{L_A \sigma_A^A}, \gamma^M = \frac{\phi_A \eta_A^A}{\phi_D \eta_D^D} \text{ et } \beta^X = \frac{L_A \sigma_A^A}{L_D \sigma_D^D} \quad (1.3.7)$$

Ainsi, les notations sont simplifiées et en inversant les équations 1.3.1, 1.3.2 et 1.3.6, nous obtenons la probabilité de FRET pour chaque pixel :

$$E = \frac{I_{DA} - \alpha^{BT} I_{DD} - \delta^{DE} I_{AA}}{I_{DA} - \alpha^{BT} I_{DD} - \delta^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD}} \quad (1.3.8)$$

D'autre part, comme introduit par Lee et al. [Lee et al., 2005], nous pouvons définir la stoechiométrie S comme la fraction de fluorophores donneurs dans la population totale de fluorophores pour chaque pixel :

$$S = \frac{n^D}{n^D + n^A}. \quad (1.3.9)$$

A partir des équations 1.3.1 et 1.3.2, nous obtenons l'expression de n^D et n^A qui, réintroduites dans l'équation 1.3.9 permettent d'obtenir l'expression de la stoechiométrie comme suit :

$$S = \frac{1}{1 + \frac{I_{AA}}{I_{DD}} \frac{1}{\beta^X \gamma^M} (1 - E)}, \quad (1.3.10)$$

où l'on a simplifié l'expression grâce aux facteurs de corrections définis par l'équation 1.3.7. On peut découpler E et S en remplaçant E par son expression (équation 1.3.8), on obtient alors :

$$S = \frac{I_{DA} - \alpha^{BT} I_{DD} - \delta^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD}}{I_{DA} - \alpha^{BT} I_{DD} - \delta^{DE} I_{AA} + \gamma^M I_{DD} + I_{AA}/\beta^X}. \quad (1.3.11)$$

Nous écrivons une forme simplifiée et plus lisible de ces équations en incluant les corrections de fuites spectrales dans $I_{DA}^{corr} = I_{DA} - \alpha^{BT} I_{DD} - \delta^{DE} I_{AA}$. Ainsi, nous obtenons les deux équations principales de Quanti-FRET :

$$E = \frac{I_{DA}^{corr}}{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}} \quad (1.3.12)$$

$$S = \frac{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}}{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD} + I_{AA}/\beta^X}. \quad (1.3.13)$$

E et S peuvent être calculés à partir des trois images expérimentales I_{DD} , I_{DA} et I_{AA} et des quatre facteurs de corrections α^{BT} , δ^{DE} , γ^M et β^X . Les expressions théoriques des quatre facteurs de corrections ont été obtenues à partir des expressions détaillées des intensités de fluorescence collectées dans les trois canaux d'acquisition.

1.3.2 Calibration des facteurs de correction

Fuites spectrales

La première correction à apporter pour calculer un FRET quantitatif consiste à corriger les fuites spectrales issues des recouvrements des spectres des fluorophores donneurs et accepteurs. Cette correction est couramment réalisée dans les expériences de FRET ratiométrique appelées approches "3-cubes" [Youvan et al., 1997], [Gordon et al., 1998], [Zal and Gascoigne, 2004].

La figure 1.9 présente les spectres superposés des deux fluorophores donneur (ici mTFP1, zones mauves) et accepteur (ici Venus, zones vertes) en fonction de la longueur d'onde. Pour chaque fluorophore, la courbe en pointillés est le spectre d'absorption et la courbe en trait plein est le spectre d'émission. Les longueurs d'ondes des lasers d'excitation sont marquées par un trait vertical, bleu pour L_D et vert pour L_A . On voit que les lasers d'excitations

correspondent à peu près au maximum du spectre d'absorption correspondant. Cependant, on constate que la probabilité d'exciter le fluorophore accepteur à la longueur d'onde d'excitation du donneur L_D n'est pas nulle, c'est ce que l'on appelle l'excitation directe, notée DE sur la figure. La fluorescence collectée après excitation directe de l'accepteur apparaît dans le canal "FRET" I_{DA} . Elle sera soustraite grâce au facteur de correction δ^{DE} .

Sur cette figure sont également visibles les filtres correspondant à l'acquisition de la fluorescence dans le canal donneur (ligne violette) et dans le canal accepteur (ligne rouge). La zone hachurée en jaune correspond à la fluorescence émise par les fluorophores donneur et collectée dans le canal Accepteur, c'est ce que l'on a appelé Bleedthrough (BT). La fluorescence issue du Bleedthrough apparaît dans le canal "FRET" I_{DA} . Elle sera soustraite grâce au facteur de correction α^{BT} .

La détermination des facteurs de calibration est obtenue en imageant des échantillons contenant seulement les fluorophores donneur pour α^{BT} et des échantillons contenant seulement les fluorophores accepteur pour δ^{DE} . En pratique, cela est obtenu en imageant des cellules exprimant l'un ou l'autre des fluorophores par une transfection transitoire. Les facteurs de correction sont obtenus en calculant les ratios suivant :

$$\alpha^{BT} = \frac{I_{DA}^{\text{donneur-seulement}}}{I_{DD}^{\text{donneur-seulement}}} \quad (1.3.14)$$

et

$$\delta^{DE} = \frac{I_{DA}^{\text{accepteur-seulement}}}{I_{AA}^{\text{accepteur-seulement}}} \quad (1.3.15)$$

Ces ratios sont calculés pour chaque pixel de toutes les images et la valeur médiane est conservée. α^{BT} dépend du spectre du donneur, et des différences de détection entre les deux voies d'imagerie (filtres, miroirs, lentille, caméra). δ^{DE} dépend du spectre de l'accepteur et des ratio de puissance laser donneur/accepteur. Ces facteurs de calibration sont donc sensibles aux conditions expérimentales. Il faut les recalculer pour chaque nouveau couple de fluorophores, chaque jeu de filtres, chaque choix de puissance laser. Ainsi on considérera α^{BT} et δ^{DE} constants pour chaque expérience. Etant données des conditions expérimentales fixées (même couple de fluorophores, même assortiment de filtres et intensités d'illumination), les corrections d'origine spectrales à apporter à I_{DA} dépendent seulement de la quantité des deux fluorophores. Celles-ci sont données par I_{DD} et I_{AA} alors que α^{BT} et δ^{DE} restent constants.

En pratiques ces images de calibration sont réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que pour les biosenseurs eux-mêmes : même milieu de culture, mêmes paramètres d'acquisition, mêmes puissances laser, dans la mesure du possible mêmes cellules d'observation.

Facteurs de correction de l'excitation et de l'émission

γ^M a été désigné ainsi pour "EMission" par assonance. Il a été construit ainsi car il caractérise la différence relative de détection de l'émission des deux fluorophores. Il ne dépend que des ratio des propriétés photo-physiques des fluorophores (leur rendement quantiques respectifs) et des ratio de détection dans chaque canal. Pour un même photon émis par le laser donneur ou accepteur, il quantifie le ratio de signal mesuré sur la caméra entre les deux canaux.

β^X a été désigné ainsi pour "EXcitation". Il quantifie le ratio entre les flux lumineux excitant les fluorophores : l'intensité laser et la section efficace d'absorption de chaque fluorophore y sont comparés. Si une voie possède un laser bien plus intense ou un fluorophore de bien plus grande section efficace, ce déséquilibre est quantifié par ce facteur de correction.

Comme pour α^{BT} et δ^{DE} , ces facteurs sont très dépendants des conditions d'expérimentation. Ils caractérisent un dispositif expérimental dont les puissances laser, les filtres, les optiques sont fixées associés à un couple de fluorophores. Mais une fois ces paramètres déterminés, ils sont constants et permettent de comparer quantitativement le FRET obtenu lors d'expériences réalisées à différentes dates, ou en différents laboratoires (comparaison d'expériences dans deux laboratoires avec QuanTI-FRET dans [Coulomb et al., 2020]). Chaque laboratoire possède alors ses quatre facteurs de calibration propres. Ils permettent de calculer un FRET quantitatif à condition que les expériences soient réalisées avec des réglages constants.

Calibration par ajustement du plan de FRET

Les facteurs de correction γ^M et β^X ne peuvent pas être déterminés à partir d'échantillons contenant les espèces séparées donneur et accepteur car dans ce cas la probabilité de FRET est nulle ou non définie. Une autre information est nécessaire et est fournie par la stoechiométrie. L'équation 1.3.13 peut être remaniée comme l'équation d'un plan dans l'espace 3D défini par $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$:

$$\gamma^M \beta^X I_{DD} + \beta^X I_{DA}^{corr} = \frac{S}{1-S} I_{AA} \quad (1.3.16)$$

Si la stoechiométrie est connue, la stratégie consiste à ajuster les données expérimentales à un plan et ainsi déterminer γ^M et β^X .

Pour cela, nous utilisons une représentation matricielle, les notation utilisées sont les suivantes :

$$\mathbf{XB} = \mathbf{Y} \quad (1.3.17)$$

est l'écriture matricielle de l'équation 1.3.16. \mathbf{X} est la matrice des pixels d'intensité "origine", soit avec N points de mesure :

$$\mathbf{X} = (I_{DD} \quad I_{DA}^{corr}) = \begin{pmatrix} I_{DD}^1 & I_{DA}^{corr,1} \\ I_{DD}^2 & I_{DA}^{corr,2} \\ \vdots & \vdots \\ I_{DD}^N & I_{DA}^{corr,N} \end{pmatrix}$$

et \mathbf{B} est le vecteur des coefficients recherchés :

$$\mathbf{B} = \begin{pmatrix} \gamma^M \beta^X \\ \beta^X \end{pmatrix}$$

et \mathbf{Y} le vecteur des pixels "cibles" :

$$\mathbf{Y} = \begin{pmatrix} I_{AA}^1 \\ I_{AA}^2 \\ \vdots \\ I_{AA}^N \end{pmatrix}$$

La méthode retenue pour déterminer \mathbf{B} est la résolution des équations normales qui consiste à déterminer \mathbf{B} selon :

$$\mathbf{B} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{Y} \quad (1.3.18)$$

$(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T$ la pseudo-inverse de Moore-Penrose de la matrice \mathbf{X} , qui permet d'inverser la matrice \mathbf{X} lorsqu'elle n'est pas carrée. X^T est la transposée de \mathbf{X} . En pratique, les valeurs de tous les pixels de l'ensemble des données sont rassemblées pour former les vecteurs \mathbf{X} et \mathbf{Y} . Puis \mathbf{B} est déterminé par l'équation 1.3.18 dont les deux éléments sont $\gamma^M \beta^X$ et β^X .

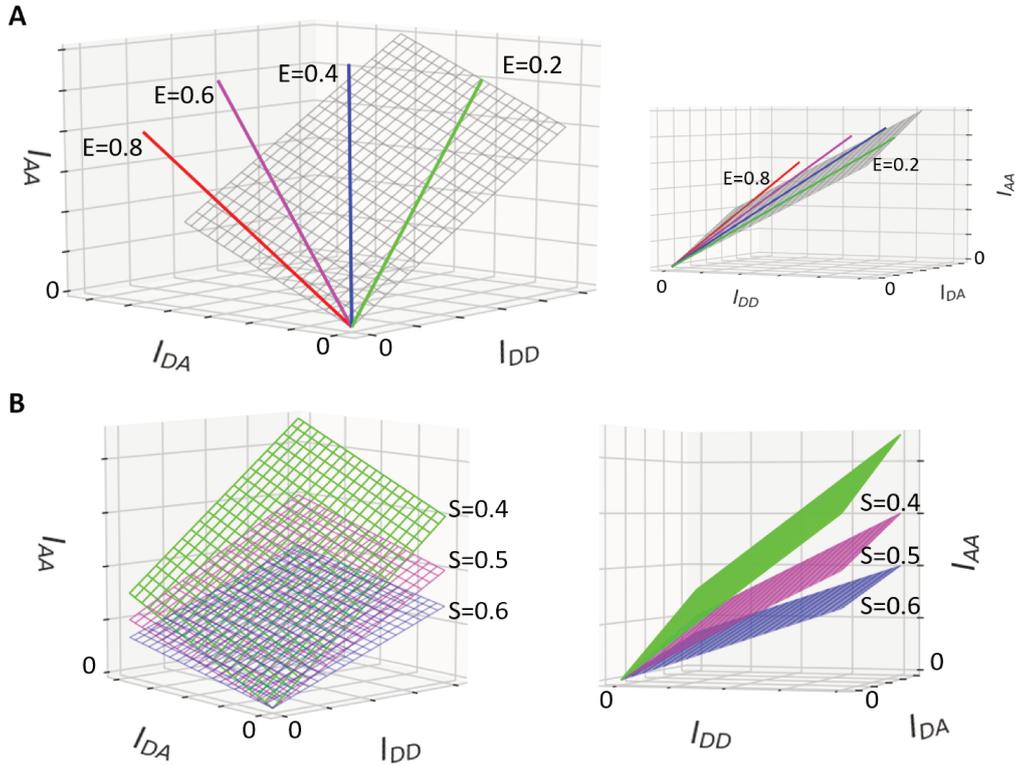


FIGURE 1.10 – Représentation dans l'espace 3D défini par les trois canaux d'acquisition I_{DD}, I_{DA}, I_{AA} . (A) Dans cet espace, les pixels ayant la même valeur de FRET E forment une droite. L'ensemble des droites balayant les valeurs de E est contenu dans un plan. (B) L'objectif de la calibration est de déterminer le plan correspondant au jeu de paramètres expérimentaux. Cela nécessite de connaître la stoechiométrie des échantillons de calibration. La stoechiométrie fait varier l'inclinaison du plan de FRET par rapport au plan $I_{AA} = 0$.

Exploration de l'espace 3D Un échantillon est imagé dans les trois canaux et est donc associé à un triplet d'images. Chaque point-pixel de l'échantillon possède donc trois valeurs d'intensité (I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}) qui deviennent les trois coordonnées d'un point dans l'espace 3D $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$. La figure 1.10 montre quelques exemples numériques pour bien comprendre cette représentation 3D qui fait l'originalité et la force de la méthode QuanTI-FRET. Pour une stoechiométrie donnée, nous avons vu que les données doivent en théorie se répartir sur un plan (A, plan gris). Bien sûr, les données expérimentales seront

bruitées et une certaine dispersion autour de ce plan est attendue. Si l'échantillon montre une seule valeur de FRET E avec une variation d'intensité de fluorescence (c'est-à-dire de concentration de fluorophore), alors tous les points de l'échantillon forment une droite appartenant au plan. Sur la figure 1.10A, on montre par exemple les quatre lignes théoriques correspondant aux valeurs de FRET 0.2, 0.4, 0.6 et 0.8. Ces quatre droites sont contenues dans le plan gris et le balais. En conséquence, pour déterminer l'équation du plan et donc les facteurs de correction γ^M et β^X , il convient d'utiliser des échantillons présentant une forte dispersion dans les valeurs de FRET ; une seule droite définissant une infinité de plans.

Pour déterminer γ^M et β^X , nous devons connaître la stoechiométrie S selon l'équation 1.3.16. En pratique, nous faisons une hypothèse sur S que nous discuterons plus loin. La stoechiométrie est en général par construction de $S = 0.5$, c'est-à-dire d'un donneur pour un accepteur. Le plan magenta sur la figure 1.10B montre ce plan (pour des valeurs arbitraires de γ^M et β^X). Il est intéressant de visualiser des plans de différentes stoechiométrie dans cet espace 3D. On observe sur la figure, qu'une variation de la stoechiométrie entraîne une variation de l'inclinaison du plan de FRET par rapport au plan défini par $I_{AA} = 0$.

Calibration avec des étalons de FRET

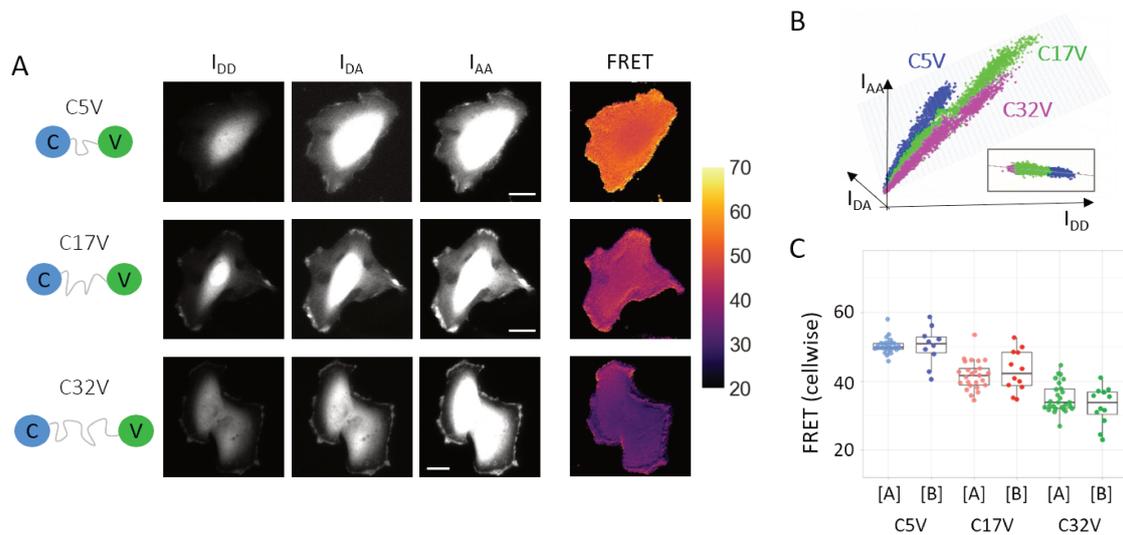


FIGURE 1.11 – Résultats illustrés de la calibration avec les standards de FRET. **A.** Images de cellules exprimant les standards dans les trois canaux $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ et de l'image de FRET pour les trois standards C5V (lien court), C17V (lien moyen) et C32V (lien long). Les plus fortes valeurs de FRET sont mesurées avec les lien courts. Barre d'échelle : 20 μm . Echelle de couleur : efficacité de FRET en %. **B.** Nuage de points dans l'espace 3D des $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ issu des pixels assemblés de toutes les cellules. En grisé le plan ajusté passe bien par les trois nuages de points des standards, dont les coefficients directeurs sont β^X et γ^M . **C.** Diagramme à moustaches des valeurs de FRET mesurées sur les trois standards, au sein de deux laboratoires différents dénommés [A] et [B] lors d'expériences indépendantes. Après la calibration par la méthode QuanTI-FRET, les mêmes valeurs médianes de FRET sont obtenues pour chaque standard.

Il faut mesurer des échantillons présentant une grande variété de FRET pour décrire correctement le plan théorique. La solution originelle d'Alexis Coullomb consiste à utiliser des étalons de FRET développés par [Thaler et al., 2005] et [Koushik et al., 2006]. Les étalons de FRET consistent en une paire de protéines fluorescentes séparées par une séquence d'acides aminés de longueur variable qui contrôle la distance entre les deux fluorophores. Comme vu plus haut, la paire de protéines fluorescentes doit être la même que celle qui sera utilisée après calibration, dans le biosenseur par exemple. Dans le travail d'A. Coullomb, les fluorophores sont Cerulean et Venus (voir figure 1.11). Trois étalons ont été utilisés C5V, C17V et C32V correspondant à trois longueurs du lien entre les deux fluorophores : 5, 17 et 32 acides aminés. Il est attendu que C5V montre le FRET le plus élevé et C32V le plus faible. Les triplets d'image de trois exemples de cellules HeLa transfectées transitoirement pour exprimer chacune un des trois étalons de FRET sont montrés en figure 1.11A. L'ensemble des pixels des cellules exprimant C5V ou C17V ou C32V sont rassemblés dans l'espace 3D $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ figure 1.11B. Comme prédit par la théorie et montré figure 1.10A, les pixels de chaque construction se regroupent autour d'une droite définissant une valeur de FRET et les trois droites correspondant aux trois constructions de FRET différents balayent un plan. Ce plan illustré en gris sur la 1.11B a été obtenu comme décrit dans le paragraphe précédent à partir de l'ensemble des données rassemblées des cellules exprimant chacun des trois étalons de FRET (25 cellules par condition) pour ajuster l'équation 1.3.16. La stoechiométrie S est prise égale à 0.5, soit un donneur pour un accepteur en moyenne vu que les étalons FRET qui comportent en théorie un donneur et un accepteur sur la même séquence protéique. C'est une hypothèse assez forte car cela suppose notamment que la maturation soit très efficace pour les deux fluorophores donnant lieu à une quantité négligeable de molécules n'ayant qu'un seul fluorophore fonctionnel. En l'occurrence, l'ajustement a donné les facteurs de correction $\beta^X = 1.167 \pm 0.008$ et $\gamma^M = 2.10 \pm 0.02$ avec un coefficient de détermination $R^2 = 0.995$.

Une fois tous les facteurs de correction déterminés, α^{BT} et δ^{DE} ayant été obtenus indépendamment à partir de cellules n'exprimant que l'un des fluorophores, l'efficacité de FRET par pixel peut être mesurée et calculée par l'équation 1.3.12. Elle peut être calculée à partir des mêmes échantillons ayant permis de déterminer β^X et γ^M car aucune hypothèse n'a été faite sur E . En revanche, la stoechiométrie ne pourra être une mesure que dans des échantillons n'ayant pas servi à la calibration étant donné qu'une hypothèse sur la stoechiométrie a été nécessaire. L'efficacité de FRET, E , a été calculée en chaque pixel des cellules exprimant C5V, C17V et C32V, permettant de produire des cartes de FRET (figure 1.11A, colonne de droite). Les valeurs moyennes obtenues pour ces trois constructions sont $E_{C5V} = 50.3 \pm 0.4$, $E_{C17V} = 41.7 \pm 0.8$ et $E_{C32V} = 35.1 \pm 0.8$. Pour vérifier que l'efficacité de FRET est indépendante de l'intensité de fluorescence pour chaque pixel, nous avons calculé le coefficient de corrélation de Spearman entre E et I_{AA} , I_{AA} étant le seul canal non-affecté par le FRET et seulement lié à la concentration en fluorophores. En rassemblant toutes les données, nous avons obtenu un coefficient de corrélation $\rho = 0.04$ confirmant l'absence de corrélation entre l'intensité de fluorescence et la probabilité de FRET ; un biais qui est souvent observé dans des analyses de FRET ratiométrique. De la même manière, on peut s'interroger sur l'effet de la calibration en regardant la corrélation entre E et la fluorescence totale du donneur ($I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}$) avec ou sans la correction par γ^M . On obtient $\rho = 0.111$ pour $\gamma^M = 1$ (sans correction) et $\rho = 0.045$ pour $\gamma^M = 2.10$. On voit que la correction pour la différence d'efficacité de détection dans les deux canaux permet de baisser d'un facteur 2.5 la corrélation entre la

fluorescence du donneur et la mesure de la probabilité de FRET.

Le développement de la méthode QuanTI-FRET avait pour but de permettre la comparaison d'expériences utilisant du FRET obtenues de manière indépendante entre différents laboratoires. Pour tester cela, nous avons fait faire les mêmes expériences par une autre équipe (D.C. Lamb, LMU Munich) sur un microscope différent par des personnes différentes. Aucun matériel n'a transité entre nos deux laboratoires, seulement le protocole expérimental et l'analyse ont suivi le même processus. Après calibration, les efficacités de FRET moyennes mesurées sont très proches de celles mesurées précédemment (voir figure 1.11, données [B]), $E_{C5V} = 50 \pm 1.7$, $E_{C17V} = 43 \pm 1.6$ et $E_{C32V} = 33 \pm 1.5$. Malgré une variabilité plus grande des données et un coefficient de détermination plus faible ($R^2 = 0.82$), les résultats des deux campagnes de mesures indépendantes sont en accord. Nous avons ainsi montré que la méthode QuanTI-FRET est quantitative, les valeurs absolues de FRET ont du sens et peuvent être comparées d'une étude à une autre.

1.3.3 Exploitation de la stoechiométrie

Une fois la calibration réalisée, l'efficacité de FRET peut être mesurée pixel par pixel par l'équation 1.3.12 mais également la stoechiométrie par l'équation 1.3.13. De fait, de précieuses informations sont contenues dans S . Tout d'abord, la stoechiométrie mesurée permet d'évaluer la qualité de la calibration et des données. Comme dans les études de molécule unique, il est intéressant de tracer l'histogramme 2D combinant les histogrammes de la stoechiométrie et de la probabilité de FRET (voir figure 1.12A-C). En théorie, les étalons FRET ayant un donneur pour un accepteur devraient apparaître comme un nuage de points correspondant à une stoechiométrie $S = 0.5$ et à une efficacité de FRET donnée, E_0 (voir figure 1.12A). Si des donneurs libres sont présents également, alors on peut décrire théoriquement la trajectoire jusqu'à un échantillon contenant seulement des donneurs ($S = 1$ et $E = 0$). Si ce sont des accepteurs libres qui sont mélangés à la construction D-A alors le FRET ne varie pas, seulement la stoechiométrie baisse jusqu'à la valeur limite $S = 0$ pour une pure solution d'accepteurs. Par contre, si à la fois des donneurs libres et des accepteurs libres sont mélangés à la construction D-A, la situation est plus complexe et il n'est pas possible de trancher.

Les panneaux B et C de la figure 1.12 montrent l'histogramme 2D obtenu pour les trois constructions citées précédemment (C5V, C17V et C32V) ainsi que pour des constructions de stoechiométries différentes : CVC (2 donneurs pour 1 accepteur), VCV (2 accepteurs pour 1 donneur) et les donneurs et accepteurs seuls. Le panneau B montre cet histogramme avant calibration, les valeurs de FRET sont élevées (supérieures à 50%), les stoechiométries sont plus faibles qu'attendu et surtout, les nuages de points ne sont pas horizontaux indiquant une corrélation entre E et S . Après calibration (panneau C), les nuages de points sont bien horizontaux, la stoechiométrie est de 50% en moyenne pour les étalons de FRET (par hypothèse lors de la calibration). Mais surtout, la stoechiométrie peut être mesurée pour les autres échantillons, nous obtenons $S = 68.9 \pm 0.2$ pour CVC (24 cellules) pour valeur théorique de 66%, et $S = 35.1 \pm 0.2$ pour VCV (9 cellules) pour une valeur théorique de 33%. A noter que ces histogrammes 2D E-S sont très utiles pour juger de la "qualité" de la calibration ou pour détecter le comportement anormal de certaines cellules.

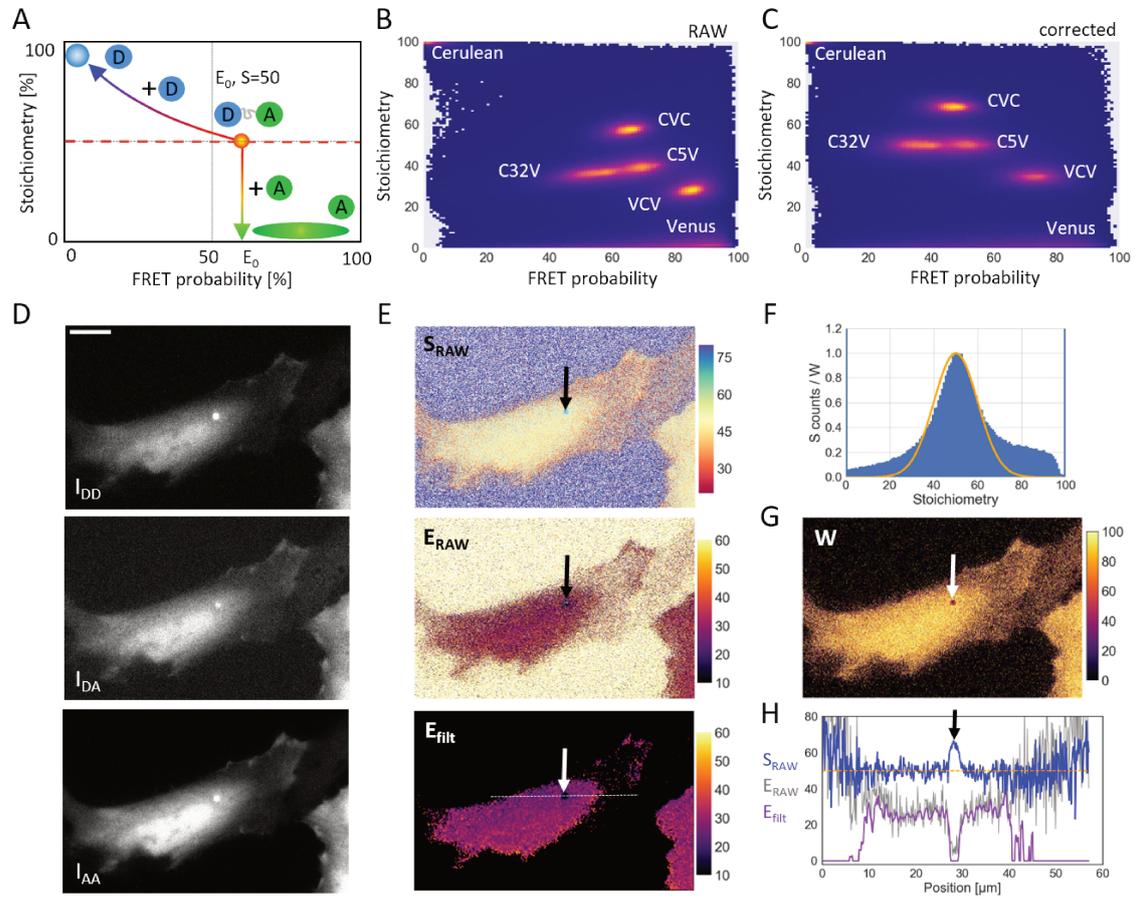


FIGURE 1.12 – Influence de la proportion entre donneur ou accepteur libre dans la cellule. **A.** Histogramme 2D E-S théorique : partant d'une population initiale caractérisée par $(E_0, S_0 = 50\%)$, le couple (E, S) évolue selon deux trajectoires selon que l'on ajoute du donneur libre ou de l'accepteur libre. Ces trajectoires tendent vers le disque bleu (accepteur seul) ou vert (donneur seul). **B.** Histogramme 2D E-S expérimental pour des constructions avec des valeurs de FRET différentes (V32V et C5V) ou des valeurs de stoechiométrie différentes (CVC et VCV) ou encore les donneurs seulement (Verulean) et accepteurs seulement (Venus). La seule correction apportée est celles des α^{BT} et δ^{DE} . **C.** Les mêmes données expérimentales en corrigeant en plus par les facteurs γ^X et β^M . **D.** Triplet d'une cellule exprimant C32V. Barre d'échelle $15 \mu\text{m}$. **E.** Les cartes correspondantes de FRET et Stoechiométrie pures, puis la carte de FRET après filtrage par un filtre gaussien pondéré. **F.** Histogramme associé de la stoechiométrie et des poids (W) représenté par une ligne. **G.** Carte des poids W associés. **H.** Profils linéaires des trois cartes du **E**. Les flèches indiquent un endosome.

Indice de confiance Dans le domaine de la microscopie de fluorescence, la méthode usuelle pour déterminer l'incertitude sur la valeur d'un pixel est de s'appuyer sur les statistiques de photons : plus le signal est fort, plus la valeur de ce pixel est fiable. C'est vrai dans la plupart des cas d'imagerie de fluorescence mais, dans le cas du FRET, il est possible que la fluorescence soit élevée alors que le FRET est biaisé. De nombreuses raisons peuvent rendre un fluorophore non fonctionnel : mauvaise expression génique, mauvaise maturation 3D de la protéine, valeurs extrêmes de pH localement qui altèrent la structure 3D du fluorophore, photo-blanchiment du fluorophore. Dans ce cas, le calcul du FRET est totalement faussé et ne représente plus du tout une efficacité de FRET. La stoechiométrie S permet de connaître en chaque pixel, statistiquement, la proportion entre fluorophores donneur et accepteur. Un exemple est montré figure 1.12D avec une cellule présentant une zone très intense en intense en fluorescence mais avec une stoechiométrie aberrante (éloignée de la valeur attendue de 50%, panneau E) et une probabilité de FRET également dénotant avec le reste de la cellule (panneau E). En théorie, il y a un donneur pour un accepteur en moyenne par biosenseur et par pixel également, soit $S=50\%$. Le principe ici est de pondérer chaque pixel par un poids lié à l'écart entre S et la valeur attendue 0.5. Pour cela, nous définissons un indice de confiance W :

$$W = e^{-\frac{(S-S_0)^2}{2\sigma_S^2}}, \quad (1.3.19)$$

où S_0 est la valeur attendue de la stoechiométrie S et σ_S est un paramètre pour ajuster la sensibilité. W rend compte de la déviation à la stoechiométrie attendue avec un score compris entre 0 et 1 (1 pour $S = S_0$) et une distribution gaussienne (figure 1.12F, courbe jaune). Ce calcul est fait, comme le reste, pour chaque pixel. Ainsi, chaque pixel a maintenant une valeur de probabilité de FRET E , une valeur de stoechiométrie apparente S et un indice de confiance W . On peut utiliser cet indice de confiance pour la visualisation en utilisant un code couleur pour E et la brillance pour coder W ("Value" dans le codage HSV, Hue Saturation Value), ou tout simplement exclure des pixels.

Filtrage gaussien pondéré Les cartes de FRET ont souvent besoin d'être moyennées spatialement dû au faible signal sur bruit dans le cas des biosenseurs ; la résolution étant de toutes manières limitée par la diffusion des espèces marquées et plus grande que la taille d'un pixel. En général, ce filtrage spatial est réalisé sans contrôle qualité et peut créer un biais des pixels avec une stoechiométrie aberrante. Nous créons un filtre gaussien pondéré par l'indice de confiance pour réaliser un filtrage spatial qui diminue le bruit en tenant compte de la confiance dans les pixels voisins.

Pour cela, on crée un kernel gaussien (7x7 pixels), G , pour moyenner spatialement comme pour un filtrage gaussien classique. Ce kernel gaussien est pondéré localement par les valeurs de W et appliqué à la carte de FRET E_{raw} . L'écriture matricielle est légèrement différente pour optimiser le temps de calcul, mais mathématiquement équivalente :

$$E_{filtered} = \frac{(W \times E_{raw}) * G}{W * G} \quad (1.3.20)$$

avec \times pour le produit d'Hadamard (multiplication élément à élément sans somme) et $*$ la convolution. En pratique, on "coupe les pieds" de la distribution gaussienne en ajoutant un seuil en-dessous duquel $W = 0$. On obtient la carte du FRET filtré E_{filt} en figure 1.12E dans laquelle tout le bruit à l'extérieur de la cellule a été annulé, ainsi que la vésicule

très intense en fluorescence (flèche) et même certaines zones de la cellule où le signal de fluorescence était trop faible. Pour avoir une idée plus précise de l'effet du filtrage, on a tracé le profil de S_{RAW} , E_{RAW} et E_{filt} le long de la ligne pointillée blanche qui passe sur cette zone très intense. Les zones de stoechiométrie aberrante voient leur probabilité de FRET ramenée à zéro. On peut aussi constater l'impact du filtre sur le bruit en comparant la courbe du FRET et du FRET filtré. En ce qui concerne la zone très brillante qui a été éliminée lors du filtrage, il s'agit probablement de vésicules dans lesquelles règne un pH plus bas que celui du reste de la cellule. Cela affecte les fluorophores, en particulier Venus (l'accepteur) a un pKa autour de 6 alors que Cerulean (le donneur) a un pKa autour de 4.7 (ressource communautaire <https://www.fpbase.org/>). Ainsi une baisse de pH affecte principalement l'accepteur entraînant une baisse de fluorescence qui se traduit par une baisse apparente de la probabilité de FRET.

1.3.4 Discussion

Rôle de l'hypothèse sur la stoechiométrie Au fondement de tout ce développement sur les équations du FRET repose une hypothèse forte : la stoechiométrie du biosenseur de FRET utilisé est connue. La stoechiométrie théorique du plasmide exprimé par les cellules est connue, en pratique nous considérerons donc que l'on observe la même valeur au sein des cellules. Dans de nombreux cas, les constructions FRET comportent exactement un donneur et un accepteur, en général sur la même séquence peptidique. Dans ces cas, on postule alors que $S=0.5$. Cette hypothèse est vraie si chaque biosenseur possède effectivement sa paire de fluorophores fonctionnels avec la définition $S = \frac{n^D}{n^D+n^A}$.

Il existe de nombreux cas de figure où cette hypothèse forte n'est pas vérifiée. La stoechiométrie peut varier à cause du pH, la maturation des protéines qui peut être incomplète, un des fluorophores qui subit du photo-blanchiment.

Il est donc nécessaire d'évaluer la stoechiométrie réelle dans les cellules et de corriger l'éventuelle erreur avec la théorie. Comme les standards de FRET, il existe les constructions particulières CVC et VCV qui réalisent cette tâche. Dans le cas de l'article [Coullomb et al., 2020], l'écart n'est au plus que de 2% pour les deux constructions. Ce résultat conforte dans la validité de cette hypothèse, au moins dans une large mesure. Si S est légèrement différent de 0.5, est-ce réellement une grave limitation à la méthode ? On ne pourra jamais maîtriser parfaitement la stoechiométrie accepteur-donneur lorsque les constructions sont exprimées par des cellules, mais il est réellement important que les résultats de FRET soient indépendants du niveau d'expression du plasmide et de la concentration locale en biosenseur. Ainsi, on aura une méthode de FRET quantitative. Ce dernier point est assuré par les différents graphes de contrôles, dont l'histogramme 2D E-S.

Rôle/nécessité des étalons La méthode de détermination du FRET quantitatif développée par A. Coullomb nécessite impérativement les standards de FRET. Ils permettent de déterminer le plan ajusté dans l'espace 3D $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ dont les coefficients directeur donnent accès aux facteurs de calibration γ^X et β^M qui permettent de calculer les cartes de FRET quantitatif et de Stoechiométrie.

Néanmoins, la construction de ces standards de FRET (qui doit être réalisée pour chaque biosenseur utilisé) nécessite des capacités expérimentales importantes en bio-ingénierie. Nous le verrons plus en détails au chapitre suivant, cette construction est réellement difficile et constitue donc un frein important à l'utilisation de cette méthode par des laboratoires sans les compétences poussées en bio-ingénierie. Pour les biosenseurs, et notamment ceux

utilisés dans ce travail, la stoechiométrie théorique est parfaitement connue (de la même façon que dans les standards de FRET). La partie suivante fait usage de cette donnée pour adapter le protocole de calibration de manière à le simplifier tout en conservant le caractère quantitatif du FRET obtenu par ce calcul.

Notre méthode QuantI-FRET (première version) permet de calculer les cartes 2D de FRET de biosenseurs codant pour l'activité de GTPases. Ce FRET est quantitatif, indépendant du dispositif expérimental ou de certains biais biologiques des cellules grâce à l'usage conjoint de la stoechiométrie. La grande force de cette approche en FRET est la combinaison pour chaque pixel de l'information de FRET et de stoechiométrie. Elle nécessite l'usage d'étalons de FRET dont la construction expérimentale est très difficile. Nous présentons désormais une adaptation de la méthode sans utiliser ces étalons.

Chapitre 2

Simplification de la méthode QuanTI-FRET : l'auto-calibration

2.1 Introduction

Nous avons présenté dans le chapitre précédent la méthode QuanTI-FRET, développée au cours de la thèse d'Alexis Coullomb. Il a démontré que cette méthode originale est robuste et quantitative bien que basée sur les images de fluorescence et non pas sur le temps de vie du fluorophore donneur. Cependant, cette méthode nécessite l'utilisation d'étalons FRET. La fabrication biologique de ces molécules s'est révélée difficile. En effet, afin d'utiliser le biosenseur de RhoA fourni par l'équipe d'Olivier Pertz (Bern University), nous devions obtenir les étalons de FRET avec le couple TFP1 / mVenus en remplacement du couple mCerulean / mVenus précédemment utilisé. Jean Revilloud, ingénieur biologiste du laboratoire, a décidé de faire une première approche en remplaçant par PCR, Cerulean par TFP1 dans les constructions C5V, C17V et C32V. Pour cela, nous amplifions TFP1 avec les amorces qui permettraient de l'insérer à la place de Cerulean. Malheureusement la très grande homologie de séquence entre tous ces fluorophores engendre de nombreuses hybridations non spécifiques par PCR. Historiquement pour CxV , le deuxième fluorophore avait été inséré grâce à des enzymes de restriction. Malheureusement, ces sites ne sont pas présents autour de TFP1, c'est ce qui nous avait incité à partir sur une stratégie par PCR. Au prix de nombreux essais, nous avons réussi à obtenir T17V (nom du standard avec mTFP1), malheureusement pour T5V et T32V nous avons systématiquement des insertions ou délétions. Certes, on a pu contourner cette difficulté en commandant des gènes synthétiques et en optimisant les séquences, mais cette étape préliminaire de calibration avec les étalons de FRET s'est révélée très contraignante; elle pourrait être un frein au développement et à l'application de la méthode QuanTI-FRET 1.0. Ce serait rédhibitoire par exemple pour les laboratoires non spécialisés dans la manipulation génétique des séquences de protéines fluorescentes ou dont l'étude quantitative d'un biosenseur ne constitue pas le coeur de leur activité scientifique. Or, la logique du développement de la méthode QuanTI-FRET est d'amener le FRET quantitatif vers les non-spécialistes et le plus grand nombre.

L'objectif de cette thèse est de simplifier la méthode en ne recourant pas aux étalons de FRET. La calibration se fera directement sur l'échantillon d'intérêt, comme une autocalibration. Ceci est permis par une propriété générale des biosenseurs intra-moléculaires : leur stoechiométrie est connue théoriquement, et supposée stable expérimentalement. La grande majorité des biosenseurs FRET intracellulaires utilisée est de type intra-moléculaire, c'est-

à-dire que fluorophores donneur et accepteur sont exprimés à partir d'une seule séquence génétique. Au-delà de notre problématique biosenseurs, cette méthode est applicable à toute construction FRET dont la stoechiométrie est définie et constante. Les équations de la théorie du QuanTI-FRET 1.0 ne sont pas modifiées, mais leur manipulation et leur utilisation en est changée, à travers des détails expérimentaux et d'analyse des données. Dans un premier temps, nous allons revenir sur la théorie et présenter la nouvelle stratégie. Puis, nous montrerons l'application de QuanTI-FRET 2.0 au biosenseur de RhoA. Nous verrons les avantages et les limites de cette autocalibration et également les quelques éléments manquants avant la publication.

2.2 Théorie - lien avec le QuanTI-FRET 1.0

Théorie et équations Dans la méthode QuanTI-FRET [Coullomb et al., 2020], les données expérimentales sont composées des trois images I_{DD} , I_{DA} et I_{AA} acquises sur la caméra suite à l'excitation alternée et à une détection dans deux canaux différents. On excite le donneur avec le laser L_D et on collecte simultanément dans les canaux d'émission donneur (I_{DD}) et accepteur (I_{DA}). Dans un deuxième temps, on excite directement l'accepteur avec le laser L_A et l'on collecte à nouveau dans les deux canaux d'émission, mais seule l'image I_{AA} est informative. On réalise une première étape de calibration pour corriger les fuites spectrales en déterminant les facteurs α^{BT} et δ^{DE} , étape de plus en plus réalisée par la communauté scientifique du FRET. En revanche, en considérant la photo-physique du phénomène de FRET, la méthode QuanTI-FRET avance deux facteurs de calibration supplémentaires β^X et γ^M qui corrigent les différences d'efficacité d'excitation entre donneur et accepteur, et d'efficacité de collection de la fluorescence qu'ils émettent. La détermination précise des facteurs de calibration γ^M et β^X permet de calibrer complètement le système expérimental et de mesurer de façon quantitative le FRET en cellules vivantes. On peut écrire, en incluant les corrections de fuites spectrales dans $I_{DA}^{corr} = I_{DA} - \alpha^{BT} I_{DD} - \delta^{DE} I_{AA}$, les deux équations principales de QuanTI-FRET (voir les équations 1.3.12 et 1.3.13) :

$$E = \frac{I_{DA}^{corr}}{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}} \quad (2.2.1)$$

$$S = \frac{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD}}{I_{DA}^{corr} + \gamma^M I_{DD} + I_{AA}/\beta^X}. \quad (2.2.2)$$

Dans l'espace 3D défini par $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$, on représente les pixels avec comme coordonnées la valeur du pixel dans chaque canal d'acquisition. Pour un ensemble de paires de FRET dont la stoechiométrie est fixée, le nuage de point appartient à un plan dans cet espace 3D. Une unique valeur de FRET donne lieu à une droite (incluse dans le plan théorique). Des variations de FRET induisent un déplacement du nuage de points dans ce plan (voir figure 1.10).

On rappelle l'équation du plan dans l'espace 3D défini par $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ (voir 1.3.16 pour les détails) qui permet la détermination des γ^M et β^X :

$$\gamma^M \beta^X I_{DD} + \beta^X I_{DA}^{corr} = \frac{S}{1-S} I_{AA} \quad (2.2.3)$$

Cette équation de plan contient trois inconnues : S , γ^M et β^X . Avec l'hypothèse d'une stoechiométrie connue de l'échantillon imagé, on peut obtenir les valeurs de γ^M et β^X en ajustant les données expérimentales par un plan.

Or, la stoechiométrie S des constructions de FRET intramoléculaire (comme des biosenseurs) est connue. Dans le cas des biosenseurs de RhoA (RhoA-2G) ou de Rac1 (Dora), elle est de $1/2$ (1 donneur : 1 accepteur), et stable en théorie. Cependant, plusieurs facteurs peuvent la faire varier qui seront présentés en discussion : photo-blanchiment ou différence d'efficacité de maturation entre les deux fluorophores. On peut donc directement utiliser les images de biosenseurs en cellules pour décrire le plan en 3D et déterminer les γ^M et β^X en supposant que $S = \frac{1}{2}$.

La procédure se fait en deux temps :

- *Premier temps* : Le jeu de données expérimentales est d'abord utilisé pour calibrer le système. L'ajustement du nuage de points par le plan 3D décrit par l'équation 2.2.3 permet de déterminer la valeur des facteurs de calibration γ^M et β^X .
- *Second temps* : grâce à ces facteurs de calibration, on peut désormais calculer les valeurs de FRET quantitatif pour chaque triplet $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ du même jeu de données expérimentales selon l'équation 1.3.12. On procède de même pour la stoechiométrie selon l'équation 1.3.13.

Le même jeu de données expérimentales permet donc de calculer à la fois les facteurs de calibration, puis les cartes de FRET pour chaque cellule du jeu de données. On calcule également une valeur de stoechiométrie apparente dont la déviation à la valeur théorique est un indice de qualité du pixel.

Conditions pratiques de validité Pour décrire le mieux possible le plan théorique illustré en figure 1.10, il faut que le nuage de points décrive le plus largement possible ce plan. Cela revient à dire que les valeurs de FRET de l'échantillon doivent présenter de larges variations, tout en restant à stoechiométrie constante. C'est en effet ce que l'on attend dans le cas des biosenseurs qui présentent des valeurs variées de FRET en cellule. De plus, les variations de FRET du biosenseur au sein de chaque cellule et parmi les cellules sont continues car moyennées sur un grand nombre de biosenseurs dans chaque pixel. Ce n'est pas automatiquement le cas pour tous les biosenseurs FRET, dont certains ne présentent pas de variation notable au cours du temps ou à l'échelle de la cellule. Des drogues chimiques peuvent être utilisées pour forcer le biosenseur dans les positions extrêmes où le FRET est maximal et minimal.

Dans le cas des étalons de FRET, chaque construction ne présente qu'une seule valeur de FRET, donc décrit seulement une droite incluse dans le plan dans l'espace 3D $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$. Ainsi, pour ajuster un plan de manière convenable, il est nécessaire d'utiliser (au moins) trois étalons de FRET pour calibrer l'expérience. Alors que les étalons de FRET décrivent le plan d'ajustement de façon discontinue, les biosenseurs décrivent le plan de façon quasi-continue dans l'espace 3D.

Une autre condition nécessaire est l'homogénéité des valeurs de S autour d'une valeur constante parmi le jeu de données expérimentales. Si plusieurs valeurs de S co-existent, plusieurs plans sont alors décrits (voir figure 1.10) et il n'est plus pertinent de déterminer les facteurs de calibration. Il faut que la construction assure un ratio connu (1 :1 par exemple) entre donneur et accepteur, d'une manière robuste peu sensible au lieu d'expression du plasmide. Enfin, il faut que le plasmide ne soit pas toxique à la cellule, et que les cellules l'exprimant présentent un phénotype semblable à celui des cellules contrôles sans plasmide, ce qui est une condition générale pour l'imagerie de cellules vivantes.

2.3 Résultats

La théorie de la méthode par autocalibration du QUANTI-FRET ayant été présentée, voici les résultats obtenus en appliquant la méthode avec notre dispositif expérimental. La première étape consistant à déterminer les facteurs de correction α^{BT} et δ^{DE} est présentée succinctement, tandis que la deuxième étape (plus complexe) consistant à déterminer les γ^M et β^X est plus détaillée.

La seconde étape consiste à déterminer les γ^M et β^X à partir de l'ajustement du plan sur les données dans l'espace 3D, puis de reprendre le même jeu de données pour calculer les cartes de FRET quantitatif associées. Les données considérées sont des cellules REF52 exprimant de façon stable le biosenseur RhoA-2G, sur des motifs de verre (pour un meilleur rapport signal à bruit constaté). Cette condition sera dénotée "Rh2G".

La figure 5.2 (section 5.1.1 en annexe) présente la construction schématisée du biosenseur RhoA-2G. En résumé, le donneur mTFP1 est lié au domaine de liaison à RhoA (RBD) de son effecteur rhotekin. Puis un lien de 60 acides aminés relie à l'accepteur Venus, lui même relié à RhoA. Lorsque RhoA est sous forme GTP, elle a une forte affinité pour le domaine RBD et cela entraîne un changement de conformation important du biosenseur. La présence d'un long lien entre les fluorophores crée un FRET bas dans l'état inactif du biosenseur. Ainsi le changement en ratio d'émission atteint 147%, le meilleur changement obtenu parmi leurs différentes constructions. On retiendra également, que les variations importantes de FRET du biosenseur sont localisées sur les bords de la cellule, avec une étendue spatiale faible, ce qui justifie l'usage de la réflexion totale interne (TIRF) lors de l'étude de [Fritz et al., 2013].

2.3.1 Calibration des fuites spectrales

La première étape de calibration porte sur la détermination des α^{BT} et δ^{DE} à partir des transfections transitoires de fibroblastes NIH-3T3 par les fluorophores donneurs seulement et accepteurs seulement pour calculer les fuites spectrales. Les images des trois canaux sont acquises, et les triplets de pixels correspondants sont regroupés.

L'analyse statistique des populations de pixels révèle des comportements déviants aux valeurs extrêmes de l'intensité de fluorescence. Par conséquent, les pixels de toutes les cellules confondues sont regroupés, ceux trop intenses ou trop faibles en intensité sont éliminés par les percentiles, méthode la moins biaisée qui ne s'appuie que sur la statistique, sans avoir à faire de choix arbitraire de sélection. Les cellules de calibration ont été choisies pour avoir une intensité de fluorescence comparable à celle avec biosenseur.

Cette analyse a donné les résultats présentés dans le tableau suivant, en ne conservant pour le calcul que les percentiles compris entre 70 et 95 pour l'ensemble concaténé de tous les pixels de toutes les cellules. Les pixels de faible intensité sont supprimés car ils sont trop sensibles au bruit qui devient dominant. Les pixels trop intenses correspondent souvent à des organelles dans les cellules qui peuvent être fortement autofluorescentes, sans lien avec les fluorophores du biosenseur.

α^{BT}	stdBT	SEM(BT)	δ^{DE}	stdDE	SEM(DE)
0.643	0.065	1.8×10^{-3}	0.264	0.182	8.7×10^{-3}

TABLE 2.1 – Valeurs de δ^{DE} et α^{BT} retenues. std = erreur standard, SEM = erreur sur la détermination de la moyenne, $N_{cell,BT} = 15$ et $N_{cell,DE} = 21$, ce qui correspond à $N_{pixels,BT} = 1.34 \times 10^3$ et $N_{pixels,DE} = 0.44 \times 10^3$

La valeur très élevée de α^{BT} peut être largement expliquée par le jeu de filtres que nous utilisons, et qui sont plus adaptés au fluorophore donneur Cerulean qu'à mTFP1. Comme montré en figure 5.14 en Annexe, le spectre d'émission de mTFP1 est plus décalé vers les grandes longueurs d'ondes et ne présente qu'un seul pic contrairement à celui de Cerulean, on collecte donc moins d'intensité dans le canal donneur venant de mTFP1.

2.3.2 Auto-calibration

En principe, l'ajustement est réalisé sur l'ensemble des données expérimentales ($N_{cellules} = 15$ "Rh2G", $N_{pixels} = 1350165$), et donne la valeur des γ^M et β^X issus du meilleur plan passant par les pixels de toutes les cellules. Néanmoins, un traitement est appliqué aux pixels de toutes les cellules pour éviter des artefacts. Les cellules sont tout d'abord parcourues et celles dont l'intensité de fluorescence, ou l'état phénotypique est aberrant sont éliminées. D'autre part, on exclut les valeurs extrêmes des pixels en ne conservant que les percentiles compris entre le 10è et le 98è percentile (dans chaque canaux). Les calculs de percentiles sont réalisés cellules par cellules. Contrairement aux α^{BT} et δ^{DE} , moins de pixels sont éliminés du calcul. En effet, pour α^{BT} et δ^{DE} on cherche une valeur médiane la plus pertinente dans le but de faire un ratio entre deux valeurs. Pour γ^M et β^X , on cherche à ajuster un plan, ce qui requiert la plus grande étendue en intensité pour balayer correctement le plan.

On peut désormais représenter dans l'espace 3D $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$ les pixels de toutes les cellules exprimant le biosenseur RhoA-2G. Cela donne les nuages de points en bleu et magenta de la figure 2.1.

On superpose à ces nuages de points le plan ajusté par la méthode des moindres carrés, dont les coefficients directeurs donnent accès aux γ^M et β^X (plan en maillage grisé).

La comparaison visuelle des nuages de points et du plan calculé constitue la première vérification du bon fonctionnement de l'ajustement. Il faut impérativement que le plan calculé passe en moyenne par le centre des nuages de points des cellules. Si le nuage de points d'une cellule dévie très fortement des autres et n'est pas traversée par le plan calculé, elle est aberrante. Comme vu en figure 1.10, différentes valeurs de stoechiométrie décrivent des plans différents. Une cellule peut avoir une stoechiométrie aberrante et devrait être écartée de l'analyse car elle ne peut pas être décrite par le même jeu de paramètres. En figure 2.1B., la cellule dont le nuage de points est coloré en magenta se détache très nettement du nuage de points principal et s'écarte du plan ajusté. Le biosenseur exprimé présente une stoechiométrie inférieure (voir figure 1.10) à celle pour les autres cellules. Cette cellule est donc écartée de l'analyse (voir la discussion en section 2.4 pour son impact).

De manière plus systématique, on calcule les valeurs de FRET et de S pour chaque cellule avec ce premier jeu de γ^M et β^X . En traçant le diagramme à moustaches des valeurs de S (voir figure 2.1C.), on peut voir apparaître une cellule dont la stoechiométrie est très en-deça de la valeur moyenne des autres cellules. La cellule 12, correspondant au nuage de points magenta, présente une stoechiométrie inférieure à 40%, hors des variations des autres

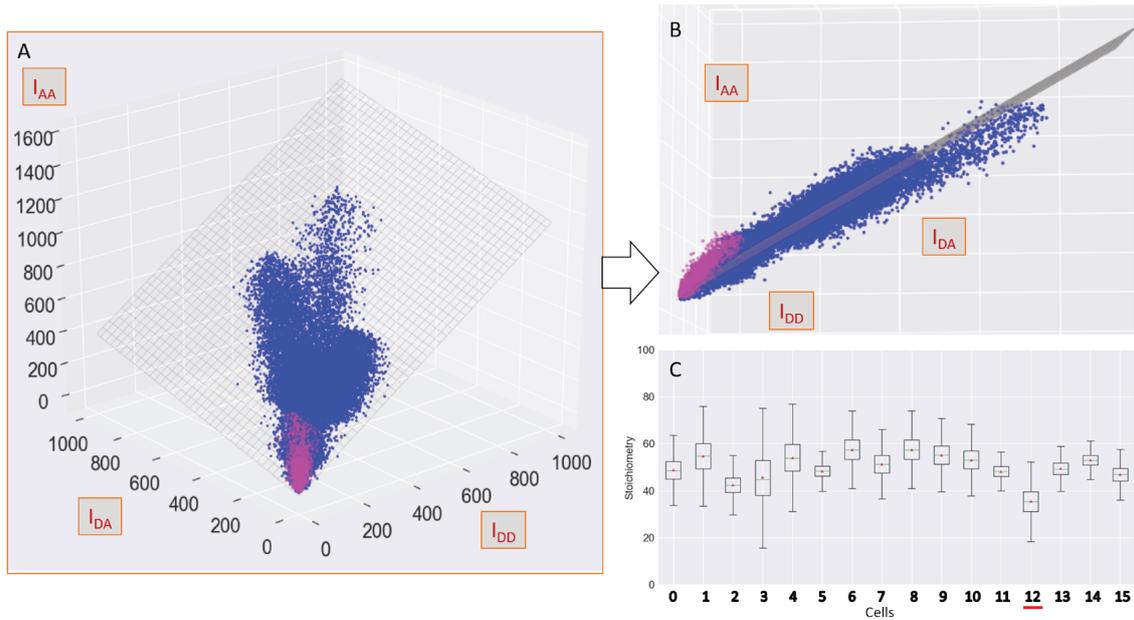


FIGURE 2.1 – Résultats de l'autocalibration. **A.** Représentation 3D des nuages de points associés aux cellules Rh2G (bleu, une cellule particulière en magenta) dans l'espace $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$. Maillage gris : plan d'ajustement des données. **B.** Même ensemble vu de côté. **C.** Diagramme à moustaches des valeurs de stoechiométrie, cellule par cellule.

cellules. Tout comme l'étude visuelle du phénotype des cellules, l'étude de la distribution des valeurs de stoechiométrie parmi les cellules est également un moyen d'écarter les cellules "pathologiques". La stoechiométrie devient un critère quantitatif pour écarter les cellules dont l'état physiologique est déviant, en général des cellules apoptotiques.

Une fois cette nouvelle sélection de cellules effectuée, on peut réitérer le processus et recalculer les γ^M et β^X par un nouvel ajustement des nuages de points restant, tout en s'assurant que les étapes de vérification en terme de stoechiométrie sont désormais sans artefacts.

On obtient au bout de ce processus le tableau suivant pour les facteurs de calibration :

β^X	γ^M	R^2	$\text{red}\chi^2$
0.387	2.985	0.943	9.115

TABLE 2.2 – β^X et γ^M pour un percentile de 10-98 appliqué sur les pixels cellule par cellule, en écartant une cellule à la stoechiométrie aberrante. R^2 et $\text{red}\chi^2$ précision de l'ajustement.

2.3.3 Estimation de la qualité de la calibration

Il est indispensable d'évaluer la qualité de la méthode d'autocalibration pour s'assurer que les β^X et γ^M sont correctement déterminés, et que le résultat est comparable à celui qui serait obtenu par la méthode originelle avec les étalons de FRET. Nous cherchons à valider la justesse et la précision de la méthode d'autocalibration.

Incertitudes Les incertitudes pour β^X et γ^M sont difficile à évaluer. Nous avons essayé de différentes manières, et nous avons retenu simplement les deux valeurs issues de l'ajus-

tement du nuage de points par un plan, présentés en tableau 2.3.2. On obtient le R^2 qui est le coefficient de détermination. Il est calculé à partir du ratio entre la somme des carrés des écarts au fit et la somme des carrés des écarts à la moyenne. Son écart à 1 quantifie dans quelle mesure l'ajustement est imprécis. Le $\text{red}\chi^2$ ("reduced chi square") quantifie la dispersion des nuages de points autour du plan déterminé par ajustement. C'est la somme des carrés des écarts au fit divisés par la valeur expérimentale. Cette valeur n'est pas normalisée, elle n'a pas de borne comme R^2 , et est uniquement comparable d'un ajustement à un autre pour le même jeu de données.

Convergence et Bootstrap Les incertitudes sur la détermination du plan R^2 et χ^2 ne donnent pas une valeur interprétable facilement comme une incertitude directement sur les β^X et γ^M .

Auréli Dupont a développé une méthode d'analyse basée sur un sous-échantillonnage aléatoire de taille variable des pixels. Cette analyse en "bootstrap" consiste à diviser l'ensemble des pixels des cellules Rh2G en petits sous-ensembles de données de tailles variables. Le calcul des β^X et γ^M est réalisé sur chaque sous-ensemble avec la même méthode des moindres carrés (mais répétée N fois). Les différents β^X et γ^M sont tracés en fonction de la taille du sous-échantillon pour apprécier la convergence du processus (voir [Coulomb et al., 2020] pour les détails, et figure 5.17 en annexe). L'ensemble des β^X et γ^M pour chaque taille d'échantillonnage peut être vu comme deux distributions. L'écart type sur une fenêtre glissante est calculé sur cette distribution. Cela permet de recréer une statistique pour β^X et γ^M et donc de calculer une erreur statistique comme l'écart-type. Cette méthode donne une estimation minimale de l'incertitude sur β^X et γ^M , la plus grande incertitude provenant de la qualité et représentativité du jeu de données utilisé.

Vérification avec la stoechiométrie Les valeurs de FRET et de stoechiométrie peuvent être calculées pour chacune des cellules. Tout en conservant l'information pixels à pixels, on peut alors tracer les histogrammes 2D E-S, S- I_{AA} et E- I_{AA} présentés en figure 2.2. Ceux-ci permettent de déceler des comportements déviants comme des corrélations entre ces trois grandeurs. En effet, la théorie du Quanti-FRET assure que le FRET et la stoechiométrie et le FRET sont indépendants de l'intensité de fluorescence émise par pixel, et que pour chaque pixel, FRET et stoechiométrie ne sont pas liés.

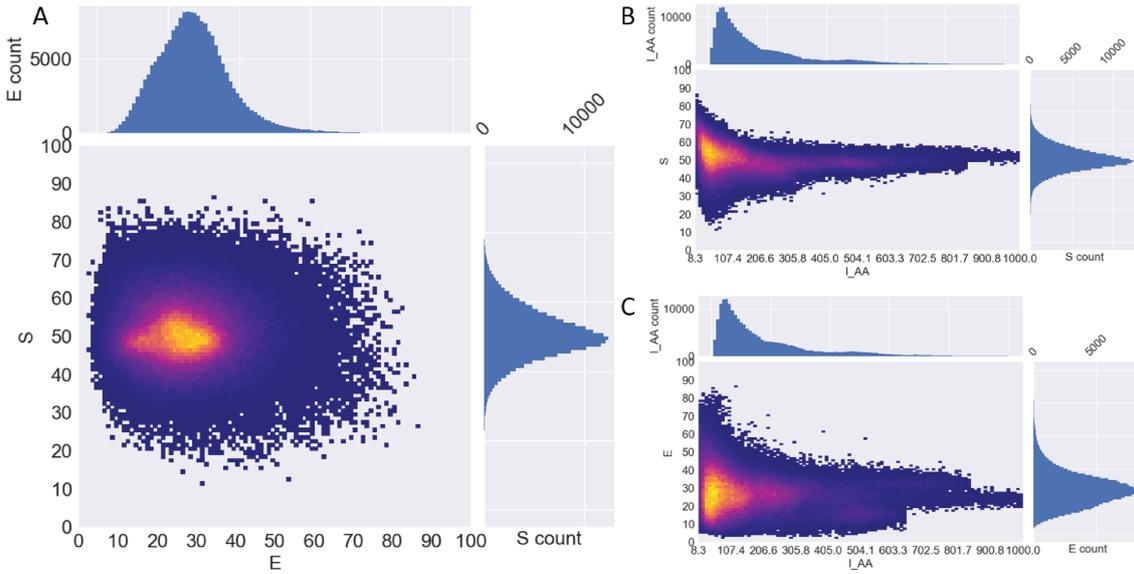


FIGURE 2.2 – Histogrammes 2D pour les cellules de l'autocalibration Rh2G. **A.** Pour E et S (en pourcentages). **B.** Pour S et I_{AA} (en unités arbitraires). **C.** Pour E et I_{AA} (en u.a.).

On doit s'assurer que l'histogramme de S est bien centré en un S_{moyen} proche de 50%, la valeur théorique pour ce biosenseur, et que l'histogramme de S en fonction de I_{AA} ne présente aucune tendance. Le premier point est bien vérifié par la figure 2.2A. Néanmoins, on constate un petit nuage secondaire dont les valeurs de S sont plutôt proches de $S = 55\%$. Pour se faire une idée des cas aberrants, on peut se référer à la figure 1.12 qui présente un histogramme 2D E-S avant calibration avec une stoechiométrie non constante (en forme de virgule). Le second point est bien vérifié en figure 2.2B. Pour les intensités comprises entre 150 u.a. et 1000 u.a., la stoechiométrie est faiblement dispersée autour de 50%. Seuls les pixels de très faible intensité (< 100 u.a.) présentent une divergence en fonction de I_{AA} . Ces pixels sont de très faible intensité, donc peu significatifs, et comme E et S sont calculés comme des ratios, lorsque les valeurs sont très faibles et dominées par du bruit, il est plus probable d'avoir des divergences. Encore une fois, l'usage du percentile est justifié. Enfin, en figure 2.2C., on constate différentes valeurs de E associées aux différentes cellules, mais pour chaque cellule la valeur du FRET est constante quelle que soit la valeur de I_{AA} (nuages horizontaux). Cellule par cellule, il n'y a pas de tendance entre E et I_{AA} .

Si jamais des corrélations entre ces trois grandeurs apparaissaient, il faudrait revenir à l'étape précédente et trouver la cause de la corrélation : cellule déviante, SNR trop faible, mauvaise calibration de α^{BT} et δ^{DE} .

Filtrage qualité Du fait de l'hypothèse faite sur S, par construction le nuage de points est centré sur la valeur supposée (ici 50%). On perd donc la mesure de S en tant que valeur absolue. Cependant, sa déviation à la valeur théorique garde du sens. Comme dans la méthode Quanti-FRET présentée dans le chapitre précédent, on peut utiliser l'écart à $S_{theorique}$ pour qualifier la qualité de chaque pixel. En combinant cela à un filtrage spatial gaussien, nous créons un filtrage gaussien pondéré par un indice de confiance défini par une distribution gaussienne de l'écart de S à la valeur théorique (voir chapitre 1, équations 1.3.19 et 1.3.20).

Les cartes de FRET présentent un bruit important du fait des opérations réalisées sur des

images bruitées. Un filtrage spatial est donc souvent nécessaire pour moyenniser localement l'information et lisser les valeurs. Un simple filtrage gaussien moyenne les valeurs des pixels voisins avec un poids gaussien, mais il peut biaiser les valeurs filtrées si les pixels voisins sont aberrants. Ici, avec le filtrage gaussien pondéré par l'écart à la stoechiométrie théorique, nous faisons en sorte que le filtrage gaussien n'est pas biaisé et que les valeurs de FRET restent quantitatives.

Pour l'instant, nous n'utilisons cet indice de confiance que pour la représentation des cartes de FRET. Mais si ce sont les valeurs moyennes de FRET sur tout ou partie de la cellule qui nous intéressent, on pourrait également effectuer des moyennes pondérées pour les valeurs de FRET.

2.4 Discussion

La méthode par autocalibration perd la mesure de la stoechiométrie réelle en cellule. Dans tous les cas de FRET intra-moléculaire, la majorité des biosenseurs, cela n'impacte ni la justesse de FRET calculé, ni l'indice de confiance du filtrage qualité basé sur la stoechiométrie apparente calculée. On pourra alors utiliser S pour vérifier la qualité de la calibration et du jeu de données. En revanche, pour le FRET inter-moléculaire cette méthode n'est pas applicable.

Effet d'une erreur sur la stoechiométrie théorique Les équations que l'on a présentées sont simplifiées dans le cas $S = 0.5$ car le terme de stoechiométrie disparaît simplement de l'équation du plan 2.2.3. Si l'on garde ce terme et qu'on le passe dans le membre de gauche, on peut redéfinir le vecteur des facteurs de correction comme :

$$\mathbf{B}' = \frac{1-S}{S} \begin{pmatrix} \gamma^M \beta^X \\ \beta^X \end{pmatrix}$$

Les facteurs de correction déterminés dans le cas où $S \neq 0.5$ seront donc $\gamma^{M'} = \gamma^M$ et $\beta^{X'} = \frac{1-S}{S} \beta^X$ (où γ^M et β^X sont les facteurs déterminés avec l'hypothèse $S = 0.5$). Ainsi, une erreur sur la valeur théorique de la stoechiométrie affectera uniquement β^X , qui "compensera" cette erreur pour que le plan ajuste bien les données. Étant donné que γ^M reste inchangé et que la probabilité de FRET E ne dépend pas de β^X (voir équation 2.2.1), alors une erreur sur l'hypothèse de stoechiométrie n'a pas de conséquence en théorie sur les valeurs de FRET E . Par contre, en toute logique, S dépend de β^X (voir équation 2.2.2) et le S mesuré après une telle calibration sera faux. Il sera artificiellement $\langle S_{apparent} \rangle = 0.5$.

Une limitation de l'autocalibration réside dans le fait de ne mesurer que peu de valeurs de FRET en cellule. Pour améliorer la précision de la calibration, il faut augmenter la gamme de valeurs de FRET observées. Une méthode simple consiste à utiliser des drogues.

Ajout d'une drogue L'ajustement du nuage de points dans l'espace 3D des triplets de fluorescence ne peut se faire qu'à stoechiométrie constante et pour des variations significatives de FRET du biosenseur. Il est possible que le FRET du biosenseur ne varie pas considérablement en cellule de façon naturelle. On peut alors utiliser des drogues qui agissent sur les voies de signalisation ciblées par le biosenseur pour forcer la majorité des biosenseurs dans leur état actif (drogues activatrices) ou inactif (drogues inhibitrices).

Pour la Rho GTPase RhoA, l'inhibiteur Y-27632 a été utilisé. C'est en fait un inhibiteur de Rho-ROCK qui est un effecteur de RhoA (ce qui étrangement n'explique pas vraiment comment il agirait directement sur RhoA, pourtant souvent utilisé en ce sens [de Beco et al., 2018], [Cai et al., 2014]). Il permet d'obtenir des cellules avec le FRET le plus faible accessible avec ce biosenseur. Cette condition sera appelée "Y27" par la suite : des cellules REF52 exprimant de façon stable le biosenseur RhoA-2G ont été mises en contact de Y-27632 et imagées pendant 30min.

Les analyses présentées précédemment ont été réitérées avec cette nouvelle condition qui représente $N_{cellules} = 8$ et $N_{pixels} = 932490$. L'influence de ces nouvelles cellules est présentée dans les paragraphes suivants et la figure 2.3.

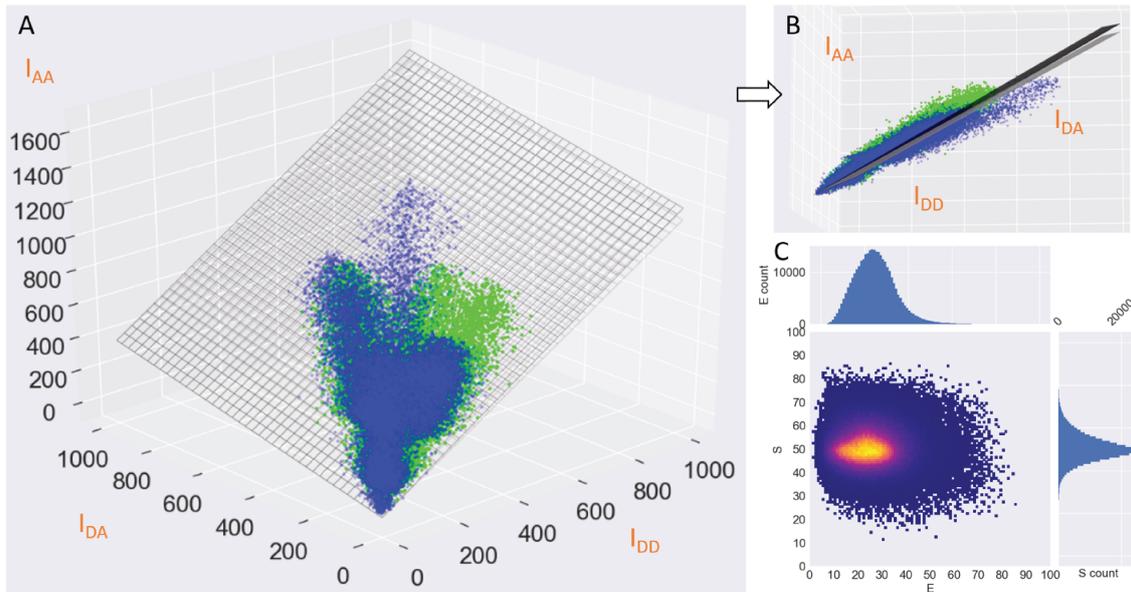


FIGURE 2.3 – Résultats de l'autocalibration avec les cellules Y27 (drogue) ajoutées aux Rh2G. **A**. Représentation 3D des nuages de points associés aux cellules Rh2G (bleu) et Y27 (vert) dans l'espace $\{I_{DD}, I_{DA}, I_{AA}\}$. Maillage gris : plan d'ajustement des données. **B**. Même ensemble vu de côté. Le plan d'ajustement pour Rh2G uniquement en gris clair, le nouveau avec les deux conditions en noir. **C**. Histogrammes 2D E-S (en pourcentages) pour les cellules des deux conditions.

Le même processus de vérification de la validité de l'autocalibration est réalisé. L'étude des nuages de points en 3D ainsi que l'ajustement du plan est fait à nouveau avec l'ajout des cellules Y27. Le nouveau plan passe toujours en moyenne par les nuages de points (figure 2.3B). Si l'on regarde les données représentées en 3D sur le panneau A de la figure 2.3, on observe que les points des cellules Y27 (en vert) ne balayent pas plus largement les valeurs de FRET. Il y a simplement davantage de points aux faibles valeurs de FRET. Si l'on compare au plan trouvé sans les cellules Y27, il y a une légère différence entre les deux (plans gris et noir sur la figure, panneau B). Cela ne modifie donc pas considérablement la valeurs des facteurs β^X et γ^M (voir tableau 2.3). Enfin, l'histogramme 2D E-S en figure 2.3C. conserve une distribution des valeurs de S centrée sur un $S_{moyen} \approx 50\%$ sans corrélation visible entre E et S.

Cette drogue ne fait qu'explorer les faibles valeurs de FRET accessibles au biosenseur. Il serait souhaitable d'explorer les hautes valeurs de FRET accessibles au biosenseur avec un

activateur de RhoA. Par exemple, le Platelet-derived growth factor (PDGF) est un facteur de croissance très souvent utilisé en opposition à Y27. Il a un impact sur le réseau d'actine et sur les GTPases souvent opposé à celui de Y27 [Martin et al., 2016].

Un estimateur qualité de la calibration Il est bien difficile de définir un seul nombre pour quantifier la qualité de l'ajustement, et par là même de la calibration. Les grandeurs qui quantifient les incertitudes sur la méthode d'autocalibration sont :

- le coefficient de détermination (de la régression linéaire) R^2
- le coefficient $\text{red}\chi^2$: il quantifie la dispersion du nuage de points. Comme il n'est pas normalisé, nous n'avons pas pu l'utiliser pour quantifier la précision de la méthode.
- les coefficients de corrélation de Spearman entre les trois grandeurs E, S et I_{AA} , notés $\rho(X, Y)$

Nous proposons ici de définir un estimateur de la qualité de la calibration par :

$$Q = R^2 - \frac{1}{3}(|\rho(AA, E)| + |\rho(AA, S)| + |\rho(E, S)|) \quad (2.4.1)$$

Comme vu en figure 2.2, un critère de validation de la méthode d'autocalibration est l'absence de corrélation entre E, S et I_{AA} . Ce critère est ici quantifié par l'usage des coefficients de corrélation de Spearman moyennés pour les trois combinaisons, alliés au coefficient de détermination R^2 pour l'ajustement du nuage de point 3D. Par définition, Q a pour maximum 1, qui serait obtenue pour $R^2 = 1$ et des corrélations exactement nulles. Lorsqu'une corrélation entre E, S ou I_{AA} existe, cela diminue Q et la qualité de la calibration analysée. R^2 est habituellement très critiquable lorsqu'il est employé pour quantifier la pertinence d'un ajustement et choisir entre deux modèles. En revanche, ici nous ne cherchons pas à valider un modèle, mais simplement à quantifier la qualité de l'ajustement, ce pour quoi R^2 est qualifié.

Le tableau 2.3 présente les différentes valeurs de Q obtenues en variant le jeu de cellules pour la méthode d'autocalibration :

Condition	Rh2G all	Rh2G-43H	Rh2G+Y27
β^X	0.394	0.387	0.386
γ^M	2.929	2.985	3.170
R^2	0.937	0.943	0.937
Q	0.77	0.77	0.76

TABLE 2.3 – Valeurs de l'estimateur qualité de la calibration selon les conditions, ainsi que β^X , γ^M et R^2 .

La première colonne "Rh2G all" représente la calibration faite sur l'ensemble de toutes les cellules Rh2G. Q est plus faible que 0.94, la valeur commune de R^2 pour ces conditions, donc des corrélations non négligeables entre E, S et I_{AA} existent. La seconde colonne représente les mêmes données auxquelles on a retiré la cellule magenta de la figure 2.1 "43H" pour sa stoechiométrie trop éloignée des autres cellules. La valeur de R^2 ne change pas de manière significative et celle de Q est inchangée. Enfin, la troisième colonne concerne les deux conditions Rh2G et Y27 assemblées. Bien que présentant a priori plus de valeurs de FRET donc décrivant mieux le plan d'ajustement, l'estimateur Q n'est pas significativement différent. Cette nouvelle condition n'apporte donc pas plus de précision à l'autocalibration. Que

ce soit pour les facteurs de calibration, ou pour la précision de l'autocalibration, aucune variation forte n'est constatée en faisant varier les conditions considérées.

Pour la calibration avec les étalons de FRET, le calcul donne $Q = 0.951$ ($R^2 = 0.995$) avec les données d'A. Coullomb. La précision de la calibration avec les étalons de FRET paraît bien meilleure.

Néanmoins, on ne peut pas comparer directement la précision atteinte avec les étalons de FRET utilisés par A. Coullomb et celle présentée dans ce travail. En effet, il ne s'agit pas du même couple de fluorophores. Différents fluorophores peuvent mûrir différemment et subir un photo-blanchiment différent, cela peut affecter à la fois la valeur moyenne de S et sa dispersion. D'autre part, les propriétés photophysiques d'un couple de fluorophores dépendent de son micro-environnement local. D'après l'expérience des équipes qui créent des biosenseurs, il est difficile de prédire quelle sera la meilleure paire de fluorophores pour différents biosenseurs. Ce n'est pas directement la paire qui a les meilleures propriétés photophysiques mesurées *in vitro* qui sera forcément la plus performante dans une construction complexe donnée. La stoechiométrie peut également être affectée par la longueur de la séquence peptidique entre les deux fluorophores, zone qui peut être particulièrement longue dans certains biosenseurs. A ce titre, l'autocalibration sera peut-être plus pertinente que la calibration par étalons FRET. L'avantage indéniable d'une expérience avec les étalons est que l'on peut atteindre des niveaux d'expression plus élevés car ils ne sont pas supposés interagir avec les voies de signalisation. Un meilleur rapport signal à bruit est un atout pour ajuster les données de manière plus précise.

Un autre élément de comparaison est l'étude comparative entre notre laboratoire et un autre laboratoire faite précédemment [Coullomb et al., 2020]. Elle a montré que malgré une précision bien inférieure à celle obtenue par A. Coullomb ($Q=0.584$ pour $R^2 = 0.82$ pour cet autre jeu de données), les mesures de E étaient en accord. La mesure de E par la méthode Quanti-FRET est donc restée quantitative même avec cette précision faible. On peut en conclure dans notre cas que le FRET est bien quantitatif et que la précision reste tout à fait correcte pour des valeurs de Q supérieures à 0.6.

Robustesse de l'autocalibration Le fait de retirer une cellule aberrante des données de Rh2G ou d'ajouter le jeu de données Y27 ne modifie pas drastiquement la valeur des β^X et γ^M ni la qualité de l'autocalibration. Cela est permis par l'usage d'un nombre suffisant de cellules et l'étude en terme de pixels et non moyennée sur les cellules. Ainsi, le fait de retirer une cellule conserve un nuage de points dans l'espace 3D suffisamment dense et bien fourni pour être correctement ajusté.

La force statistique de la condition Y27 drogue reste dans cette étude limitée. Néanmoins, leur usage plus extensif, avec une drogue activatrice et inhibitrice, semble une excellente voie pour décrire au mieux le plan d'ajustement en variant le plus possible le FRET du biosenseur étudié.

En résumé, la précision et la qualité de l'autocalibration reste *in fine* limitée par la qualité des cellules imagées. La dispersion de la stoechiométrie mesurée qui augmente l'incertitude sur la détermination du plan reste le facteur principal. Ceci a plus d'impact que les méthodes d'analyses qui cherchent à diminuer l'incertitude de mesure. En effet, Q ne varie pas considérablement selon les raffinements envisagés, selon que l'on sélectionne les cellules ou que l'on ajoute la condition avec drogue.

Manque des étalons de FRET Pour compléter cette étude et la soumettre pour publication, il faudra comparer directement les deux versions de Quanti-FRET. Pour cela,

il est indispensable de calculer les facteurs de calibration selon la méthode 1.0, c'est-à-dire avec les étalons de FRET adaptés au biosenseur RhoA-2G utilisé ici. La comparaison des facteurs de calibration obtenus, la superposition des plans calculés dans l'espace 3D avec la méthode auto-calibration et les étalons permettront d'évaluer la méthode de l'auto-calibration et de comprendre les avantages et les limites de chacune des deux approches.

2.5 Conclusion

Rappelons que le but premier du FRET quantitatif est d'éviter tout biais dû à la corrélation avec I_{AA} . On a ainsi montré, que malgré l'hypothèse sur la stoechiométrie, même en cas d'une erreur de quelques % sur la valeur vraie de S, le résultat sur le FRET mesuré ne change pas significativement. Dans les travaux antérieurs, une pratique commune était de normaliser la mesure du FRET cellule par cellule (souvent avec l'usage de drogues), ce qui rendait impossible la comparaison des valeurs de FRET d'une cellule à une autre. L'auto-calibration permet de s'affranchir de cette limitation très importante. On peut désormais comparer des expériences indépendantes sans se limiter à des variations relatives au sein de chaque cellule ou après une stimulation. Cela ouvre la porte à l'usage de substrats de nature différentes, et augmente le champ des expériences possibles.

Face à la difficulté de réaliser la calibration du dispositif expérimental avec les étalons de FRET, nous avons développé une méthode alternative d'autocalibration utilisant directement les données de fluorescence acquises sur des cellules exprimant les biosenseurs. Les nuages de points dans l'espace 3D des triplets d'images de fluorescence sont ajustés par un plan, et les coefficients directeurs de ce plan donnent accès aux facteurs de calibration. La qualité de l'autocalibration en terme de précision est analysée avec la représentation en 3D des nuages de points conjointement avec le plan d'ajustement, les diagrammes 2D E-S, E- I_{AA} et S- I_{AA} , et la dispersion des valeurs de S cellule par cellule. L'autocalibration est intrinsèquement limitée par l'hypothèse initiale de S connue, qui ne peut plus être mesurée. Cependant, la mesure de S permet toujours l'utilisation du filtrage gaussien pondéré introduit précédemment.

Nous avons commencé à comparer l'autocalibration à QuantI-FRET 1.0. Mais une comparaison quantitative sur la base des mêmes fluorophores est nécessaire pour évaluer sa précision à déterminer les β^X et γ^M . Ce complément sera réalisé dans l'article en préparation. Néanmoins, étant donné la sensibilité des fluorophores à leur micro-environnement, il faut prendre garde au fait que calibrer le dispositif expérimental avec les étalons de FRET (construction théorique différente du biosenseur) peut induire un biais sur la calibration. L'autocalibration possède la force de calibrer directement avec l'objet qui sera étudié par la suite.

Cette méthode d'autocalibration devrait permettre de faciliter l'accès à l'utilisation du FRET quantitatif pour des non spécialistes de FRET ou de la bio-ingénierie. Les facteurs de qualité, associés à des critères quantitatifs (Q) et visuels (représentation 3D, histogramme 2D) simples permettent de s'assurer que l'autocalibration n'est pas biaisée et s'est bien déroulée.

Chapitre 3

Perspectives

Une fois le dispositif expérimental auto-calibré avec les données du biosenseur RhoA présenté plus haut, nous pouvons analyser les cartes spatio-temporelles d'activité de la GTPase pour tenter d'expliquer certains motifs de fonctionnement du réseau de signalisation associé. Il s'agit dans cette partie de faire les premières observations et de mettre en place des outils d'analyse. Sur la base d'un exemple particulier, nous montrerons les cartes de FRET obtenues puis nous mettrons en lumière la dérive temporelle observée due au photoblanchiment des fluorophores. Enfin, nous présenterons une méthode d'analyse très prometteuse basée sur le principe mathématique de décomposition en valeurs singulières. N'ayant pas eu le temps d'obtenir des résultats biologiquement pertinents, nous nous intéressons surtout ici à l'aspect méthodologique.

3.1 Premières observations

3.1.1 Observations du film d'épifluorescence

La cellule exemple Cette partie s'appuie sur une cellule modèle présentée en figure 3.1. Cette cellule est une REF52 cultivée sur un motif adhérent de forme carrée, et exprime de manière stable le biosenseur RhoA-2G rapidement présenté au chapitre précédent et plus en détails dans les annexes section 5.1. La méthode de FRET par excitation alternée produit trois images de fluorescences appelées triplet émises par les fluorophores donneur (mTFP1) et accepteur (Venus). On voit sur la figure 3.1 que l'intensité de fluorescence est beaucoup plus faible aux bords de la cellule, là où on s'attend à observer des variations intéressantes. Ceci est principalement dû à l'épaisseur de la cellule qui est beaucoup plus fine aux bords. L'utilisation d'un microscope de fluorescence en réflexion totale (TIRF) serait très utile pour s'affranchir de ce problème.

La calibration par QuanTI-FRET est réalisée avec les facteurs de calibration (α^{BT} , δ^{DE} , β^X , γ^M) obtenus par autocalibration dans la partie précédente. La cellule présentée ici fait donc partie du jeu de données qui a participé à l'autocalibration. Ainsi, l'autocalibration perd la mesure de la stoechiométrie qui devient une hypothèse, mais on peut exploiter la probabilité de FRET sur laquelle aucune hypothèse ne repose.

Motifs d'adhésion Les substrats à motifs adhérents sont utilisés depuis plusieurs années dans l'équipe MOTIV, introduits et développés par Martial Balland. Ces substrats sont obtenus en déposant sur une lamelle de verre une protéine sur laquelle les cellules adhèrent, la fibronectine. Le dépôt de fibronectine est contrôlé grâce à un masque et à une illumination

aux UV qui détruit spécifiquement un polymère déposé auparavant et qui empêche les cellules d'adhérer [Carpi et al., 2011, Hennig et al., 2020].

Ces substrats avec motifs ont plusieurs fonctions. En ce qui nous concerne, ils servent à initialiser la forme mais aussi l'architecture du cytosquelette et des adhésions focales des cellules. Cela fixe des conditions limites mécaniques et physiques, qui ont un impact sur la dynamique du cytosquelette, par exemple sur l'orientation des lamellipodes [Parker et al., 2002]. Les zones de haute courbure de ces patterns (les coins des formes en carré par exemple) induisent une activité des lamellipodes plus importante [James et al., 2008]. Les cellules se ressemblent toutes et ont un comportement très proche. Cette reproductibilité est intéressante pour réaliser des analyses quantitatives et les moyenner sur un grand nombre de cellules. Concernant les motifs carrés, les coins des carrés présentent des adhésions focales matures [Théry et al., 2006] qui ancrent la cellule au substrat et sont le lieu de forces de traction importantes via les fibres de stress. On s'attend donc à une activité des petites GTPases différente du reste de la cellule aux coins du carré.

Observations morphologiques La simple observation des films de fluorescence procure déjà beaucoup d'informations d'ordre biologique. Lorsque l'expression des biosenseurs est suffisante dans toute la cellule, les films de fluorescence donnent un aperçu très fidèle de l'activité membranaire. Lorsque la mise au point est faite à la surface de la lamelle, on distingue clairement les protrusions fines de membrane, et les vagues de membrane qui parcourent les extrémités (ruffles).

La figure 3.6 illustre ce fait. La séquence d'images de fluorescence présente l'apparition d'une protrusion au cours du temps. On voit que la quantité de biosenseurs présents dans le coin haut gauche augmente au cours du temps conjointement à une projection de matière membranaire à cet endroit. Comme attendu, cette protrusion a lieu au niveau d'un coin du motif d'adhérence carré, là où la courbure de la forme est la plus grande. D'autre part (non montré sur la figure 3.6), la cellule se rétracte progressivement au cours du temps, perdant son accroche aux extrémités. C'est un signe de mauvais état de cette cellule, qui ne permettra donc pas de conclusions biologiques. En revanche, cela peut expliquer le fait étrange que le FRET est plus intense en valeur absolue au centre de la cellule. On s'attend à ce qu'il soit plus intense aux bords à cause de l'activité protrusive de la cellule [Martin et al., 2016, Fritz et al., 2013], mais la rétraction globale en cours prime probablement.

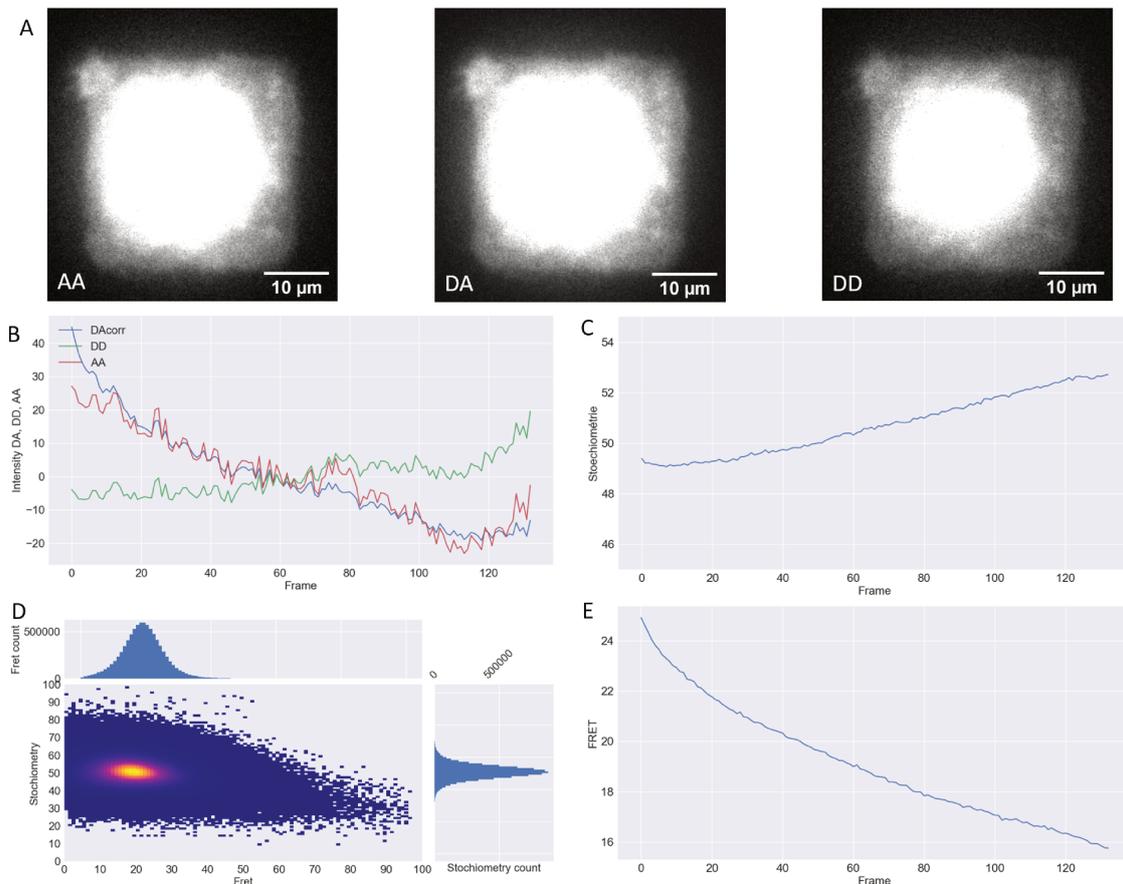


FIGURE 3.1 – Photo-blanchiment. **A.** Cellule exemple prise au long de ce chapitre, cultivée sur un motif d’adhérence carré. On voit les trois canaux de fluorescence qui servent à calculer le FRET. **B.** Évolution temporelle moyennée sur toute la cellule de l’intensité de fluorescence dans les trois canaux. **C.** Évolution temporelle de la stoechiométrie moyennée sur toute la cellule. **D.** Histogramme 2D E-S sommé pour tout le film de la cellule **A.** **E.** Évolution temporelle de la probabilité de FRET E moyennée sur toute la cellule.

3.1.2 Observations du film de FRET

Le film de FRET, dont on peut voir un extrait en figure 3.6, présente un FRET global plus élevé au centre de la cellule que sur le pourtour, et décroît globalement au cours du temps. Il ne présente pas de gradient très marqué entre le pourtour et le centre. Un profil radial d’intensité moyenné sur quelques pixels présente une décroissance du FRET du centre vers le pourtour. C’est en contradiction apparente avec de nombreux travaux qui prédisent pour un motif carré une activité de RhoA plus élevée aux coins, et donc un FRET plus élevé sur les coins. Néanmoins, comme la cellule est globalement en train de se rétracter, donc est en mauvaise forme et abandonne les adhésions focales aux extrémités pour se concentrer sur le centre, c’est peut être ce phénomène qui domine et explique ce résultat contre-intuitif. De plus, la calibration étant réalisée, on peut écarter tout biais photophysique (comme une dépendance à l’intensité de fluorescence plus grande au centre). Par ailleurs, une mesure moyennée à l’échelle d’une dizaine de pixels fait disparaître toute variation d’activité membranaire de RhoA. Cette constatation renforce l’importance d’une résolution sub-micrométrique de la mesure et d’une analyse locale des cartes de FRET.

Dans un premier temps, j'avais réalisé une étude rapide des films de FRET sans effectuer une calibration rigoureuse du montage. Les films de FRET obtenus étaient considérablement plats, avec très peu de variations de FRET, et surtout très uniformes. Ce résultat avait rendu évident l'importance de réaliser rigoureusement la calibration. La calibration permet d'avoir confiance dans une simple variation de quelques unités de FRET : elle la met en évidence et signale une réelle variation de conformation des biosenseurs d'activité.

Structuration de l'image Sur le film de la cellule sur motif carré, des clusters de FRET localement plus élevé apparaissent très clairement (figure 3.6). Pour s'assurer qu'ils n'étaient pas créés par le filtre "qualité" présenté plus haut, j'ai fait varier les différents paramètres du filtre, notamment ceux responsables du filtrage spatial et de la forme spatiale du résultat. À part pour des dimensions de filtrage trop faibles (pour lesquelles on conserve la pixelisation originale), les dimensions des clusters restent constantes et ne sont pas corrélées avec la taille du filtrage spatial (Voir en annexes figure 5.13). Cette structuration de l'activité de la petite GTPase est en accord avec l'importance des clusters en tant que vecteur d'information du réseau de signalisation. Les clusters (agrégats) sont un élément essentiel de la mécanotransduction. Les clusters immobiles permettent l'apparition et le renforcement des forces, tandis que les clusters mobiles permettent le transport (d'information, de molécules). Cette première observation de cluster d'activité mériterait une analyse approfondie, notamment à la lumière de [Gauthier and Roca-Cusachs, 2018] qui donnent aux clusters d'intégrines une importance cruciale dans la mécanotransduction. L'activité de RhoA ne peut pas s'étudier en faisant des moyennes spatiales, il faut conserver une résolution spatiale suffisante, et identifier les clusters d'activité. Cette approche est compatible avec la représentation micrométrique de l'action des GTPases. Leur action est conditionnée par la formation de complexes protéiques, associés à des protéines ancrées à la membrane.

3.2 Dérive temporelle et photoblanchiment

Les différents contrôles de calibration sur les films de FRET (figure 3.1) de cellules sur motifs ont mis en évidence une corrélation entre E et S non prévue par la théorie du QuanTI-FRET. Nous cherchons ici à étudier dans quelle mesure le photoblanchiment différencié des fluorophores serait impliqué dans cette corrélation.

Photo-blanchiment La courbe d'évolution de l'intensité lumineuse émise par un fluorophore en fonction du temps est une exponentielle décroissante en première approximation (car le nombre de photons émissibles par un fluorophore est limité). L'aire sous la courbe est constante en première approximation, donc si l'intensité initiale de fluorescence est plus élevée, elle va également décroître plus rapidement. Le choix de la puissance des lasers est donc impacté par la durée de l'expérience envisagée, sur laquelle l'intensité de fluorescence des fluorophores doit être constante ou ne pas trop diminuer. Dans notre cas, le blanchiment de l'accepteur n'est pas négligeable et limite l'interprétation des données.

Dans les bases de données des fluorophores (<https://www.fpbases.org/protein/mtfp1/>), l'accepteur (Venus) blanchit plus vite que le donneur (mTFP1). Pour mTFP1, $t_{1/2} = 163\text{s}$ (attention la puissance d'excitation associée n'est pas précisée, et rend impossible une comparaison simple des temps de décroissance de fluorescence) alors que pour Venus,

$t_{1/2} = 15$ s. Nous confirmons expérimentalement que le temps de décroissance de TFP est d'environ un ordre de grandeur plus grand que celui de Venus.

La figure 3.1 met en évidence une décroissance de l'intensité dans les canaux I_{AA} et I_{DA} conjointement à une croissance de l'intensité dans le canal I_{DD} . Vu que I_{DD} augmente alors que les deux autres canaux diminuent en intensité, cela signifie que c'est l'accepteur qui photoblanchit beaucoup plus vite que le donneur. En effet, quand un accepteur engagé dans du FRET photoblanchit alors la fluorescence du donneur associé augmente puisqu'il n'y a plus de transfert d'énergie par FRET. En conséquence, la probabilité de FRET diminue et la stoechiométrie augmente. Le donneur subit également probablement un photoblanchiment, mais de façon négligeable devant l'accepteur. C'est ainsi que nous interprétons que la courbe de probabilité de FRET moyennée sur toute la cellule diminue au cours du temps alors que la stoechiométrie augmente (figure 3.1 C et E). Si l'on fait l'histogramme 2D E-S sommé sur toute la durée du film (panneau D), alors on voit que le nuage est légèrement penché. C'est le résultat de cette dérive temporelle observée pour E et S. Cependant, les histogrammes 2D E-S pris séparément pour chaque image ne montrent pas de biais.

C'est donc le blanchiment différencié des deux fluorophores qui est à l'origine de cette dérive en FRET. Pour le minimiser, il nous faudrait choisir des fluorophores et des conditions d'excitation telles que le blanchiment est similaire pour les deux fluorophores.

Pour corriger cette dérive, il est indispensable d'acquérir la dynamique de blanchiment pour les deux fluorophores dans les conditions d'imagerie fixées. Ces données expérimentales nous manquent, nous avons donc choisi une approche par simulation numérique présentée par la suite.

3.2.1 Etude numérique de l'impact du photoblanchiment

Il est fort probable qu'une variation de stoechiométrie a lieu au cours du film, très probablement suite à un photo-blanchiment différencié entre le donneur et l'accepteur. Rappelons en effet que $S = \frac{n_D}{n_D + n_A}$, toute rupture de l'équilibre entre donneur et accepteur implique donc une variation de S. Retirer des accepteurs (qui ont blanchi) revient à avoir plus de donneurs libres, et donc à augmenter S et diminuer le E apparent.

Nous cherchons à déterminer numériquement l'impact d'une variation de stoechiométrie sur le FRET via l'intensité de fluorescence dans les trois canaux (I_{AA} , I_{DD} , I_{DA}). Autrement dit, lorsque les intensités dans les canaux varient, cela implique un déplacement du nuage dans l'histogramme 2D E-S. On cherche si cette liaison entre E-S est responsable de celle constatée au cours des images du film. Pour cela, on part d'une population idéale avec $S=0.5$ (chaque paire FRET possède un donneur et un accepteur fluorescents) et un E_0 donné initial. Le donneur et l'accepteur sont supposés blanchir selon une exponentielle simple de temps caractéristique τ_D et τ_A respectivement. Ainsi $n_D = e^{-t/\tau_D}$, $n_A = e^{-t/\tau_A}$ sont les probabilités qu'un fluorophore Donneur (resp. Accepteur) soit encore fluorescent. On combine ensuite les différentes possibilités :

- la probabilité de trouver une paire FRET complète : $n_D * n_A$
- la probabilité de trouver une paire FRET avec l'accepteur blanchi : $n_D * (1 - n_A)$
- la probabilité de trouver une paire FRET avec le donneur blanchi : $(1 - n_D) * n_A$
- la probabilité de trouver une paire FRET avec les deux blanchis : $(1 - n_D) * (1 - n_A)$.

Ces probabilités sont tracées en figure 3.2(a). On peut calculer la stoechiométrie et le FRET qui en découlent au cours du temps (figure 3.2(b)) et également tracer ces évolutions temporelles dans un graphe S(E) comme dans les histogrammes 2D expérimentaux. La figure

3.2(c) montre ces tracés pour différentes valeurs de E_0 . On obtient des abaques que l'on peut comparer aux courbes obtenues expérimentalement. En choisissant des paramètres adaptés, on peut superposer les graphes obtenus expérimentalement (bleu) et numériquement (vert) en figure 3.2(d). L'adéquation entre les pentes et l'évolution globale détermine les rapports entre les τ (ici $\frac{\tau_D}{\tau_A} = 2$) et la validité du modèle pour une description globale du phénomène. On notera que les rapports entre les τ sont différents de ceux des bases données, mais cela peut s'expliquer par les conditions d'excitation particulières utilisées ici. Cette piste sera étudiée sérieusement par la suite, à ce stade on peut confirmer que le photo-blanchiment différencié des fluorophores est une cause principale de la dérive dans le graphe 2D E-S.

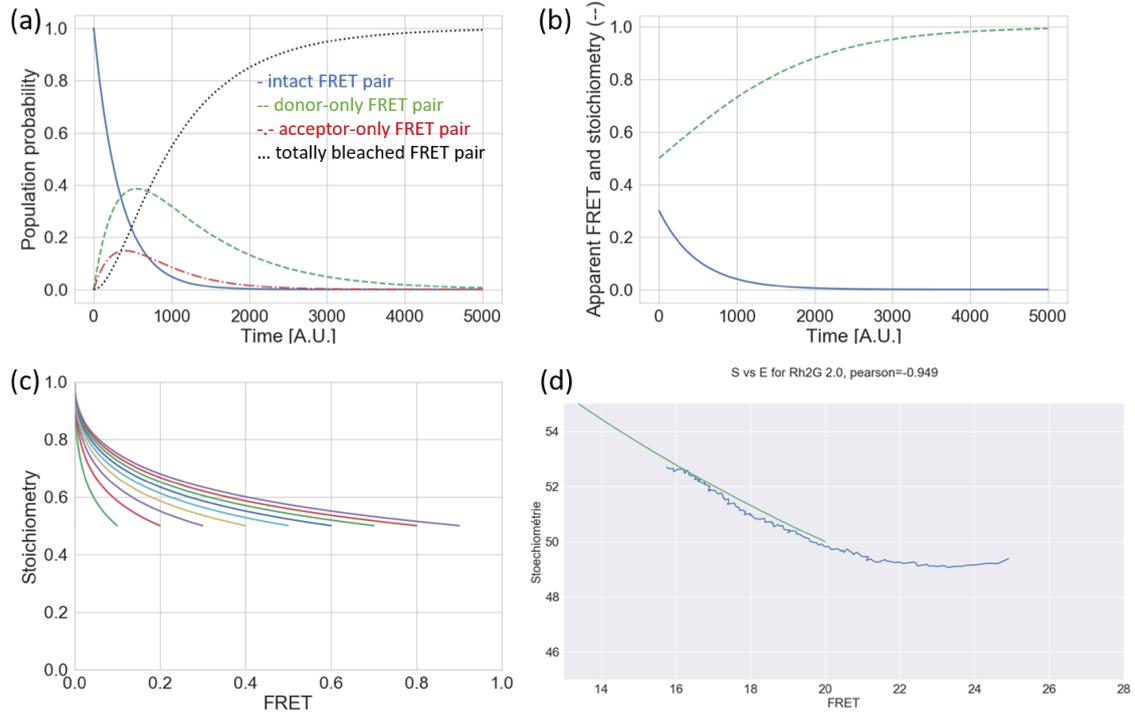


FIGURE 3.2 – Simulation numérique du blanchissement. (a) Évolution des différentes populations. (b) Évolution associée du FRET et de S (pointillés). (c) Abaque des différentes évolutions de S en faisant varier E_0 . (d) Graphe de S en fonction du FRET, en bleu pour un film de cellule, en vert le résultat d'une simulation issue de l'abaque.

3.2.2 Correction analytique de la dérive

Les équations des courbes décrites lorsque la stoechiométrie est variée par ajout de donneur ou d'accepteur libre ont été obtenues par [Coulomb et al., 2020]). Elles sont schématisées sur la figure 3.3. Lorsque l'on ajoute des accepteurs libres, qui peut s'interpréter ici comme un blanchiment du donneur, $S(t)$ diminue alors que le FRET reste constant. En revanche, lorsque l'on ajoute des donneurs libres (interprété comme un blanchiment de l'accepteur), $S(t)$ augmente alors que le FRET diminue. Plus précisément, l'équation de la courbe reliant E_{app} et S_{app} dans ce cas est donnée par :

$$S_{app} = \frac{E_0/E_{app}}{1/S_0 + E_0/E_{app} - 1} \quad (3.2.1)$$

Le calcul de la pente reliant S_{app} à E_{app} permet de décider si le léger tilt observé dans notre cas sur les histogrammes 2D E-S est expliqué par ce phénomène. Cette pente est donnée par la dérivée de S_{app} par E_{app} :

$$\frac{dS_{app}}{dE_{app}} = \frac{E_0}{E_{app}^2} \frac{1 - 1/S_0}{(1/S_0 + E_0/E_{app} - 1)^2} \quad (3.2.2)$$

En ordre de grandeur, le photoblanchiment serait donc à l'origine d'un nuage dont la pente théorique $\frac{dS_{app}}{dE_{app}}$ est de 0.27 pour $E_0 = 30$, $E_{app} = 20$ et $S_0 = 50$. Expérimentalement, au cours des 30min, le FRET varie de 10% tandis que S de 2%, soit une pente moyenne sur le film (assez constante d'une image à l'autre) de 0.2 légèrement inférieure à celle calculée théoriquement. Le calcul théorique a été fait dans le cas où seul l'accepteur blanchissait (en effet il blanchit considérablement plus vite, 3.2). Néanmoins, la pente mesurée expérimentalement est légèrement plus faible, résultat du blanchiment du donneur qui diminue S à FRET constant.

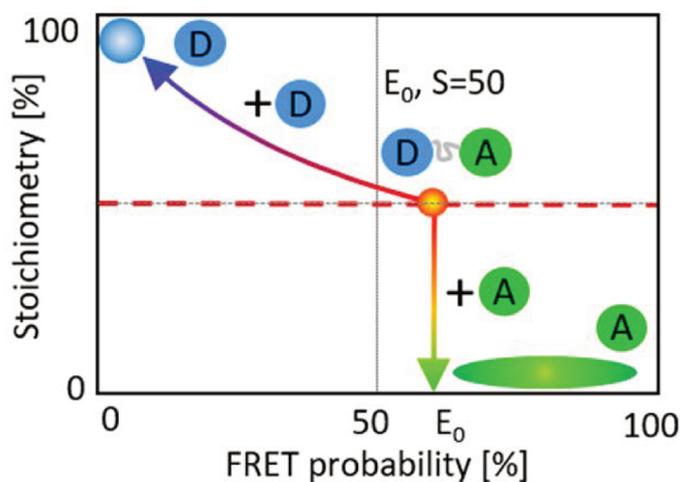


FIGURE 3.3 – Influence du blanchiment des fluorophores sur l'histogramme 2D E-S, tiré de [Coullomb et al., 2020]

Ainsi, il est normal dans une certaine mesure que S varie lors d'un film de FRET. Partant d'un couple (E_0, S_0) correspondant aux valeurs au temps initial, sans blanchiment des fluorophores ni altération des fluorophores par un autre moyen (pH), les valeurs de (E_{app}, S_{app}) s'écartent progressivement lorsque le blanchiment apparaît. Le photoblanchiment des fluorophores revient à l'ajout de l'un ou de l'autre des fluorophores libre dans la cellule, comme calculé plus haut. Il faut noter qu'à chaque instant, l'histogramme E-S reste bien horizontal dans l'histogramme 2D E-S. Il ne s'agit pas d'un problème de calibration mais bien d'une variation de la stoechiométrie due au photoblanchiment plus rapide de l'accepteur par rapport au donneur.

Correction envisagée Il est tentant d'essayer de corriger ce biais de blanchiment pour extrapoler, pixel par pixel, la valeur de E réelle dans les couples complets. Cela a été proposé d'une certaine manière par [Zal and Gascoigne, 2004] en modélisant le blanchiment par une décroissance exponentielle de la fluorescence, avec des temps de demi-vie différents entre les deux fluorophores. Cela néglige d'autres causes à l'apparition de donneurs ou

accepteurs libres (pH local par ex), et la probable non uniformité du photoblanchiment (dépendant des conditions bio-chimiques locales) qui affecte différemment chaque pixel. Dans notre cadre, cela pourrait être réalisé en mesurant les temps de demi-vie de TFP et Venus dans les conditions exactes de l’expérience d’intérêt, en imageant dans le temps les donneurs seuls puis les accepteurs seuls. Ces expériences sont réalisées pour obtenir les facteurs corrigeant les fuites spectrales. Malheureusement, dans le cadre de ma thèse, ce sont des images qui avaient été acquises et non des films. Si l’on considère que le blanchiment de l’accepteur est dominant sur celui du donneur, on peut inverser la relation 3.2.1 pour déterminer le couple (E_0, S_0) à partir de (E_{app}, S_{app}) en utilisant la valeur de S au début du film pour S_0 (avant que le blanchiment apparaisse). On obtient, pour tout pixel de l’histogramme 2D E-S :

$$E_0 = \frac{E_{app}(1 - 1/S_{app})}{1 - 1/S_0} \quad (3.2.3)$$

Conclusion En conclusion, le phénomène de photoblanchiment différencié entre le donneur et l’accepteur a causé des limites à l’analyse quantitative de l’activité dynamique d’un biosenseur. Plusieurs pistes sont à explorer à ce stade. Le couple de biosenseur peut être choisi pour avoir des propriétés de photoblanchiment proches. Cela paraît difficile mais ce qui peut être fait à *minima* est d’ajuster les excitations lasers pour avoir en pratique des temps de vie proches. La calibration de ces temps de vie devrait permettre de corriger analytiquement le FRET mesuré grâce à l’équation 3.2.3. Dans tous les cas, et cela est vrai pour toute acquisition de film de fluorescence, l’illumination doit être la plus faible possible afin de minimiser le photoblanchiment.

3.3 Filtrage par décomposition en valeurs singulières (SVD)

La méthode de décomposition en valeurs singulières (SVD) est utilisée par exemple pour le traitement d’images dans le domaine de l’acoustique et de la photo-acoustique, sur laquelle travaille l’équipe d’E. Bossy au LIPhy. Le système d’étude est un matériau qui est excité par une onde acoustique (ou optique pour la photo-acoustique), et ré-émet une onde acoustique. Un enjeu majeur est de reconstituer la topographie du matériau sondé à partir de l’onde acoustique ré-émise. La SVD permet de résoudre des flux sanguins de 0.5 mm/s *in vivo* dans des cerveaux d’animaux et des microstructures vasculaires dans de nombreuses situations (imagerie néonatale de cerveau, foie ou rein) [Demené et al., 2015]. Nous nous sommes inspirés des ces travaux pour tenter d’appliquer un filtrage de type SVD à notre sujet d’étude.

3.3.1 Théorie : séparer les variables de temps et d’espace

Le sujet d’étude est un film d’images à 2D, que l’on peut voir comme une matrice 3D où les deux premières dimensions sont d’espace et la dernière temporelle. On forme la matrice de Casorati à deux dimensions en réorganisant les pixels le long d’une seule dimension pour chaque image, schématisé en figure 3.4 [Demené et al., 2015]. La matrice Casorati est de taille $(N_x * N_y, N_t)$ avec la représentation spatiale dans la première dimension et l’évolution temporelle dans la seconde dimension.

Cette nouvelle matrice de Casorati S est alors décomposée selon la méthode de SVD :

$$S = U \Delta V^* \quad (3.3.1)$$

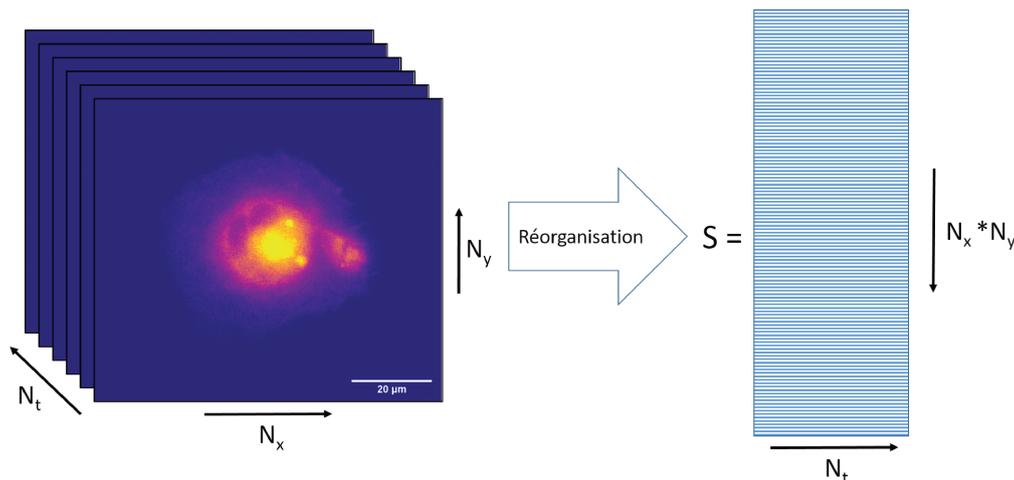


FIGURE 3.4 – Principe de la réorganisation des films spatio-temporels. S est la matrice de Casorati.

avec $*$ la transposée conjuguée. Cette décomposition permet d'obtenir trois matrices particulières. U est la matrice carrée de dimensions $(N_x * N_y, N_x * N_y)$ qui contient les "vecteurs propres" spatiaux (vecteurs singuliers), autrement dit les motifs spatiaux qui apparaissent au cours du film avec une certaine évolution temporelle. V est la matrice de dimensions (N_t, N_t) qui contient les "vecteurs propres" temporels (vecteurs singuliers), soit l'évolution temporelle de l'élément de U qui lui est associé. Δ est la matrice de dimensions $(N_x * N_y, N_t)$ qui contient les pseudo valeurs propres λ_i qui représentent les poids respectifs de chaque valeur singulière.

Cette analyse (analogue de la plus connue analyse en composantes principales, qui traite de la matrice covariance SS^*) décompose S en une somme ordonnée et pondérée de matrices séparables A_i . Chaque vecteur singulier spatial U_i a une évolution temporelle propre donnée par V_i .

$$S(x, y, t) = \sum_{m=1}^N U_m(x, y) \Delta_m V_m(t) = \sum_{m=1}^N \lambda_m A_m \quad (3.3.2)$$

On peut recalculer le film de départ à partir de S en réarrangeant à nouveau les pixels selon deux dimensions x et y .

L'indice m (ordre du vecteur singulier) classe les vecteurs propres par valeurs propres décroissantes. $m=1$ est associé à la valeur propre de plus grand poids. Autrement dit, les vecteurs propres associés à $m=1$ contribuent le plus fortement dans les motifs spatio-temporels de l'image originale. Le choix des vecteurs propres à conserver permet de filtrer le film de départ. Par exemple, pour obtenir la dérive spatiale lente, il suffit de ne conserver que le vecteur propre associé à la première pseudo-valeur propre λ_1 . On obtient $\lambda_1 U_1(x, y) V_1(t)$ pour la dérive lente temporelle. Cela caractérise souvent les dérives mécaniques de platine/objectif, ou un mouvement dirigé de la cellule.

A partir des matrices U et V , on peut isoler un vecteur singulier particulier qui présente un motif spatial caractéristique d'une activité particulière. On peut reconstituer le film avec seulement cet ordre pour visualiser son activité, et son importance avec le poids dans la décomposition. Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux motifs spatiaux qui évoluent plus vite et concernent une moins grande partie des pixels de l'image (comme

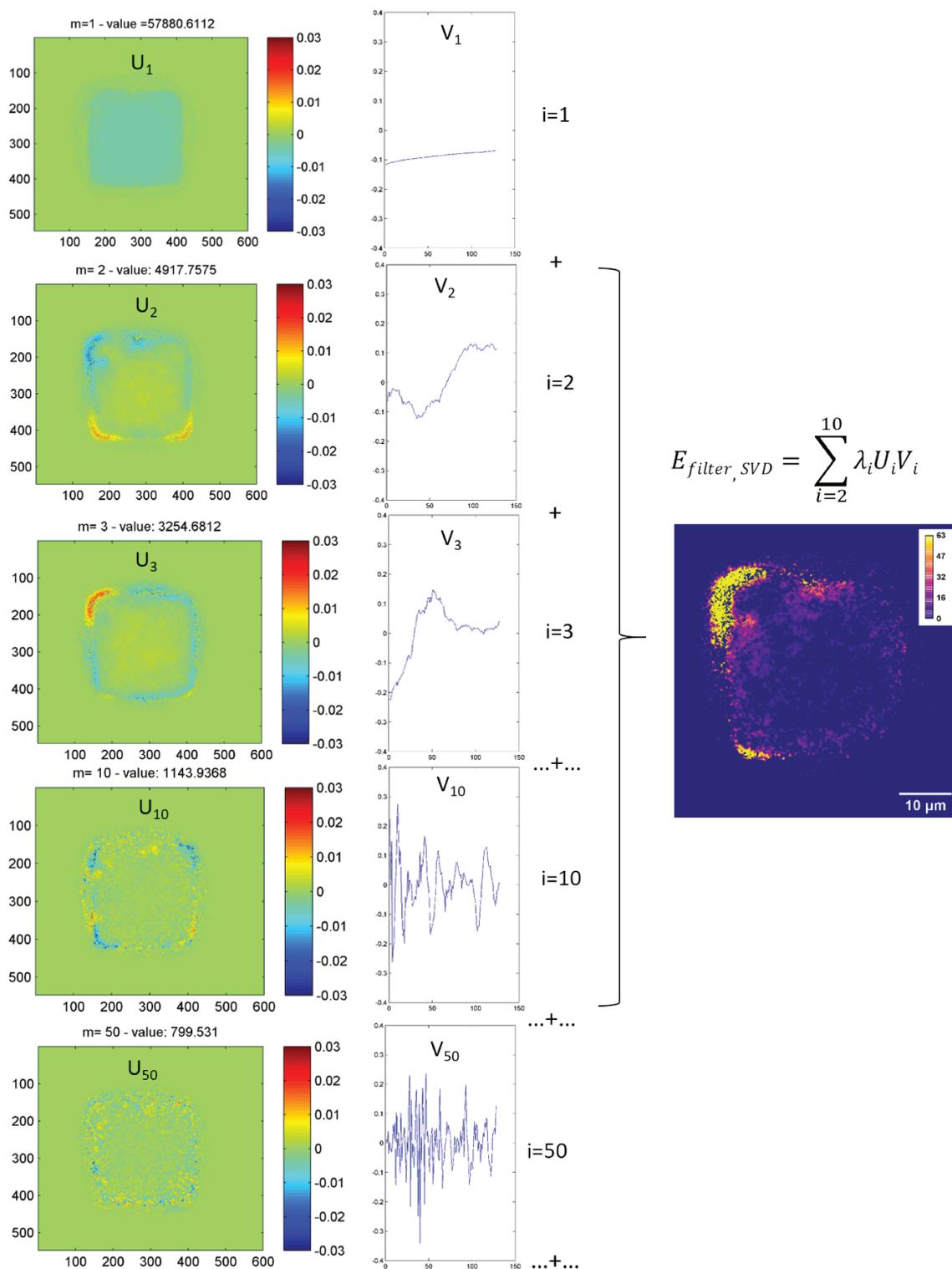


FIGURE 3.5 – Principe de la reconstitution du signal avec filtrage SVD. U_i les vecteurs propres spatiaux (unités arbitraires en code couleur), V_i les vecteurs propres temporels, unités arbitraires. On reconstruit le film de FRET avec les valeurs singulières comprises entre 2 et 10.

une transmission d'information/activité de protéine), on peut filtrer en supprimant l'ordre 1 de la décomposition, ainsi que les ordres trop élevés (au delà de 10 par exemple) qui n'apportent que du bruit (figure 3.5). On reconstitue le signal par :

$$S_{filter}(x, y, t) = \sum_{m=2}^{10} \lambda_m U_m(x, y) V_m(t) \quad (3.3.3)$$

La figure 3.5 présente clairement les étapes de la décomposition en valeurs singulières et le filtrage associé sur la cellule exemple présentée précédemment. Les images dans la colonne de gauche présentent les vecteurs propres spatiaux $U_i(x, y)$. Pour les premiers ordres (indices i), on distingue des motifs dans les coins associés à des évolutions temporelles lentes. L'ordre 50 en revanche fait apparaître des signaux plus bruités, associés à des fréquences élevées. La colonne de droite présente les vecteurs propres temporels associés à ces valeurs singulières. On constate que l'on passe de variations lentes pour les premières valeurs singulières à des variations rapides. La reconstitution après filtrage met en évidence des variations du FRET, qui sont exclusivement situées sur le pourtour de la cellule et notamment dans les coins.

La force de cette méthode réside dans l'analyse croisée en direct des composantes spatiales et temporelles des films de FRET. Comme l'activité des GTPases a une action simultanée en espace et en temps, il est important d'étudier ces deux composantes en simultanément. C'est une méthode alternative et complémentaire très prometteuse à la démarche de P. Wiseman qui utilise des corrélations croisées entre les composantes spatio-temporelles (spectroscopie de corrélation d'images, ICS) [Kolin and Wiseman, 2007].

3.3.2 Application au film FRET du biosenseur de RhoA

Le film de la cellule exemple présentée au début de ce chapitre a été analysé avec la décomposition en valeurs singulières. Nous montrons figure 3.5 quelques vecteurs propres particuliers. On reconnaît que la première valeur propre $\lambda = 1$ est associée à une lente dérive temporelle (voir le vecteur propre temporel) et affecte la totalité de la cellule de manière uniforme (voir le vecteur propre spatial). Cette première valeur propre peut être interprétée comme la dérive causée par le photoblanchiment.

En figure 3.5, la valeur singulière spatiale d'ordre 2 (U_2) montre clairement une activité à long terme significative sur le coin haut gauche du carré. Celle-ci est associée à une "protrusion de FRET" très forte qui apparaît au même coin. On réalise un filtrage pour reconstituer les films de FRET sans l'ordre 1 (suppression de la dérive lente associée au blanchiment) ni les ordres élevés à partir desquels apparaît du bruit. Sur le film de FRET filtré par la méthode SVD, en ne gardant que les ordres 2 à 10 (figure 3.6), cette protrusion apparaît à l'image 27 environ (flèche rouge). Elle n'apparaît que vers l'image 31 en intensité de fluorescence (flèche noire), soit un décalage de 4 images, soit 40s en temporel. Il semble donc que l'activité de RhoA ait précédé l'apparition de la protrusion. Il faudrait plus de poids statistique, mais cela pourrait mettre sur la voie d'une relation de corrélation temporelle entre RhoA et l'activité membranaire. Ce résultat serait en accord avec [Machacek et al., 2009] et [Fritz and Pertz, 2016] qui trouvent une activation de RhoA antérieure à l'activité de la membrane, de l'ordre de 10s.

Notons que des vagues de membrane (ruffles) apparaissent aussi sur le film de fluorescence, entre les images 17 et 28. Il serait intéressant d'étudier plus avant une éventuelle relation entre les "ruffles" et l'activité de RhoA.

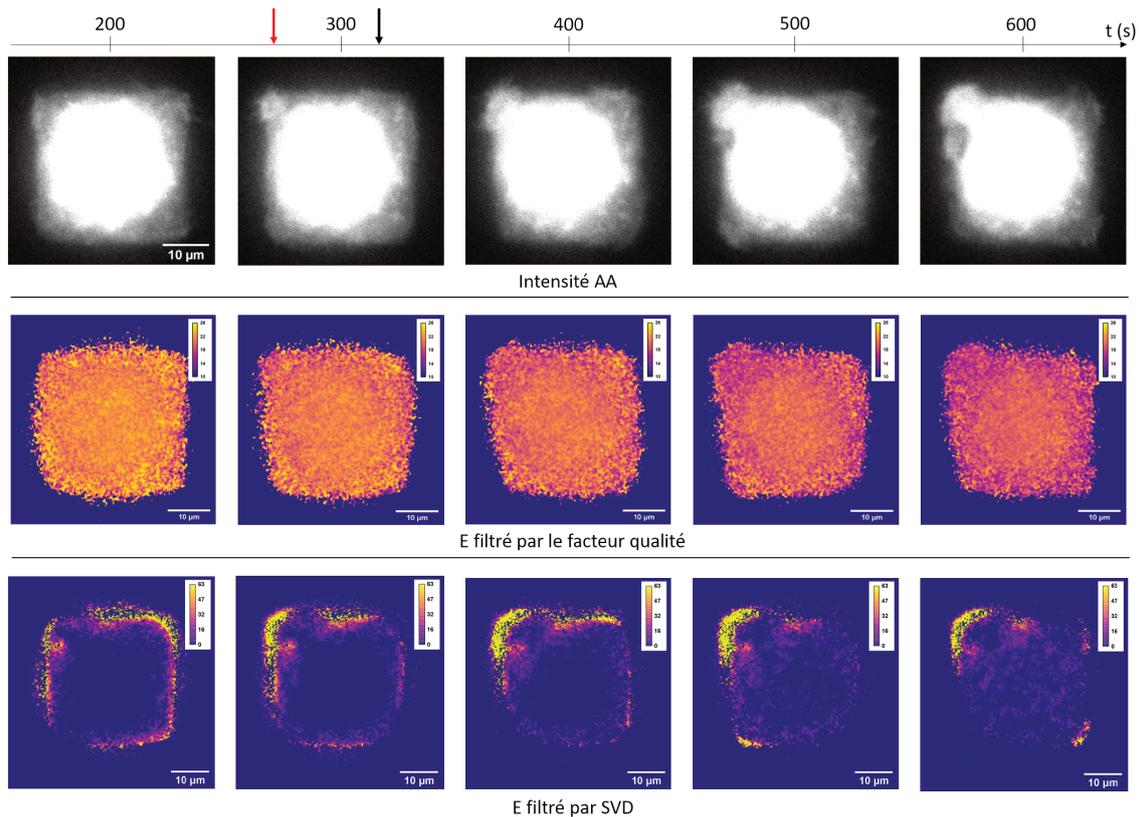


FIGURE 3.6 – Séquence de protrusion sur la cellule sur motif carré. **Haut.** En intensité de fluorescence (u.a.). **Milieu.** En FRET filtré par le filtre qualité (pourcentage). **Bas.** En FRET filtré par SVD (u.a.) en ne gardant que les ordres 2 à 10.

En figure 3.6, il est intéressant de noter que le profil spatial radial du FRET non filtré par la SVD décroît du centre de la cellule vers la périphérie. Cela pourrait suggérer une activité plus faible de RhoA en périphérie, en désaccord avec les études précédentes. RhoA est impliquée dans les établissements et renforcements des FAs périphériques et devrait y être plus active car elle s’y lie avec ses effecteurs pour induire la réponse biologique. La suppression de la dérive par la SVD fait apparaître un signal plus élevé en périphérie de la cellule, ce qui est attendu. Une fois encore, l’information sur l’activité de RhoA se cache dans les fluctuations de FRET et non dans ses variations lentes (d’ailleurs très fortement impactées par le blanchiment des fluorophores).

Il n’est pas possible d’insérer dans le manuscrit le film filtré sans l’ordre 1, la donnée la plus parlante en la matière. Néanmoins une séquence d’images est montrée figure 3.6. Les quatre coins du carré sont le lieu d’une activité intense. Des variations rapides à petite échelle (des petits fronts d’ondes localisés) mais aussi des grands motifs à l’échelle du coin sont très visibles. Ils apparaissent et disparaissent de manière nette, le plus souvent en alternant (lorsqu’un coin est le siège d’une activité, les autres sont "éteints"). Cet allumage et extinction des quatre coins, qui semble orchestré et (anti)coordonné, est très parlant et frappant. La répétition de cette analyse sur plusieurs films de cellules sur motifs carrés pourrait permettre de déterminer s’il existe des motifs spatio-temporels reproductibles. Lorsque l’on considère le film filtré par SVD (en enlevant les ordres 1 et supérieurs à 10, figure 3.6), le déplacement de la zone d’activité principale de RhoA de la périphérie vers

le centre est forte. On peut avancer que RhoA délaisse petit à petit la périphérie pour se recentrer et renforcer les AFs centrales puisque la cellule se porte mal et qu'elle se rétracte en se détachant petit à petit. Cette information importante n'est pas visible dans la carte de FRET elle-même, trop noyée par la dérive globale du FRET et le bruit. Il faut révéler la carte filtrée pour qu'un tel détail soit visible.

L'ordre de grandeur de la taille caractéristique spatiale d'action de RhoA ("épaisseur" de la banane jaune en figure 3.6 bas) est de l'ordre de quelques μm . Cette zone pourrait correspondre à la taille caractéristique du gradient d'activité de RhoA observée par [Machacek et al., 2009]. RhoA formerait un gradient d'activité plus étendu que Rac1 ou Cdc42 qui sont actifs dans une zone très restreinte du pourtour de la cellule [Fritz and Pertz, 2016].

Ce filtrage semble filtrer de manière rigoureuse les dérives de FRET non liées à une activité du biosenseur. En particulier, dans notre cas, on met en évidence la présence forte du blanchiment dans la valeur singulière d'ordre 1. Lorsqu'on filtre le film de FRET de cet ordre 1, on supprime la prépondérance du signal central associé au blanchissement, et on met en évidence l'information dans les fluctuations spatio-temporelles du signal, dans le pourtour de la cellule.

Conclusions

Le filtrage SVD présenté ici est une méthode puissante de filtrage des films d'activité de protéines. Elle permet notamment de filtrer la composante d'ordre 1 dans sa décomposition et de mettre en valeur les variations spatio-temporelles d'intensités faibles d'activité du biosenseur étudié, en accord avec l'hypothèse initiale que l'information réside dans les fluctuations du signal. Dans notre cas particulier, l'ordre 1 est majoritairement associé à la dérive lente par photoblanchiment, effet que nous cherchons à supprimer lors de l'analyse. Il faut prendre garde à une interprétation abusive des vecteurs singuliers eux-mêmes qui peuvent être sensibles à des artefacts. Il vaut mieux étudier les films filtrés de certains ordres. De même, il est préférable de conserver un assez grand nombre d'ordres pour ne pas introduire de biais, et donc d'avoir une acquisition avec de nombreuses images (qui augmente le rang de la matrice de Casorati qui détermine le nombre de valeurs singulières). L'étude des premières valeurs singulières met en évidence des motifs de comportements locaux (spatialement et temporellement) du biosenseur. Le centre de la cellule présente peu de variations temporelles d'activité de RhoA, qui est très fortement localisée sur le pourtour de la cellule. Les décalages temporels entre le FRET et l'activité de fluorescence permettent d'estimer le décalage temporel entre l'activité de RhoA et ses effets sur le mouvement de la membrane. On retrouve ainsi en ordre de grandeur des temps caractéristiques (dizaines de secondes d'avance sur la membrane) et un ordre de grandeur de la distance caractéristique d'action (quelques μm , gradient large) en accord avec [Machacek et al., 2009].

Une fois filtré en SVD, le film ne présente plus des valeurs de FRET quantitatif car la reconstitution est incomplète. Il n'est donc plus possible d'étudier des valeurs de FRET et de les comparer avec d'autres films de FRET. Une fois certains comportements spatio-temporels isolés avec l'analyse en SVD, ils faut les étudier plus en avant en revenant au film initial de FRET quantitatif, notamment avec des études en corrélation se concentrant sur la zone spatio-temporelle ainsi déterminée. Il reste également un important travail théorique pour calculer des valeurs de FRET pertinentes après le filtrage par SVD pour pouvoir travailler directement sur ces films.

Dans le cas des lignées stables REF52 exprimant le biosenseur RhoA-2G, les biais induits

par le blanchiment des fluorophores sur la corrélation entre E et S semblent trop forts pour en déduire des conclusions biologiques fortes. Néanmoins, la rétraction de la cellule a pu être associée à un recentrage au cours du temps de l'activité de RhoA vers le centre de la cellule. En revanche, cette étude met en avant, conceptuellement, la force de ces moyens. Le filtrage de l'ordre 1 semble très efficacement supprimer la dérive en FRET conséquence du photo-blanchiment. Mais il manque une étude approfondie pour déterminer son rôle exact sur le film de FRET et la reconstitution d'un FRET quantitatif après filtrage.

3.4 Microscopie en réflexion totale

L'illumination en champ large utilisée sur notre microscope est limitée : elle excite la cellule dans tout son volume, et la collection de lumière est également perturbée par ce signal (fluorescence et diffusion) hors mise au point. Le rapport signal à bruit (SNR) n'est pas optimal. La microscopie de fluorescence en réflexion totale interne (TIRF) permet de dépasser cette limitation. Par ailleurs, l'illumination limitée à une faible fraction de la cellule et l'usage de lasers moins intenses pourrait diminuer le photo-blanchiment des fluorophores portés par le biosenseur.

J'ai donc modifié le montage optique du dispositif expérimental pour permettre de choisir entre une configuration TIRF ou épifluorescence. Malheureusement, je n'ai pas eu le temps de réaliser des expériences avec biosenseurs en configuration TIRF, je présente donc les principes et la mise en oeuvre de cette méthode.

Apport du TIRF pour la microscopie de fluorescence et FRET La microscopie de fluorescence en réflexion totale interne est un outil puissant pour améliorer le SNR et diminuer le photo-blanchiment car l'excitation est confinée à 200nm de la surface. Cette méthode est de plus en plus utilisée pour des expériences de FRET ratiométrique [Martin et al., 2016], [Fritz et al., 2015], [Martin et al., 2014].

En effet, l'activité des protéines de signalisation, dont ces biosenseurs rapportent l'activité, se manifeste principalement à proximité de la membrane cellulaire. A cet endroit, la quantité de biosenseurs, donc l'intensité collectée par pixels, est plus faible. De plus, les protéines de régulation du cytosquelette qui nous intéressent sont souvent impliquées dans la régulation des excroissances de membranes. Ces régions sont d'épaisseur fine, adaptée à l'usage du TIRF qui ne collecte la fluorescence que d'une zone de quelques centaines de nm d'épaisseur. Enfin, si l'on veut collecter le signal de biosenseurs associés à la membrane mais à l'aplomb du cytoplasme, leur signal est pollué par la fluorescence des biosenseurs situés dans le cytoplasme.

Enfin, étant donné la forte limitation apportée à l'analyse du FRET par le photo-blanchiment des fluorophores, le TIRF est une façon idéale de limiter l'excitation laser (en volume et en intensité) des fluorophores.

Principe Le principe du TIRF est de dépasser la relation de Descartes qui régit la transmission et la réflexion d'une onde Électro-Magnétique à un dioptré entre deux milieux diélectriques. Ceci est habituellement réalisé en focalisant le faisceau laser d'excitation dans le plan focal arrière de l'objectif hors de l'axe optique. Ainsi, en sortie d'objectif le faisceau d'excitation est collimaté, comme pour l'imagerie d'épifluorescence classique, mais il arrive sur la lamelle de verre avec un angle. Si cet angle est suffisant, alors il y a réflexion totale

d'après la relation de Descartes. Mais un champ évanescent existe et illumine la zone près de la surface de verre dans l'échantillon sur une profondeur d'environ 200nm.

Comme on a souhaité mettre le TIRF sur le même chemin que le champ large, toute la difficulté pratique réside dans le fait de parvenir, lorsque l'on change l'inclinaison du faisceau en entrée de l'objectif du microscope pour passer d'une configuration TIRF à normale, à intercepter toujours la même zone spatiale sur l'échantillon de la platine du microscope. Cela revient à ce que le rayon émergent de l'objectif soit toujours centré sur l'axe optique. Pour cela, il faut que le faisceau convergent dans le plan focal arrière (BFP) de l'objectif soit toujours parallèle à l'axe optique. Cela revient par construction optique à ce que la section de tous les rayons avec π^* , quel que soit leur angle, soit constante (π^* étant le plan conjugué du plan de l'échantillon π_S par (lentille de tube+objectif)) [Axelrod, 2001].

Mise en oeuvre expérimentale Pour instaurer le TIRF, il fallait reprendre les dispositions du montage précédent. En sortie de la fibre mélangeuse de modes, nous disposions d'un faisceau de 4mm de diamètre, qu'il fallait transformer en 24mm de diamètre en entrée du statif du microscope.

La figure 3.7 présente le schéma optique utilisé. Notons que l'alignement a été réalisé avec un objectif à air car plus simple à manipuler. La photo du montage est en annexes figure 5.6.

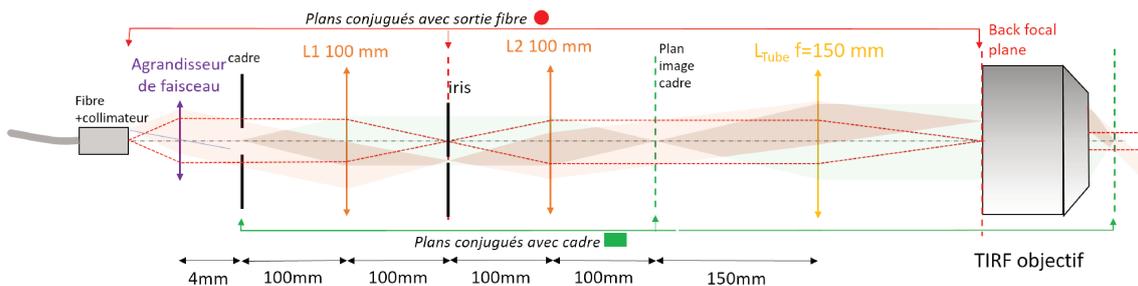


FIGURE 3.7 – Schéma optique du montage en TIRF

Le diaphragme d'entrée (cadre) doit être conjugué avec l'agrandisseur de faisceau de la fibre, ainsi tous les faisceaux issus de la fibre sont centrés sur l'axe optique, quel que soit leur angle. Cette contrainte induit une condensation du montage car la focale de l'agrandisseur de faisceau est petite (4cm). Deux miroirs (non visibles sur le schéma) permettent d'ajuster l'angle et la position du faisceau dans le plan de l'échantillon. La compacité du montage crée un fort couplage entre ces deux paramètres, rendant l'alignement plus délicat.

Perspectives Ce montage étant délicat, et les essais de preuve de principe peu concluants, j'ai continué mes mesures sans cette possibilité TIRF, tout en laissant le montage compatible TIRF/champ large. Néanmoins, le TIRF est une piste très prometteuse par la suite pour améliorer le contraste près de la membrane et diminuer le photoblanchiment des fluorophores.

3.5 Essais avec un biosenseur de Rac1

Le biosenseur FRET de Rac1, DORA, a été la première tentative pour imager l'activité d'une Rho GTPase en cellule. Rac1 est très impliqué dans les phénomènes de migration cellulaire, et présente une signature spatio-temporelle forte durant le phénomène de migration. Le plasmide du biosenseur de Rac1 DORA a été exprimé transitoirement dans des fibroblastes MEF NIH-3T3. Ces cellules ont été libres de migrer sur des surfaces de verre. La migration a été imagée en ALEX-FRET. N'ayant pas pu réaliser la calibration pour le QuantTI-FRET à ce moment car manquant des étalons FRET, les images FRET ne donnent pas accès à des efficacités de FRET absolues, mais relatives. Elles peuvent être comparées entre elles seulement lorsque les paramètres d'acquisition sont identiques, lors de mêmes expériences.

J'aurais aimé pousser plus loin l'analyse des films de migration sur verre du biosenseur de Rac1, néanmoins je présente ici quelques images issues de leur analyse ainsi que les soucis apparus.

A l'époque, le FRET était apparu trop plat à l'exception des bords. Malgré une belle activité mécanique de la cellule, nous avons cru à une sensibilité trop faible du biosenseur. Toujours est il que lorsqu'une collaboration s'est créée avec l'équipe d'O. Pertz, nous avons préféré poursuivre la voie du biosenseur de RhoA fourni par O. Pertz à cause de ces résultats préliminaires peu concluants. Il serait important de revenir sur ces données et ce biosenseur maintenant que la méthode QuantTI-FRET est opérationnelle. Les cellules MEF 3T3 notamment possédaient une activité biologique plus intense que les REF52 utilisées par la suite avec le biosenseur FRET de RhoA.

Chapitre 4

Conclusions

4.1 Récapitulatif

Cette thèse s'inscrit dans une réflexion plus large sur la biologie en tant qu'objet d'étude pour physiciens, avec des outils de physiciens. De là est venue l'idée de développer des outils pour caractériser les signaux cellulaires qui composent la mécanotransduction. Ce phénomène est gouverné par des signaux, et une démarche du type traitement du signal est appliquée, en quête d'un analogue de la fonction de transfert.

La mesure quantitative de l'activité des GTPases au sein de cellules vivantes, en temps réel et dans l'espace, constitue le premier outil. Elle utilise l'expression de biosenseurs FRET codant pour l'activité de deux GTPases données, RhoA et Rac1 ici. Les images de fluorescence obtenues sont analysées selon la méthode QuantI-FRET développée par l'équipe. Cette méthode repose sur une calibration rigoureuse du dispositif expérimental, réalisée en deux temps. Dans un premier temps, l'imagerie des fluorophores seuls permet de déterminer les fuites spectrales. Dans un second temps, des étalons de FRET sont utilisés pour déterminer les facteurs de calibration d'excitation et d'émission. Le FRET mesuré par la suite sera quantitatif et les valeurs directement comparables d'un laboratoire à un autre.

QuantI-FRET 2.0 Lors de ma thèse, nous avons rencontré de grandes difficultés à obtenir les étalons de FRET avec les fluorophores correspondant aux biosenseurs que nous souhaitions imager. Nous avons donc développé une variante de la méthode QuantI-FRET qui se passe d'étalons de FRET. Cette autocalibration s'effectue directement sur les biosenseurs FRET en cellules. L'autocalibration recourt à l'hypothèse forte que la stoechiométrie entre fluorophore donneur et accepteur est connue. La stoechiométrie ne peut donc plus être une mesure, ceci n'est pas une limitation importante dans le cas de biosenseurs de FRET intra-moléculaire où la stoechiométrie est théoriquement connue. L'autocalibration permet de faciliter grandement l'accès au FRET quantitatif pour des équipes qui ne disposeraient pas de moyens en ingénierie biologique importants. Nous proposons également des méthodes visuelles précises et un critère quantitatif pour s'assurer de la précision de l'autocalibration.

Il est ensuite possible de calculer à chaque instant l'image 2D du FRET quantitatif qui code pour l'activité de la GTPase. Cette image est corrigée par la déviation à la stoechiométrie théorique entre donneur et accepteur pour former l'image de FRET filtré par le facteur qualité. Nous disposons alors d'un film d'images de FRET quantitatif d'où sont exclus les

pixels aberrants ou douteux.

Notre méthode QuanTI-FRET 2.0 permet de déterminer un FRET quantitatif, indépendant du dispositif expérimental et de certains biais biologiques en cellules, grâce à une étude pixels par pixels. Malgré la perte d'information en stoechiométrie, on évite toujours les biais usuels dus à une corrélation du FRET avec l'intensité de fluorescence. Nous montrons de plus que la valeur absolue de la probabilité de FRET ne dépend pas d'une erreur sur la valeur théorique de la stoechiométrie.

Premières analyses spatio-temporelles des données. Des travaux préliminaires ont été menés pour déceler dans les films de FRET quantitatif des motifs spatio-temporels reliant les caractéristiques morphologiques (activité membranaire) à l'activité de la protéine codée par le FRET du biosenseur. Cette démarche vise à construire un analogue de fonction de transfert, dans notre approche traitement du signal de la mécanotransduction. Pour développer les outils d'analyse spatio-temporelle, nous nous appuyons sur le film d'une cellule exemple qui adhère sur un motif carré. Le motif adhésif permet de déterminer la forme et la dynamique du cytosquelette et de prédire qualitativement l'activité associée des Rho GTPases.

La première analyse simple des films de FRET et de fluorescence ont mis en évidence une dérive du FRET causée par le photoblanchiment différencié de la paire de fluorophores. Dans notre cas, l'accepteur blanchit bien plus vite que le donneur. Ce biais photophysique empêche d'étudier facilement le FRET, mais l'analyse analytique du photoblanchiment permettrait de corriger analytiquement cette dérive.

Le film de FRET est analysé selon la méthode de décomposition en valeurs singulières. Cela permet de filtrer certaines composantes : la dérive lente due au photoblanchissement des fluorophores (première valeur singulière) et les ordres élevés qui ne présentent que du bruit. Le film filtré dévoile des phénomènes contrastés qui étaient cachés par le photoblanchiment en particulier. Nous observons notamment une activité forte et dynamique en périphérie de la cellule en contraste de son centre, pour la cellule exemple en carré. On peut également établir un parallèle entre le mauvais état physiologique de la cellule et la lente concentration de l'activité de RhoA au centre de la cellule, délaissant les bords qui lentement se détachent. On retrouve également des longueurs spatiales (quelques μm) et temporelles (quelques dizaine de secondes en avance sur la membrane) caractéristiques de l'action de RhoA, en accord qualitatif avec [Machacek et al., 2009].

4.2 Perspectives

L'objectif premier de ce travail était de réaliser simultanément la mesure de l'activité des Rho GTPases et l'excitation mécanique des cellules. Le second point n'a pas été développé dans ce manuscrit. Des expériences préliminaires ont été menées avec les substrats magnéto-actifs développés par l'équipe [Bidan et al., 2018]. Ils permettent de stimuler localement, de manière continue via le substrat, en contrôlant la fréquence et l'amplitude des stimulations mécaniques, les cellules déposées sur ces substrats. Les premiers essais ont montré que les mouvements du substrat et la présence de billes fluorescentes utilisées pour mesurer les forces de traction exercées sur le substrat limitent fortement l'analyse en FRET et en SVD. Il reste donc des ajustements à réaliser pour combiner les deux méthodes, mais la combinaison est réalisable et très prometteuse.

Il est certain que notre dispositif expérimental souffre de limitations. La première est

l'absence d'un dispositif d'imagerie en TIRF que j'ai mis en place mais qui n'a pas donné d'images. Par conséquent, le rapport signal sur bruit obtenu dans les protrusions est trop faible et limite les analyses. La résolution et l'étendue spatiale pourraient être doublées en utilisant deux caméras au lieu d'une pour le séparateur chromatique. Le microscope n'est actuellement contrôlé que pour sa température, mais il est certain qu'un contrôle du taux en CO_2 serait un pas important pour réaliser des expériences de longue durée. Enfin, l'utilisation du système de mise au point automatique (déjà inséré) est indispensable pour éviter les halos issus d'une mauvaise mise au point et les raccords de parties de film lors de la stimulation par les substrats actifs.

Le biosenseur de RhoA exprimé dans les cellules REF52 nous a semblé trop difficile à imager : les protrusions des REF52 sont très fines, et l'expression du biosenseur dans la membrane pour cette lignée stable est faible. Cela nous a fait pousser les lasers à forte puissance. Le photo-blanchiment différencié des fluorophores qui en résulte empêche actuellement les interprétations biologiques certaines. L'utilisation d'une autre combinaison cellules-biosenseur est à l'étude pour un biosenseur de FAK. La possibilité d'une correction a posteriori du phénomène de blanchiment pourrait être très importante s'il persiste quel que soit le biosenseur.

Concernant la méthode QuanTI-FRET, une analyse théorique de l'impact d'une mauvaise mise au point sur le FRET est indispensable. De même, la prise en compte du caractère 3D de la cellule et d'intensité de fluorescence hors champ est importante tant que l'option TIRF ne sera pas utilisée.

Blanchiment Il est nécessaire d'être conscient de la limitation importante due au photo-blanchiment. Celle-ci doit être surveillée grâce à l'histogramme E-S et les courbes d'évolutions temporelles des intensités de fluorescence, du FRET et de la stoechiométrie. Pour une imagerie aux temps longs (plusieurs minutes), la perte d'intensité de fluorescence des fluorophores a une influence non négligeable sur le FRET et la Stoechiométrie. Ceci peut être probablement corrigé par l'usage de lasers moins intenses, associés à des lignées exprimant plus fortement le biosenseur et à un dispositif expérimental plus sensible nécessitant des lasers moins intenses (ou des temps d'exposition plus courts). Le choix de la paire de fluorophores pour le biosenseur apparaît encore plus critique pour faire des films longs (30min ou plus), de manière à ce que accepteur et donneur soient aussi sensibles au blanchiment dans les conditions expérimentales.

SVD Il manque une analyse poussée de l'effet du filtrage SVD sur le FRET, à savoir s'il ne fait que retirer la dérive créée par le blanchiment ou s'il altère également les valeurs de FRET. Ceci peut être fait à l'aide d'une simulation numérique et un travail théorique serait nécessaire pour pouvoir reconstituer les valeurs de FRET après le filtrage réalisé sur les films par la SVD. A part cette restriction, l'application des corrélations sur le film de FRET filtré SVD est très prometteur. Il confirme l'importance de considérer les fluctuations lorsqu'il s'agit de réaliser des corrélations.

Analogie de la fonction de transfert La méthode complexe d'analogie de la fonction de réponse spatio-temporelle présentée dans [Yamao et al., 2015] me semble être une excellente première approche, combinée avec la méthode de suivi simultané de la membrane et de l'activité de la GTPase [Tsukada et al., 2008]. Elle n'a pas été mise au point par manque de temps et de données, mais est prometteuse pour l'étude conjointe des substrats actifs et d'un biosenseur. La conception des substrats magnéto-actifs et leur utilisation conjointe

aux biosenseurs reste à affiner pour obtenir des films de FRET robustes. La combinaison des substrats magnéto-actifs, des biosenseurs et des méthodes d'analyses en corrélation représente un formidable potentiel pour construire un analogue biologique de la fonction de transfert spatio-temporelle de la mécanotransduction dans les fibroblastes.

Il manque encore des outils et des grandeurs quantitatives pour déterminer objectivement ce qui a lieu dans les films de FRET. Il manque bien sûr plus de données expérimentales pour étayer statistiquement les courtes analyses comparées entre morphologie et Rho GT-Pases, ainsi que l'étude approfondie des films concernant les autres motifs d'adhérence (arbalètes, rectangles).

Quoi qu'il en soit, la combinaison de toutes ces méthodes est très prometteuse pour dessiner l'analogie de la fonction de transfert pour le processus de mécanotransduction. Elles renforcent certains principes, dont celui de l'importance cruciale de conserver la précision spatiale et temporelle dans l'analyse de ces processus.

Enfin, et notre laser blanc super-continuum le permet, la combinaison entre optogénétique, motifs d'adhérence et les biosenseurs de FRET est extrêmement prometteuse pour réaliser la réponse impulsionnelle au sein même de la voie de signalisation bio-chimique

Chapitre 5

Matériel et méthodes - Annexes

5.1 Biosenseurs d'activité

Cette annexe détaille les subtilités propres aux biosenseurs, leurs constructions et leurs choix.

Maintenant que nous sommes en possession d'une méthode pour calculer le FRET quantitatif entre un donneur et un accepteur, il nous faut un biosenseur dont le FRET est directement relié à l'activité d'une GTPase impliquée dans les processus de migration et de protrusions [Vilela et al., 2013]. En pratique, il y a N biosenseurs dans un seul pixel de notre caméra, on ne mesurera donc que la moyenne des protéines actives et inactives.

5.1.1 Choix du biosenseur et de la Rho GTPase

Comment choisir concrètement le bon couple fluorophores-Rho GTPase ?

Il faut tout d'abord considérer les Rho GTPases en elles-mêmes et décider celles qui seront le plus adaptées pour notre question, notamment celles qui présenteront la plus forte réponse, lors de la migration ou sur des motifs adhérents.

Nous recherchons donc une Rho GTPase susceptible de donner la plus forte réaction lors des protrusions de fibroblastes (NiH3T3) en pseudo-migration (ces cellules n'ont pas de polarité avant-arrière). Enfin, nos travaux sont *in-vitro* sur des substrats 2D, ce qui est important car les biosenseurs FRET ont montré une forte dépendance à ces conditions.

L'étude en introduction (voir le paragraphe 1.1.2) présente Rac1 et RhoA comme de bons candidats pour étudier les protrusions de membrane. Ils présentent des réponses fortes dans les processus de migration et de polarisation, on peut attendre de fortes réponses spatio-temporelles de ces GTPases dans notre cas [Yamao et al., 2015], [Machacek et al., 2009].

Biosenseur de Rac1

Nous avons dans un premier temps étudié et utilisé le biosenseur DORA rapporteur de l'activité de Rac1 développé par Wu [Timmerman et al., 2015], [Kroon et al., 2017]. Des résultats prometteurs avaient été obtenus principalement sur des cellules épithéliales, mais aussi sur des cellules en migration, et étaient prometteurs pour notre sujet d'étude.

La construction du biosenseur de Rac1 et son fonctionnement FRET sont présentés en figure 5.1. Le fluorophore donneur Cerulean3 dimérique est couplé à l'effecteur de Rac1 p21-activated protéine kinase 1 (PAK1) (on remarquera la présence de p21, gène très largement impliqué dans les réseaux de mécanotransduction, et dans de nombreux cancers).

Cet ensemble est relié par un lien ribosomal (L9H) à l'accepteur Venus couplé à Rac1 [Kroon et al., 2017]. La modification d'un résidu dans la séquence du domaine PAK de Rac1 donnent lieu à un biosenseur contrôle positif (Rac1 constitutivement actif) et contrôle négatif (Rac1 constitutivement inactif).

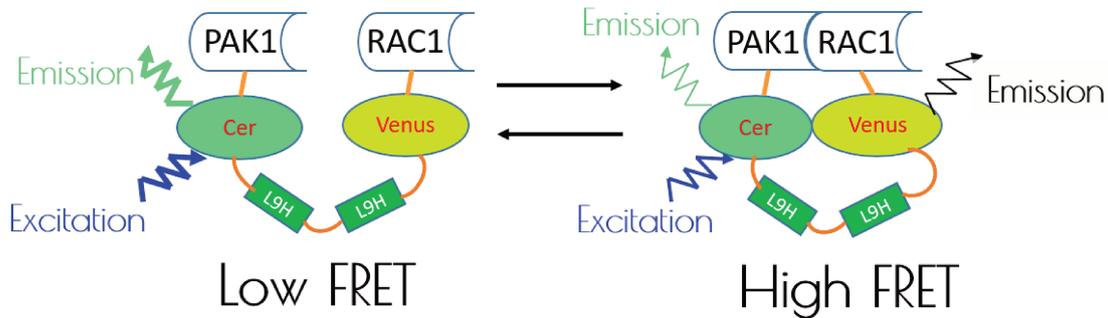


FIGURE 5.1 – Construction du biosenseur de Rac1 DORA.

Peut être en partie à cause d'une méthode de FRET imparfaite et d'imagerie pas assez stable, les premières cartes de FRET obtenues avec ce biosenseur DORA de Rac1 nous ont semblé contenir trop d'artefacts. Nous avons donc utilisé un autre biosenseur.

RhoA-2G

L'équipe d'O. Pertz étudie depuis longtemps les GTPases et a développé pour cela plusieurs biosenseurs [Fritz et al., 2013]. Nous avons utilisé le dernier en date qui nous a été fourni. C'est un biosenseur rapporteur de l'activité de RhoA de seconde génération appelé "RhoA-2G". Il nous a été envoyé exprimé de façon stable dans une lignée de REF52 (fibroblastes embryonnaires de rats), connus pour s'étaler fortement sur les substrats, créer des lamellipodes importants et très fins, et avoir une bonne activité protrusive, mais peu de mouvement dirigé en migration.

[Fritz et al., 2013] réalise un grand nombre de combinaisons de permutations pour établir les bons candidats couple fluorophores-biosenseurs et présente les caractéristiques du biosenseur retenu. Quelques propriétés principales sont ici rapportées.

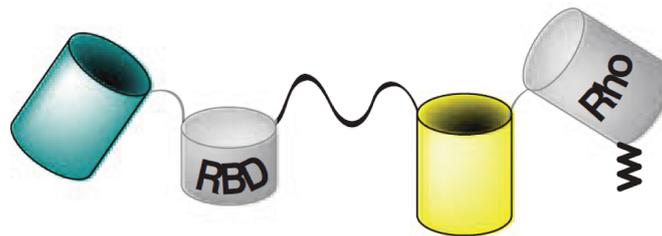


FIGURE 5.2 – Construction de "RhoA-2G" seconde génération [Fritz et al., 2013]

La figure 5.2 présente la construction schématisée du biosenseur. Le donneur mTFP1 (bleu) est lié au domaine de liaison à RhoA (RBD) de son effecteur rhotekin. Puis un lien de 60 acides aminés relie à l'accepteur Venus, lui même relié à RhoA (construction 3 de [Fritz et al., 2013]). La présence d'un long lien entre les fluorophores crée un FRET bas

dans l'état inactif du biosenseur. Ainsi le changement en ratio d'émission atteint 147%, le meilleur changement obtenu parmi leurs différentes constructions.

La figure 5.3 présente les quelques caractérisations et tests réalisés par [Fritz et al., 2013] sur le biosenseur RhoA-2G.

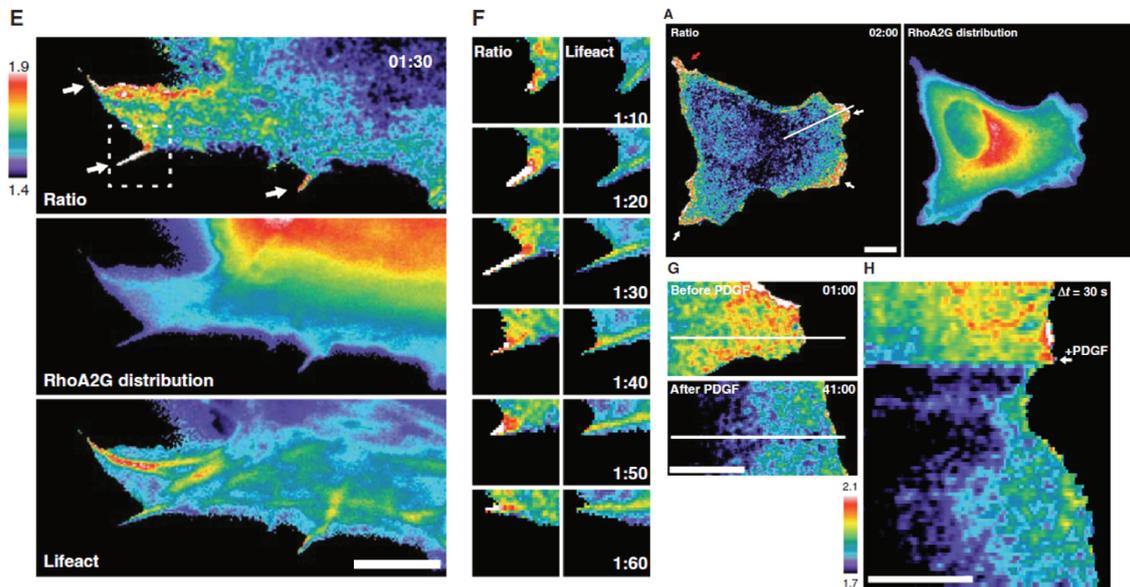


FIGURE 5.3 – Caractérisation de RhoA-2G [Fritz et al., 2013]

La figure 5.3A vérifie que l'activité de RhoA (déterminée par un calcul ratiométrique du FRET) n'est pas spatialement corrélée avec la distribution du biosenseur. Les figures 5.3E et F montrent la corrélation spatiale et temporelle entre le FRET et l'activité du cytosquelette matérialisée ici par un marquage de l'actine (Lifeact). Contrairement à [Machacek et al., 2009] qui montrait plutôt une activité spatiale étendue et peu confinée aux extrémités de RhoA, [Fritz et al., 2013] exhibe ici une activité très localisée et corrélée avec l'actine. En revanche, on retrouve une activité de RhoA antérieure à l'activité du cytosquelette provoquée. Les figures 5.3G et H illustrent l'effet d'un facteur de croissance (PDGF) couramment utilisé pour provoquer l'apparition de protrusions de membranes. L'activité de RhoA est encore corrélée avec l'ajout du PDGF, et antérieure à la réponse mécanique de la cellule.

Choix des cellules

Les fibroblastes MEF NIH-3T3 présentaient des avantages et des espoirs pour une activité notable du biosenseur DORA de Rac1 exprimé transitoirement. Leur activité migratoire forte, leur membrane active, auraient dû conduire à une bonne activité de Rac1. Malheureusement, des résultats préliminaires et la possibilité d'utiliser un autre biosenseur nous ont fait abandonner cette piste (voir section 3.5).

Les REF52 sont utilisées car elles présentent un cytosquelette intéressant, notamment avec des fibres de stress bien formées. En revanche, elles forment rapidement un tapis cellulaire. Il est important de les imager avant confluence pour rester en cellule unique et ne pas être influencé par les interactions entre cellules. D'autre part, elles sont assez immobiles, avec une vitesse de migration très faible, et peu de directionnalité. Leur simple observation sur

des lamelles de verre se révèle décevante, avec une activité très faible.

Ingrid Bourrin-Reynard (équipe de Corinne Albigès-Rizo, IAB) a tenté de réaliser une lignée stable avec les plasmides RhoA, Rac1 et CdC42 de seconde génération fournis par O. Pertz. Cette opération consiste à co-transfecter des cellules REF52 non transfectées avec de la transposase et le plasmide biosenseur type "piggybac-3" pour rendre la transfection stable. Les cellules sont maintenues en sélection sur antibiotique (puromycine) durant plusieurs semaines à des doses croissantes. Une fois stables, elles sont sélectionnées selon leur intensité de fluorescence par FACS.

Il faut noter une particularité des REF52 : leur forme usuelle et qui signale une bonne santé sont des cellules très grandes (50 μm ou plus de large), avec une membrane très fine sur le pourtour. Pour l'imagerie, cela pose pas mal de soucis, car la concentration en biosenseurs exprimés est alors plus faible. Or les cellules sont sélectionnées pour exprimer de manière stable un niveau de biosenseurs assez faible. Lorsqu'elles sont étalées, le signal de fluorescence observé passe alors souvent sous la valeur de 2 en SNR. Une fois encore, la nécessité d'imager en configuration TIRF s'impose.

Nous avons donc retenu cette combinaison cellules-biosenseur REF52/RhoA-2G pour sa facilité d'utilisation (lignées stables), au détriment de la qualité d'imagerie. De plus, l'expertise du laboratoire d'O. Pertz pour l'utilisation des biosenseurs nous ont convaincu, l'expression des biosenseurs est à niveau très faible qui permet que le FRET mesuré soit interprétable biologiquement. Une expression trop forte crée une perturbation des GTPases endogènes trop forte et un comportement des cellules non physiologique.

5.1.2 Précautions d'usage et de bon fonctionnement

Fonction biologique du biosenseur Une question récurrente à l'usage des biosenseurs (FRET ou autres) est de s'assurer que la grandeur mesurée (le FRET ici) est bien une mesure directe de la fonction biologique de la protéine étudiée. Autrement dit, comment peut-on s'assurer que la valeur de FRET mesurée est une mesure fidèle et exacte de la forme 3D de la GTPase (et donc de son état fonctionnel) ?

Notre outil principal de vérification à ce stade est la stoechiométrie et les graphes de calibration associés. Sur ces graphes, chaque pixel est représenté sur un histogrammes 2D, avec E, S ou AA comme axes (voir figure 1.12 pour des détails). La stoechiométrie permet de s'assurer que chaque pixel contient en moyenne un autant de fluorophores donneurs qu'accepteurs (un pixel contient plusieurs biosenseurs). Il faut utiliser le biosenseur dans de nombreuses configurations utilisant des contrôles positifs et négatifs de la GTPase (disponibles pour le DORA biosenseur mais pas pour RhoA-2G) et des drogues. [Grashoff et al., 2010] réalise un très grand nombre de contrôles pour le biosenseur force de la taline (que nous avons au laboratoire mais non utilisé dans ce travail). Si le comportement du biosenseur répond à des attentes raisonnables et que les graphes de contrôle sont corrects, on peut avoir confiance dans le comportement du biosenseur.

5.1.3 Utilisation pratique des biosenseurs en cellules vivantes

Transfections Dans le cas des biosenseurs qui nécessitent un niveau d'expression précis, l'assurance que la transfection (dans le cas de biosenseurs en transfection transitoire ou stable) s'est bien déroulée et que les cellules sont dans des conditions physiologiques est primordial.

Le bon étalement des cellules, signe d'un cytosquelette fonctionnel et d'adhésions focales établies, est un signe fort que la transfection s'est bien passée (D. Riveline). Dans le cas de

biosenseurs contrôles positifs de Rac1 par exemple, on s'attend à observer plus de cellules dont le pourtour forme un disque (cellule étalée au maximum, avec une forte tension dans le cytosquelette au pourtour), peu épaisses en vertical.

Préparation des cellules Les cellules sont décongelées, et passées pendant une à deux semaines pour qu'elle atteignent un état physiologique stable. La veille de l'imagerie, elles sont déposées sur le substrat d'imagerie, et mise dans un milieu sans phenol red pour diminuer leur autofluorescence (Fluorobrite). Juste avant imagerie, le milieu est remplacé par du PBS pré-chauffé.

Étapes de l'imagerie L'échantillon est rapidement placé dans la chambre d'imagerie thermostatée à 37°C (pour la stabilité mécanique, l'ensemble a été mis à température depuis au moins 12h). Un premier repérage rapide des cellules, leur répartition, leur état physiologique, est nécessaire. Puis les meilleures d'entre elles sont localisées et leur position mise en mémoire ainsi que leur mise au point. L'acquisition ALEX-FRET est lancée. A cause de l'inertie de l'objectif notamment, il est parfois nécessaire de refaire la mise au point au cours des acquisitions longues.

5.1.4 Difficultés de culture

Avec les REF52, j'ai fait face à de nombreux soucis techniques, dont notamment les passages (difficulté de décollage à la trypsine). J'ai notamment abandonné la centrifugation à cet effet.

Le maintien de la stabilité et de l'intensité de la fluorescence des cellules m'a également posé un certain nombre de soucis. Je me suis cantonné à un nombre limité de passages pour réaliser les expériences.

5.1.5 Mycoplasmes

Notre salle de culture a subi des soucis de mycoplasmes. Les traitements des REF52 ont fait disparaître l'expression stable du biosenseur. Nous avons donc décongelé de nouveaux échantillons de cellules.

5.2 Mise en pratique expérimentale

Cette section en annexe présente la réalisation pratique de l'acquisition optique et de la préparation des échantillons biologiques qui conduit à la mesure de FRET quantitatif sur des biosenseurs en cellule unique.

5.2.1 Montage expérimental

L'acquisition du signal de fluorescence repose sur un microscope de fluorescence inversé. Le statif est un Olympus commercial ainsi que les sources laser, mais la sélection et préparation des faisceaux lasers, ainsi que la collection du signal en sortie, sont maisons.

Montage optique - Schéma

Sources laser Le laser principal est un laser blanc pulsé de classe IV, "continuum". Après l'étage d'amplification, le spectre blanc passe dans une fibre optique (Liquid Light Guide) qui mélange tous les modes pour les rendre incohérents et pouvoir les utiliser en épifluorescence (cohérents, cela créerait des figures d'interférence). L'AOTF permet de sélectionner les longueurs d'ondes voulues. Cette construction atypique (dégrader un laser extrêmement cohérent) permet une plus grande versatilité pour l'employer à diverses tâches. La possibilité de réaliser de l'optogénétique avec un mode confocal notamment est envisagée. Son caractère pulsé permettrait de basculer vers une configuration FLIM si notre première approche n'était pas satisfaisante.

Avec le biosenseurs RhoA-2G, la puissance laser dans le bleu (445 nm) du laser blanc pulsé était un peu faible pour obtenir un signal suffisant. Nous avons donc ajouté un laser auxiliaire Oxixus ne délivrant que du laser autour de 445 nm. Durant l'interruption du laser blanc pour maintenance, nous avons également ajouté un module Oxixus délivrant un laser à 514 nm.

L'utilisation de ces petits lasers individuels est très pratique. Néanmoins, leur précision et stabilité en longueur d'onde est médiocre et demande une grande attention. En microscopie de fluorescence, l'adéquation parfaite entre les filtres dichroïques et les lasers est cruciale (voir paragraphe 5.2.1) pour ne pas polluer le signal de fluorescence par celui du laser. Or, la longueur d'onde du laser dépend (assez) fortement de la puissance à laquelle il est employé (figure 5.4). Une solution habituelle est d'utiliser le laser à sa puissance maximale pour être sûr de sa longueur d'onde, et d'ajouter un atténuateur de faisceau (densité optique tournante par exemple) pour ne pas avoir trop de laser. Dans cette série d'expérience, le dichroïque associé au réjecteur de bande coupait le laser dans toutes ses longueurs d'ondes accessibles, nous n'avons donc pas utilisé le laser à puissance maximale (très importante).

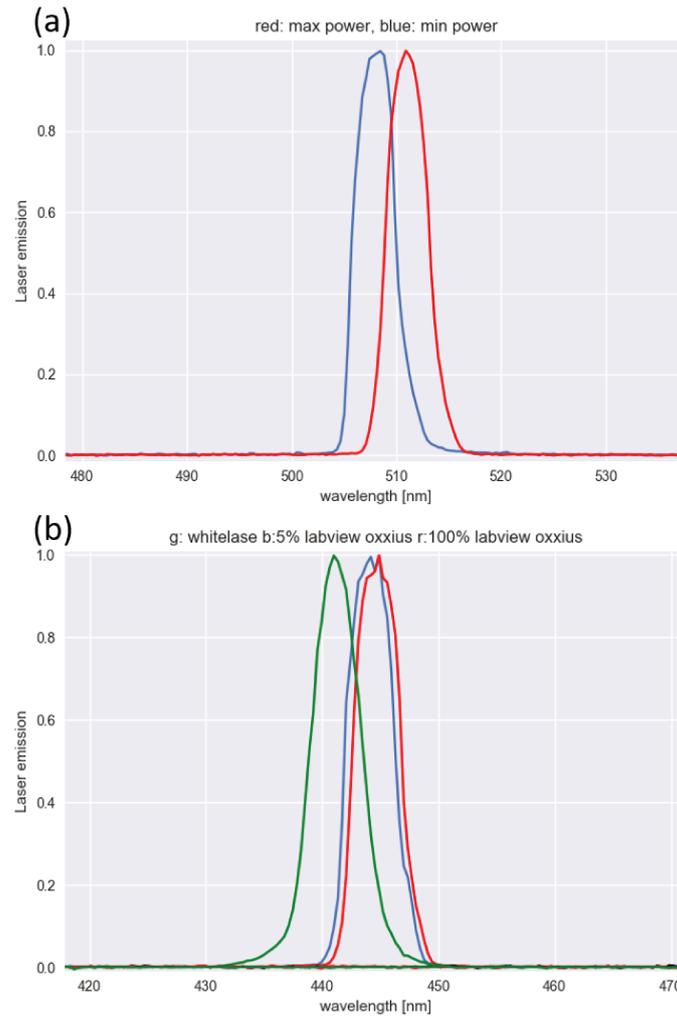


FIGURE 5.4 – Influence de la puissance laser sur sa longueur d'onde

Sélection et préparation des faisceaux laser Le faisceau laser blanc continuum sort de l'AOTF. Les faisceaux du fianium et des Oxxius sont ensuite recombines (figure 5.5). Le laser est inséré dans une fibre liquide mélangeuse de modes..

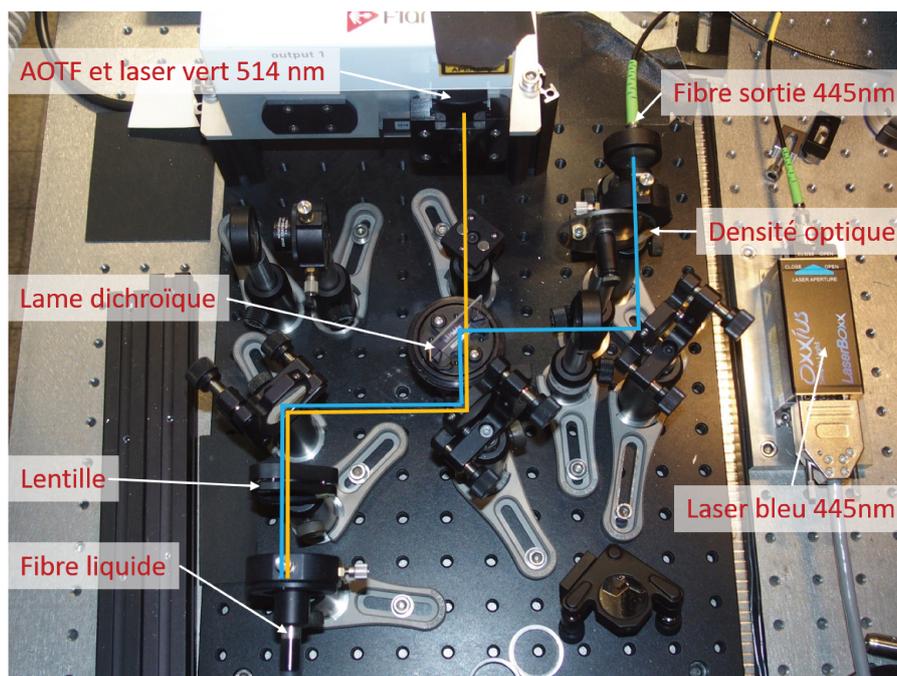


FIGURE 5.5 – Première partie de l'excitation : réunion des deux faisceaux lasers bleu et vert.

Il ressort par un agrandisseur de faisceau et passe dans le dispositif mixte épifluorescence / éclairage en réflexion totale interne frustrée (TIRF), combiné avec un montage en 4f, voir figure 5.6.

Éclairage Köhler Le faisceau passe ensuite dans un montage Köhler. C'est la disposition de deux diaphragmes dans deux plans conjugués en entrée et en sortie du microscope. Celui sur placé sur le chemin de l'excitation permet de limiter l'excitation à la zone d'observation (champ de vue). Le second, en émission, permet de récolter uniquement la lumière émise de ce même champ. Cela permet une amélioration du Signal sur Bruit comme moins de signal diffus provient d'ailleurs.

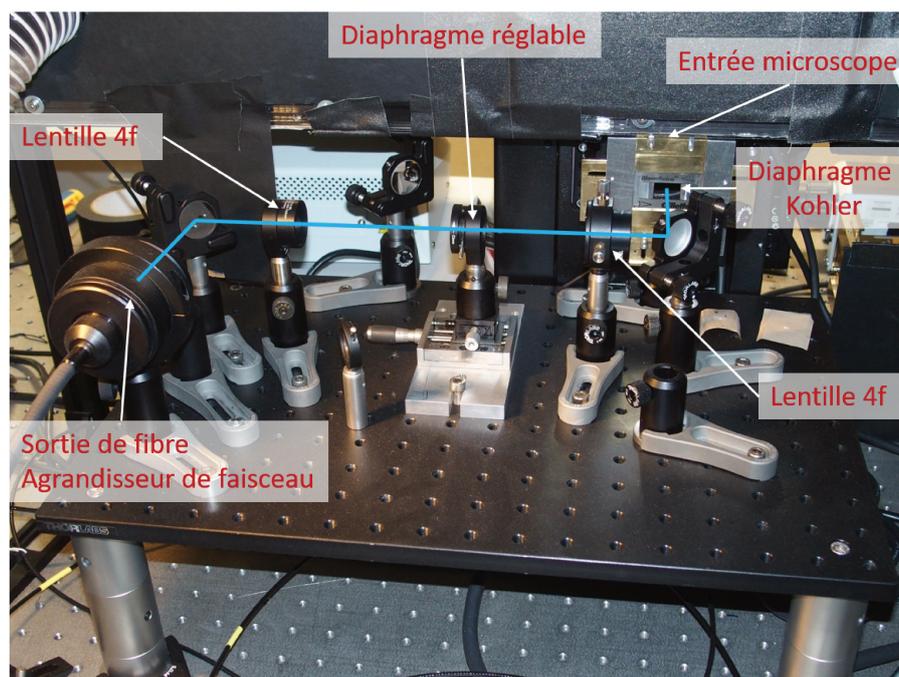


FIGURE 5.6 – Seconde partie de l'excitation : montage TIRF, mise en forme du faisceau et éclairage Köhler.

Microscope Le faisceau passe ensuite dans l'entrée du microscope (lentille de tube), puis le cube dichroïque qui sélectionne les bonnes longueurs d'ondes qui seront envoyées sur l'échantillon. Excité, la fluorescence est émise dans toutes les directions. La fraction qui repart selon l'axe optique est à nouveau filtrée par le cube dichroïque.

Séparateur chromatique Ensuite, le faisceau sort du microscope et entre dans la partie acquisition de la lumière.

Pour diminuer le temps d'acquisition en FRET ratiométrique, l'ALEX-FRET image simultanément le canal donneur et accepteur. Ceci est réalisé avec un séparateur chromatique. Un cube dichroïque sépare les deux canaux et les projette sur la caméra séparée en deux zones (figure 5.7).

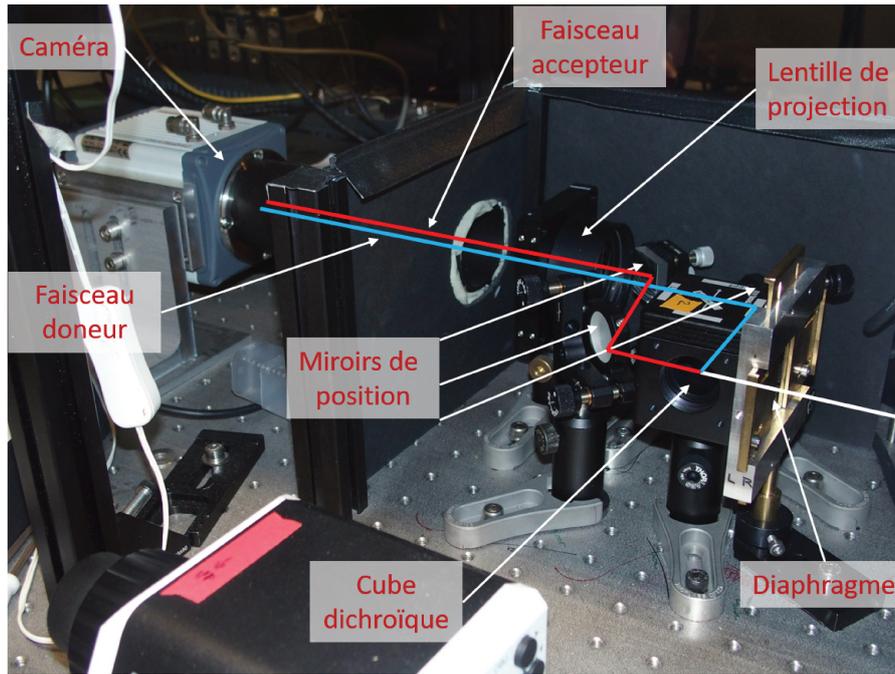


FIGURE 5.7 – Partie imagerie : séparateur chromatique

Puisque le miroir M3 (voir schéma 5.8) ne laisse pas passer la lumière à travers lui, il est nécessaire de le décaler en l'éloignant de M1 pour laisser passer la lumière issue de M2. Ainsi, le chemin optique L1 (passant par M1) est plus long que L2, et il n'est pas possible d'avoir simultanément sur la caméra les images issues des deux chemins nettes en même temps. Toute la difficulté réside dans le fait de rattraper cet écart, sans ajouter trop d'angles sur les miroirs, ce qui crée de la distorsion et des aberrations géométriques.

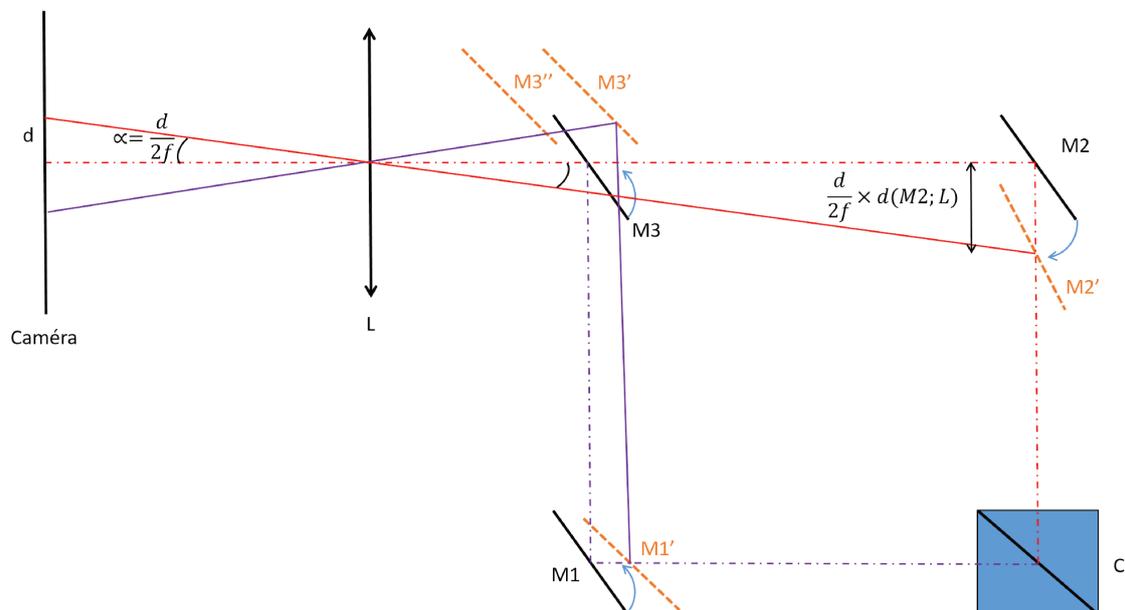


FIGURE 5.8 – Schéma du séparateur chromatique

Le miroir M1 est avancé vers le Cube et incliné, tandis que M3 est reculé et tourné également. En même temps M2 est avancé vers le cube (d'une distance qui peut être calculée selon la focale de la lentille de projection et la position de l'image sur la caméra) et tourné (voir figure 5.8). Ce calcul simple permet d'estimer que l'écart peut être compensé de cette façon, avec $d=5\text{mm}$ environ et $f=200\text{mm}$.

Montage optique - Caractéristiques

Pour l'excitation donneur, on obtient deux images d'intensité de fluorescence I_{DA} (I_{DD}) correspondant à l'émission du donneur excité par le laser L_D dans la fenêtre d'émission de l'accepteur (dans la fenêtre du donneur) (voir figure 1.8). Pour l'excitation accepteur, on obtient également deux images mais une seule est non nulle, I_{AA} correspondant à l'émission de l'accepteur dans la fenêtre spectrale de l'accepteur. En théorie il faudrait donc faire l'acquisition de trois images en changeant pour chacune les filtres d'excitation et d'émission. Cela prendrait un temps considérable, et un grand avantage de l'excitation alternée 3-cubes ALEX-FRET est de diminuer considérablement le temps d'acquisition (entre 1 et 2s au lieu de plus de 5s). Nous utilisons pour cela un jeu de filtres qui ne change pas pour l'excitation donneur et accepteur (voir figure 5.9), et la caméra est séparée en deux parties (haut/bas) par un séparateur chromatique ("optosplit") qui envoie sur la partie supérieure l'émission de l'accepteur et la partie basse celle du donneur (voir paragraphe 5.2.1). Une solution idéale est de projeter les deux canaux d'émission sur deux caméras séparées. Cette solution est envisagée mais demande un budget conséquent.

Un exemple des images obtenues classiquement (codées en niveaux de gris) est donné en figure 5.10, et donne une idée des intensités relatives entre les différents canaux. Le canal I_{DA} peut sembler le plus intense des trois, mais c'est aussi dû à un niveau de bruit plus élevé, le SNR y est souvent inférieur à celui dans I_{AA} .

Choix des Filtres L'enjeu de l'ALEX-FRET est de réaliser le plus rapidement possible l'acquisition des trois canaux I_{DD} , I_{DA} et I_{AA} . Pour cela, nous utilisons des cubes dichroïques : leur transmission dépend de la longueur d'onde du signal. Lorsque le rayonnement des lasers (445 nm et 514 nm) arrive sur le cube, ils sont réfléchis vers l'échantillon car le facteur de transmission vaut 0 (voir figure 5.9(a) et (b) pour le détail, à une longueur d'onde 445 et 514 nm). La fluorescence étant caractérisée par un déplacement spectral du rayonnement émis (Stokes shift), le dichroïque est construit pour transmettre l'intensité quelques nm après le laser, ainsi la fluorescence est transmise vers la partie acquisition (caméra) tandis que l'intensité laser réfléchi ou diffusée par l'échantillon est réfléchi et renvoyée vers la partie excitation. L'ajout de filtres réjecteurs de bande permet de rendre les dichroïques plus sélectifs pour s'assurer que l'intensité laser ne peut pas être transmise.

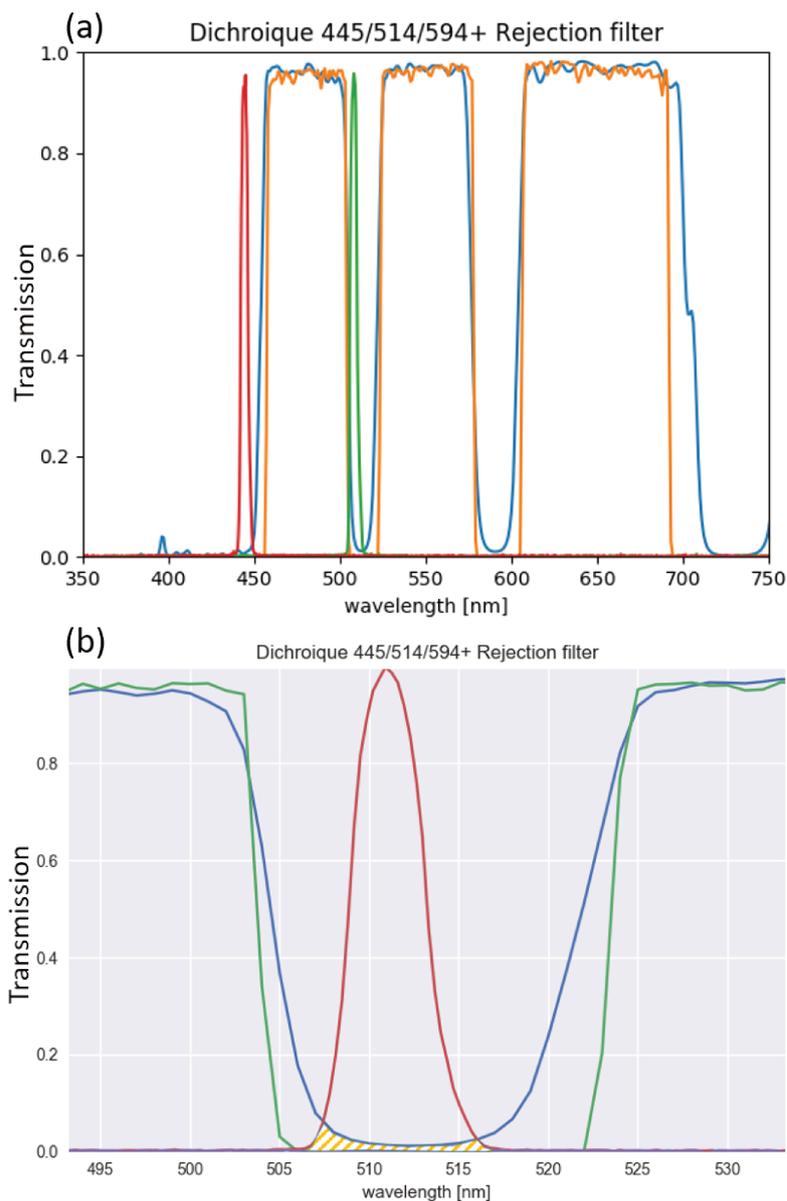


FIGURE 5.9 – Transmission des filtres pour l’ALEX-FRET. (a) Miroir dichroïque rejetant les lasers 445, 514 et 594. Le dichroïque seul est en bleu, l’ajout de réjecteurs de bandes ("notch") permet de rendre les dichroïques plus sélectifs en orange. Le laser 445 nm est en rouge, celui à 514nm en vert. (b) Détail autour du laser à 515nm.

La figure 5.9(b) montre en détail l’importance cruciale des filtres réjecteurs. Sans réjecteur (courbe bleue), l’aire hachurée jaune sous la courbe correspond à l’intensité de laser qui est transmise vers l’acquisition. Cela peut paraître peu, mais en microscopie de fluorescence la fraction d’intensité du laser convertie en fluorescence est très faible. Le moindre retour du laser est donc une énorme pollution du signal qui rend impossible toute interprétation. Ces filtres sont donc indispensables.

Rappelons que ces facteurs de correction sont propres aux fluorophores utilisés. Pour changer de fluorophores, il faut impérativement recalibrer le dispositif expérimental.

Soucis techniques Divers soucis techniques ont touché le dispositif expérimental. Parmi eux, la carte électronique contrôlant le statif du microscope a grillé en tentant d'installer une aide à la mise au point automatique. Le microscope a été renvoyé pour être réparé. Après quelques expériences à son retour, un élément interne au microscope (basculement entre chemin optique et oculaires) s'est révélé désaligné par le transport. Il a fallu attendre une intervention de techniciens Olympus pour le réparer en janvier 2019. Enfin, en février 2019, l'étage d'amplification du laser blanc supercontinuum n'a plus fonctionné. Il a fallu le renvoyer pour réparation également. Au final, les expériences ont été empêchées pendant plus de 6 mois.

Soucis de fond dans I_{DA} - Effet "lumière blanche" Il est apparu assez vite que le canal I_{DA} présentait un bruit de fond plus important que les autres. Ceci est problématique car c'est le canal où le FRET se manifeste fortement. Plusieurs hypothèses ont été envisagées, parmi lesquelles des filtres et cubes dichroïques mal adaptés qui laissaient passer du signal non voulu, des lasers dont la longueur d'onde était mal adaptée. Au final, la contribution principale provient de deux origines : la fluorescence de certains éléments du milieu, et la fluorescence de la lampe de lumière blanche à la verticale de l'échantillon. Le milieu a donc été remplacé (après de nombreux essais) par une simple solution saline (Phosphate Buffer Saline, PBS) sans fluorescence. Un cache opaque a été placé sur le chemin de la lampe blanche pour que le laser bleu ne vienne pas l'exciter. Mais par ailleurs, des nettoyeurs de faisceau ont été rajoutés en sortie des lasers, les jeux de cubes dichroïques optimisés.

Atténuation du laser bleu Pour qu'il fonctionne à sa longueur d'onde prévue, le laser bleu est poussé à une forte puissance. Il est donc atténué par une densité optique variable (disque tournant de densité optique variable).

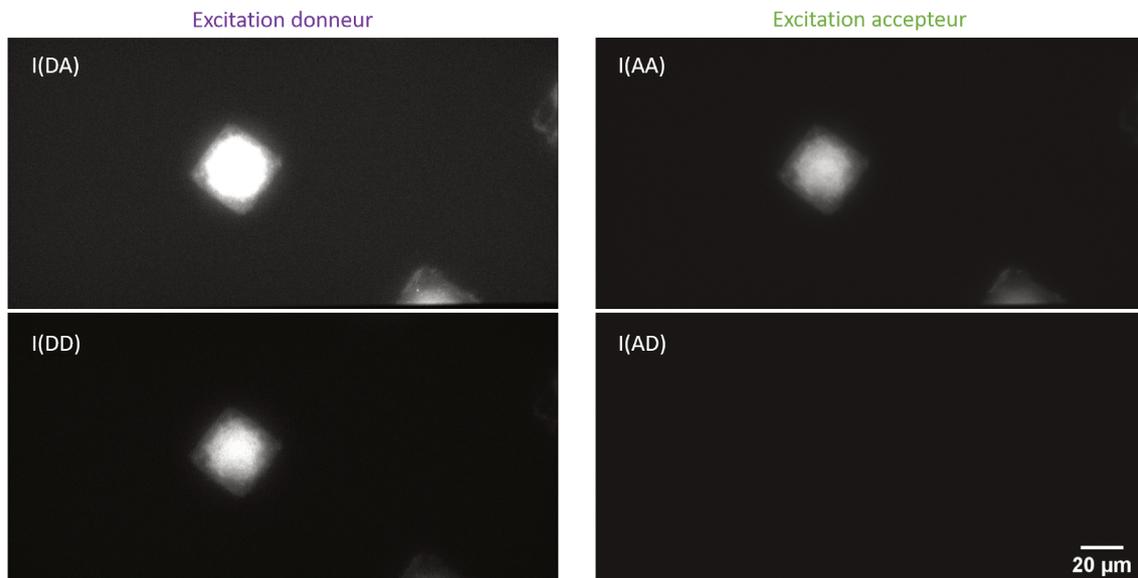


FIGURE 5.10 – Les quatre canaux d'intensité de fluorescence obtenus pour L_A et L_D , sur une cellule REF52 exprimant un biosenseur RhoA-2G, sur un motif carré.

Choix des puissances laser La puissance des lasers a été choisie de sorte que le rapport signal sur bruit (SNR) dans les protrusions (là où il est le plus faible) soit supérieur à 2, pour que ce signal ne soit pas écarté par l'analyse en FRET. Un étalonnage a été réalisé pour cela, en mesurant le SNR à différentes puissances laser pour les deux lasers. Néanmoins, à ce stade, la grande faiblesse du SNR (à la fois car le signal est faible mais aussi le bruit important dans le canal I_{DA}) est apparue nettement comme une limitation pour obtenir un signal de FRET contrasté.

La puissance du laser bleu a aussi été choisie pour ne pas saturer le biosenseur, rester dans le régime linéaire de fluorescence. Enfin, il fallait que l'intensité entre les trois canaux soit comparable, et que la puissance mesurée au wattmètre entre laser bleu et vert soit comparable. En effet, c'est l'énergie transmise qui compte du point de vue de la perturbation de la cellule.

Imagerie confocale - Comment se situe notre signal J'ai imagé des échantillons fixés sur un microscope confocal commercial Leica présent au Liphy. Ayant du mal à obtenir des SNR suffisants, je cherchais à situer l'intensité de notre signal par rapport à ceux habituels. J'envisageais également la possibilité d'étendre à une imagerie confocale la méthode QuanTI-FRET.

Les réglages habituels du confocal (puissance laser, ouverture du trou, temps d'acquisitions) ne donnaient presque aucun signal visible (le signal est faible dans I_{AA} , très faible dans I_{DA} et nul dans I_{DD}). Il faut ouvrir le trou nettement (6 UA, soit $5\mu m$ ou plus) et moyenner pour obtenir un signal décent dans I_{DD} (et cela reste moins bon que sur notre montage maison). Il a fallu recourir également au détecteur hybride, alors que classiquement on obtient un signal correct avec un tube multiplicateur de photons (PMT). Précisons que les lasers utilisés et les fenêtres d'acquisition spectrales étaient moins bien adaptées que sur notre montage maison, et limitaient la sensibilité du dispositif.

On retiendra que le signal de fluorescence émis par les lignées stables est extrêmement faible. Il est normal que j'aie du mal à obtenir un SNR nettement plus grand que 2. Et surtout, la voie de signalisation endogène est perturbée le moins possible, les résultats biologiques ne sont pas (au minimum) perturbés par l'expression additionnelle de RhoA-2G.

Précisons que la fixation ne permet pas de réaliser une mesure fiable du FRET. Les agents de fixation altèrent les propriétés photo-physiques des fluorophores de manière différente pour le donneur et l'accepteur, et ainsi l'efficacité de FRET.

A ce sujet, il est intéressant de se poser la question des temps caractéristiques de diffusion des biosenseurs durant les phases d'acquisition des deux canaux. Si un biosenseur a le temps de passer d'un pixel à l'autre entre l'acquisition de l'excitation donneur puis accepteur, comme le calcul du FRET est fait pixel à pixel, cela fausse complètement le calcul. Dans le cas du confocal, on compare le temps de balayage et le temps de parcours des molécules. Le balayage permet de descendre à $1.57\mu s$ par pixels, soit $800\mu s$ par ligne, soit autour de 5 à 10s pour une image entière avec moyennage de 2-8 passages. Ceci est compatible avec les coefficients de diffusion que l'on peut trouver dans la littérature ($30\mu m^2/s$ pour Src), l'acquisition pseudo-confocale est possible, mais pour avoir un SNR convenable on se situe sur la frontière du faisable.

Temps d'exposition La séquence ALEX-FRET est composée d'une phase d'exposition des fluorophores au laser donneur, d'ouverture de la caméra pendant le temps d'exposition $T_{exp} = 500ms$, puis un temps de transfert des données de la caméra vers le FPGA (variable

selon les besoins, au minimum de 50 ms pour permettre un transfert correct des données, puis le même cycle avec le laser accepteur.

5.2.2 Traitement d'images QuanTI-FRET

Code d'analyse - Traitement d'image

Le code Python en charge de l'analyse d'images a été principalement développé par Alexis Coullomb et Aurélie Dupont, je l'ai aménagé et enrichi.

Traitement d'image conventionnel

La toute première partie de la démarche, et la plus importante, consiste à acquérir de bonnes images : nettes, centrées, avec un bon SNR, sans saturation, avec une puissance laser pas trop forte pour ne pas créer de photo-blanchiment abusif. Ensuite, pour obtenir des images de FRET quantitatives, la démarche repose sur une correction rigoureuse des artefacts liés au montage expérimental. Les détails pratiques de ces corrections peuvent être consultés dans la thèse d'Alexis Coullomb [Coullomb, 2018]. Je rappelle ici les grandes lignes et les points clés. Ces corrections sont réalisées dans le code Python développé par l'équipe, et réalisées en préambule de chaque analyse de données.

Soustraction du noir Notre caméra est une sCMOS (scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor). Même en absence de photon incident, elle génère un signal électronique constant, et propre à la caméra. Ce signal ("Dark current") est propre à chaque pixel, et chaque pixel est indépendant des autres, de l'ordre de 100 u.a. en moyenne. On enregistre donc une image de référence, obturateur de la caméra fermé en moyennant cent images. Chaque pixel de cette référence sera ensuite soustrait à chaque image prochainement utilisée.

Correction du profil d'illumination du laser (Plage de Lumière Uniforme ou flat field) L'image d'une simple lame fluorescente *Chroma* (milieu fluorescent homogène) sur la caméra n'est pas plane et homogène spatialement en intensité comme elle devrait être (figure 5.11). Ceci est très préjudiciable pour l'analyse, car les éléments fluorescents situés au centre du champ de la caméra recevront plus de photons que ceux en périphérie, biaisant l'interprétation du signal de fluorescence émis.

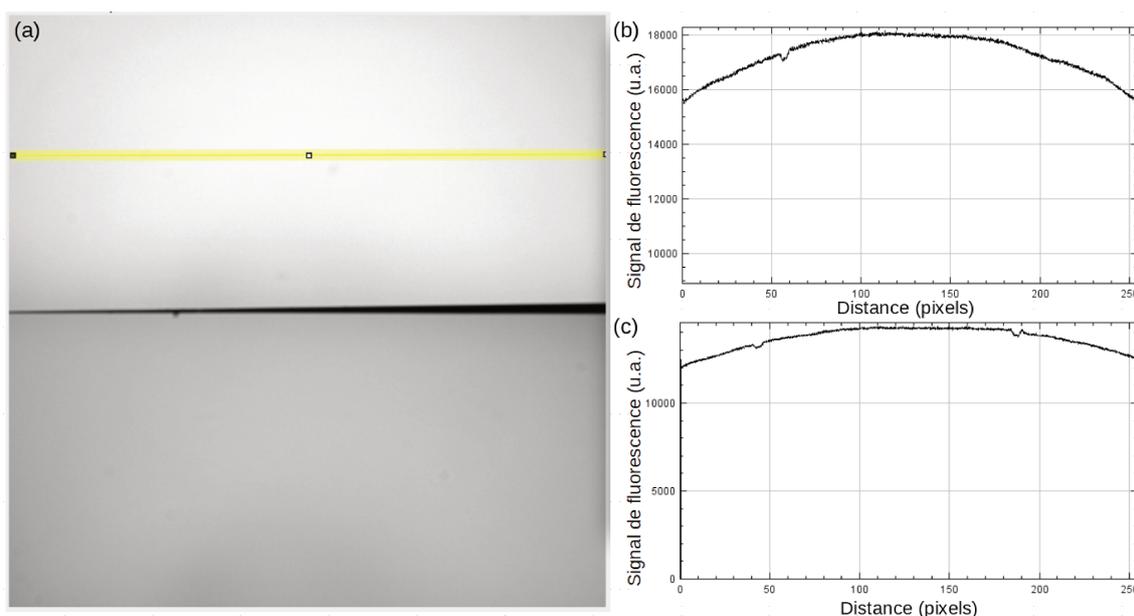


FIGURE 5.11 – Profil d'illumination. (a) Intensité de fluorescence reçue par la caméra, niveaux de gris. (b) et (c) Profils horizontaux d'intensité selon une ligne (moyennage 40 pixels) au milieu du champ de la caméra, canal DA et DD respectivement.

Ces aberrations du profil de fluorescence sont dues à plusieurs causes. Le faisceau du laser incident est (en première approximation) gaussien. On retrouve au premier ordre ce profil sur la figure 5.11, bien que aplani par la conjonction agrandisseur de faisceau et fenêtrage (lames de rasoir), voir 5.2.1. Les lentilles traversées déforment également ce profil gaussien et atténuent l'intensité sur les bords (effet de taille finie des lentilles qui limitent la quantité de photons pouvant les traverser, vignettage). D'autre part, la traversée du séparateur chromatique renforce cet effet "vignettage". L'usage du diaphragme rectangulaire (4 lames de rasoir) en entrée, puis du cube séparateur et des miroirs qui sont de très petite taille limitée à 1 inch dans le microscope (il y a une perte d'intensité sur les bords à ce stade, avoir de plus grands miroirs pour l'optosplit serait intéressant, mais plus coûteux pour ne pas avoir d'aberrations géométriques). On constate le profil légèrement différent entre les deux canaux, signe d'un traitement différent du faisceau par les deux chemins optiques empruntés.

Plutôt que de tenter de régler parfaitement le profil d'illumination (impossible, bien que le meilleur possible a été recherché), nous créons la PLU : l'image de fluorescence obtenue avec la lame *Chroma* est normalisée par son 99ème percentile pour éviter tout singularité. Les images futures seront divisées par la PLU.

En pratique lors des expériences, on fera attention à placer, le plus possible, les cellules là où le profil d'illumination est le plus plat possible, en général au centre du champ de la caméra (et dans mon cas d'éviter le bas du champ de vue où le profil vertical est moins bon).

Correction de l'alignement Le calcul du FRET se réalise pixel à pixel, en effectuant des opérations sur les trois canaux de fluorescence simultanément. Il est impératif que chaque pixel dans les trois canaux correspondent au même point de la cellule, et donc de réaligner les trois canaux parfaitement.

Le séparateur chromatique projette les canaux accepteur et donneur sur la caméra. La construction du séparateur chromatique (voir 5.2.1) implique que les deux canaux diffèrent par une transformation complexe. Cette transformation est composée de translation (angles différents des miroirs de le séparateur chromatique), rotation, homothétie (utilisation des miroirs hors des conditions de Gauss) et cisaillement.

On image un échantillon de micro billes (créant des points très définis) pour calculer la matrice de transformation affine qui permet le passage des pixels d'un canal à l'autre (voir [Coulomb, 2018], [van der Walt et al., 2014]). Tous les canaux donneur se verront alors appliquer cette matrice de transformation pour les aligner sur le canal accepteur.

Sans cette correction, un effet d'"ombrage" apparaît nettement dans le traitement des données et notamment sur la carte de FRET finale.

Soustraction du fond Comme en épifluorescence classique, il existe un signal non nul dans des zones sans cellules, non créé par les fluorophores d'intérêt ou les cellules les contenant. Ce signal provient majoritairement de la fluorescence des milieux de culture utilisés, choisis pour minimiser ce signal (voir 5.2.1). Il provient aussi parfois de la surface sur laquelle adhèrent les cellules (traitements de surfaces, protéines d'adhésion, impuretés et poussières).

On sélectionne une partie du champ de vue sans cellule, et la valeur moyenne est soustraite à toute l'image. Il est à noter que cette méthode est sensiblement différente de celle de la soustraction du noir, qui se fait pixel par pixel à raison, alors que celle-ci ne soustrait qu'une valeur moyenne. En effet, les pixels de la sCMOS sont indépendants électroniquement, alors que le bruit de fond provient ici du fond diffus de l'échantillon qui justifie une moyenne.

Dans une optique de raffinement de la méthode, on peut donc pointer l'imprécision de cette méthode. La contribution du milieu et de la fluorescence de la surface peut être (à raison) considérée uniforme là où il n'y a pas de cellule. Mais là où il y a une cellule, il y a autant de volume de milieu absent, et donc autant de signal de fluorescence en moins (bien que l'autofluorescence interne des cellules est liée au milieu dans lequel elles évoluent et qu'elles consomment). La cellule se nourrit du milieu, une cellule dans un milieu riche en flavines est plus autofluorescente qu'une cellule incubée dans un milieu type fluorobright (pauvre en flavines). Il est donc très important de mettre les cellules dans ce type de milieu 12h avant imagerie. Néanmoins, ces raffinements de correction semblent pouvoir être négligés en premier lieu, car la valeur du bruit est souvent de 10-20 u.a., à comparer avec les 100 u.a. du bruit noir et les centaines voir milliers de u.a. des fluorophores. On ne tiendra donc pas compte de ces détails pour ce travail. Mais on gagnera à étudier leur impact sur les cartes de FRET.

Autofluorescence des cellules Les cellules présentent naturellement une certaine autofluorescence, *ie* une fluorescence native, indépendante de la transfection réalisée sur elles. Celle ci est due à des éléments excitables dans la cellule (principalement les mitochondries et les lysosomes), habituellement étudiée à l'aide de lasers UV [Andersson et al., 1998]).

Les principaux responsables de cette autofluorescence sont les flavines sécrétées majoritairement dans le milieu extérieur par les cellules (10 fois plus qu'à l'intérieur de la cellule pour certaines bactéries) [Mihalcescu et al., 2015]. Ce signal est suffisamment détectable pour être utilisé comme mesure de la densité cellulaire pour les bactéries lorsque la mesure classique par densité optique ne fonctionne plus. Pour des signaux de fluorophores de faible intensité, l'autofluorescence des flavines peut rendre l'interprétation du signal de fluorescence impossible.

Des travaux sont en cours pour tenter de différencier les signaux issus des fluorophores et ceux de l'autofluorescence

Pour corriger cette fluorescence qui ne vient pas de biosenseurs FRET, nous sélectionnons des cellules non transfectées et nous réalisons sur elles des analyses identiques à celles faites sur les cellules transfectées ou exprimant le biosenseur FRET. Concernant cette partie, nous pouvons mesurer l'intensité associée dans les trois canaux. Or ce signal est très inhomogène spatialement. Il est relativement fort dans des compartiments de la cellule et faible ailleurs. Il est donc impossible d'établir une valeur moyenne raisonnable à l'échelle d'une cellule. On peut noter en revanche que le FRET FLIM est capable de distinguer pixel par pixel le signal d'autofluorescence lorsque les temps de vie des fluorophores associés sont suffisamment différents. Pour le QUANTI-FRET, l'utilisation de S permet de ne pas considérer des zones à trop forte autofluorescence. Ces zones sont souvent associées à des valeurs de stoechiométrie fortement différente de sa valeur moyenne (0.5), et sont donc mises de côté par le facteur qualité α (voir le paragraphe 1.3.3).

Heureusement, dans le cas des fluorophores standards utilisés pour le calcul des Γ , j'ai mesuré que le ratio maximal entre intensité d'autofluorescence et de fluorophores transfectés dans les trois canaux ne dépassait pas 0.1%. Nous négligerons ce terme à l'avenir, tout en restant attentif pour chaque cellule considérée aux zones avec vésicules ou compartiment cellulaire.

Correction du drift Un certain nombre de films présentent une dérive spatiale dans le plan de la cellule importante. Les causes exactes ne sont pas claires, mais la qualité du porte échantillon semble capitale. Il comporte des parties qui se serrent avec ressorts, et des ressorts trop lâches peuvent laisser un jeu et mener à une dérive.

J'ai écrit un code pour corriger cette dérive. Elle s'appuie sur la fonction de corrélation croisée en 2D entre une image et sa suivante (calculée avec une transformée de Fourier rapide, inspirée de https://scikit-image.org/docs/stable/auto_examples/registration/). La position de son maximum donne le décalage spatial dans le plan entre les deux images.

Réalisation des masques Pour une meilleure reproductibilité, les masques des cellules sont réalisés automatiquement avec Fiji. Ils servent notamment à réaliser des statistiques sur les cellules, mais aussi à effectuer des contrôles automatiques sur les différents canaux pour le calcul du FRET. Le principe consiste à appliquer un filtre gaussien pour supprimer le bruit pixel à pixel, puis à binariser les images en utilisant un seuillage automatique de Fiji ("Auto Threshold", dont il faut choisir le paramètre adapté au jeu de données), enfin à utiliser une reconnaissance d'objets pour exclure les petits objets et ne conserver que le masque de la cellule.

L'utilisation de masques réalisés de manière automatique permet de sélectionner de façon reproductible les pixels avec un SNR suffisant (à peu près supérieur à 2). Cela permet également une sélection des pixels de qualité et dont on peut raisonnablement réaliser l'analyse.

Importance de l'analyse pixel par pixel

Le calcul du FRET et toute l'analyse qui va suivre se fait pixel à pixel en soustrayant, divisant, les trois canaux pixel à pixel. Ceci est fondamental. Cela requiert un traitement des données parfait, notamment quand à l'alignement parfait des trois canaux. Le calcul sur des pixels permet d'étudier les comportements statistiques des populations de pixels au

sein d'une cellule, au sein d'une condition biologique, au sein d'un échantillon de cellules. Il permet de se libérer et de maîtriser la variabilité inhérente au matériau biologique. L'utilisation des percentiles, des outils statistiques, permet de déceler les biais et de les atténuer ou les supprimer.

Choix des paramètres du FRET filtré Voici une illustration de la manière dont sont choisis les différents paramètres du facteur de qualité. Nous nous intéressons ici au seuil sur la carte des poids filtrés spatialement W_{th} .

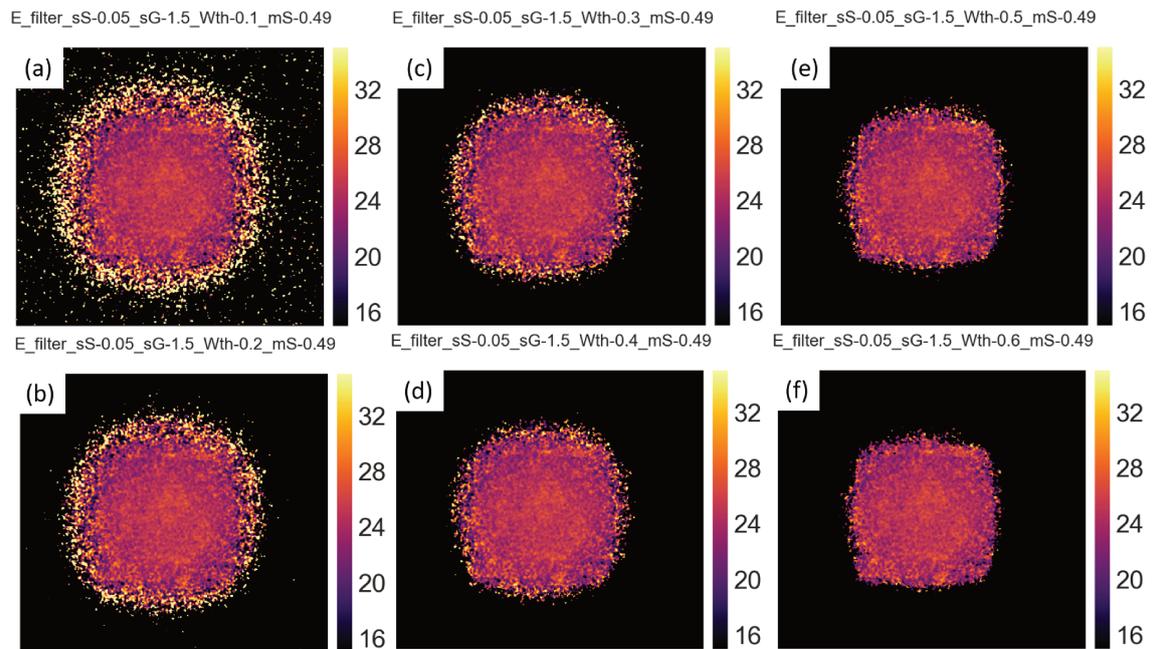


FIGURE 5.12 – Impact de W_{th} sur le FRET filtré. (a) $W_{th}=0.1$, (b) $W_{th}=0.2$, (c) $W_{th}=0.3$, (d) $W_{th}=0.4$, (e) $W_{th}=0.5$ et (f) $W_{th}=0.6$

La figure 5.12 présente l'impact du paramètre W_{th} sur la carte de FRET filtrée d'une cellule sur motif carré. $W_{th}=0.4$ est la valeur qui permet d'écarter les pixels encore bruités, tout en ne perdant pas trop de pixels avec du signal.

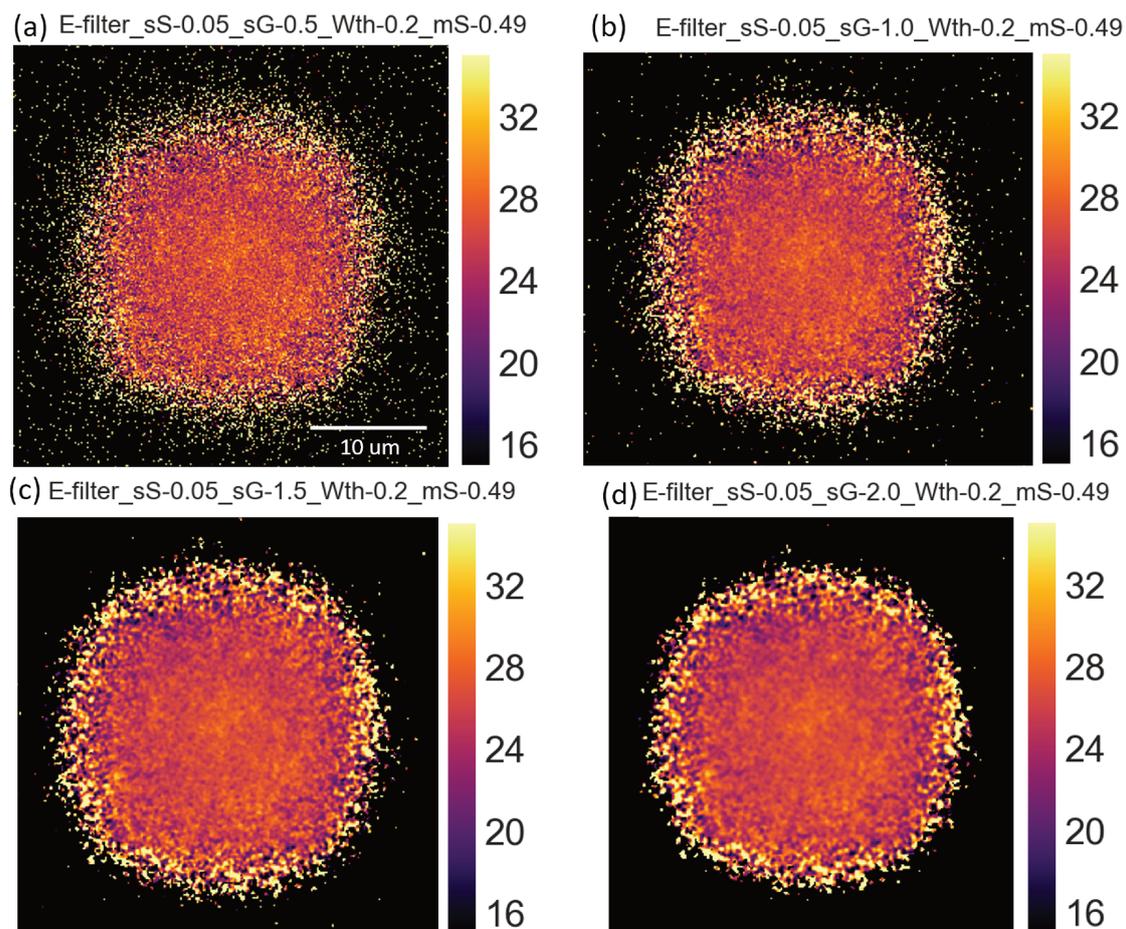


FIGURE 5.13 – Comparaison du filtre qualité sur une cellule sur motif carré en variant la taille de la gaussienne spatiale (a) $\sigma G=0.5$ pixels (b) $\sigma G=1.0$ pix (c) $\sigma G=1.5$ pix (d) $\sigma G=2.0$.

La figure 5.13 présente l'impact du paramètre σG (taille de la gaussienne spatiale) sur le filtre qualité d'une cellule sur motif carré. Outre le fait de choisir la valeur adéquate de σG , cette figure met en évidence la robustesse du phénomène de clusters. La présence et la taille des clusters n'est pas affectée par la taille de la gaussienne spatiale utilisée pour le filtre. Ces clusters ne sont donc pas une construction biaisée du filtrage mais une donnée intrinsèque au signal de FRET.

5.3 Spectres des fluorophores

La figure 5.14 présente les trois spectres des fluorophores superposés, sans lien entre les couleurs des graphes et leur spectre. Cela permet de comparer le passage du donneur Cerulean à TFP lors du passage du biosenseur de Rac1 à celui de RhoA-2G.

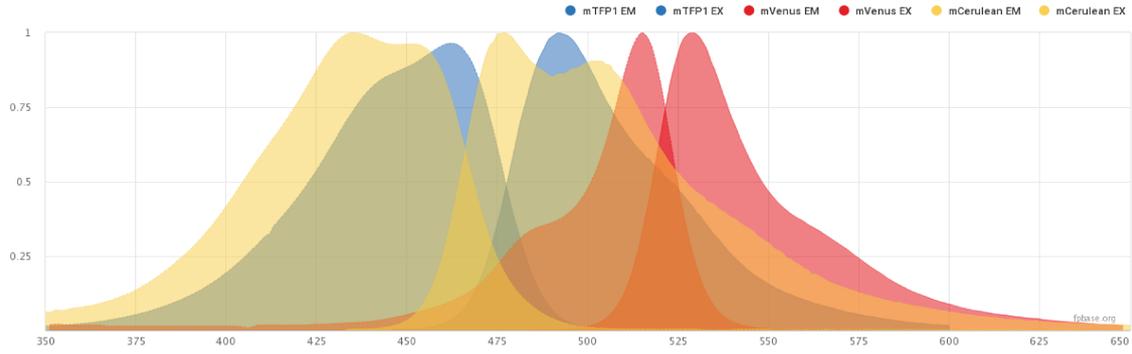


FIGURE 5.14 – Spectres de mTFP1, Venus et Cerulean

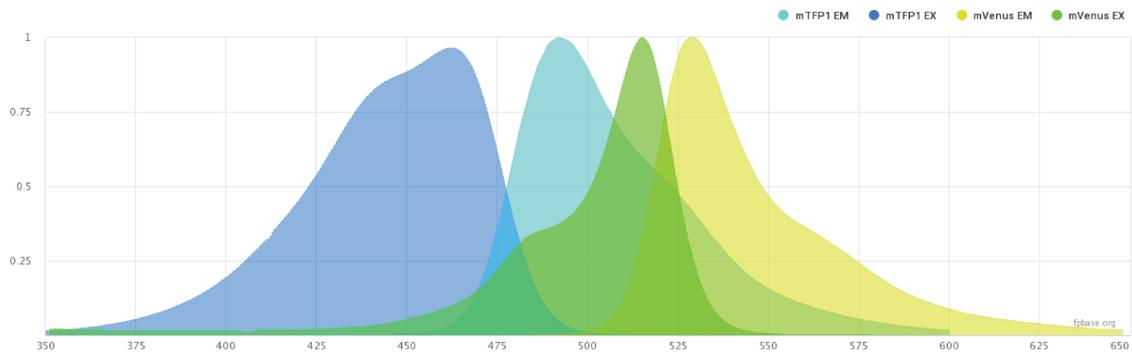


FIGURE 5.15 – Spectre mTFP1 et Venus

Spectres Notre jeu de filtres n'est pas bien adapté à TFP1. Il y a peu de signal donneur mTFP1 dans la fenêtre donneur (445-510), moins que pour Cerulean. C'est pour cela que α^{BT} est plus élevé que pour la calibration de [Coullomb, 2018].

5.4 Filtre qualité sur les cartes de FRET

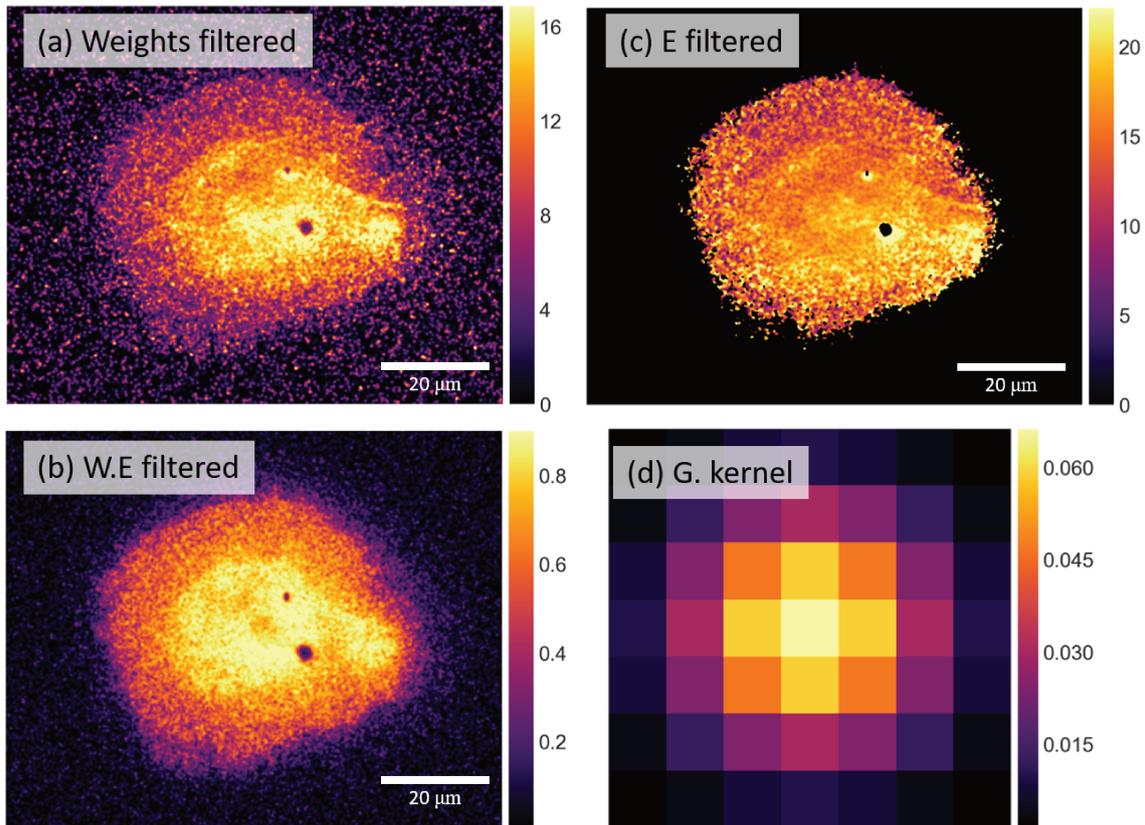


FIGURE 5.16 – Détails pratiques pour le calcul du facteur de calibration. (a) Carte des poids filtrés. (b) Carte de W.E filtrée. (c) Carte de E filtrée. (d) Carte du kernel gaussien. L'intensité est en unités arbitraires selon un LUT plasma.

5.5 Autocalibration

5.5.1 Bootstrap

La figure 5.17 présente les résultats du Bootstrap pour trois conditions d'expériences : les biosenseurs Rh2G sur motifs adhérents seuls, les biosenseurs sur motifs et avec ajout de la drogue Y-27632 ("Rh2G-Y27"), et toutes les conditions (ajout des T17V, une autre condition non présentée dans ce travail).

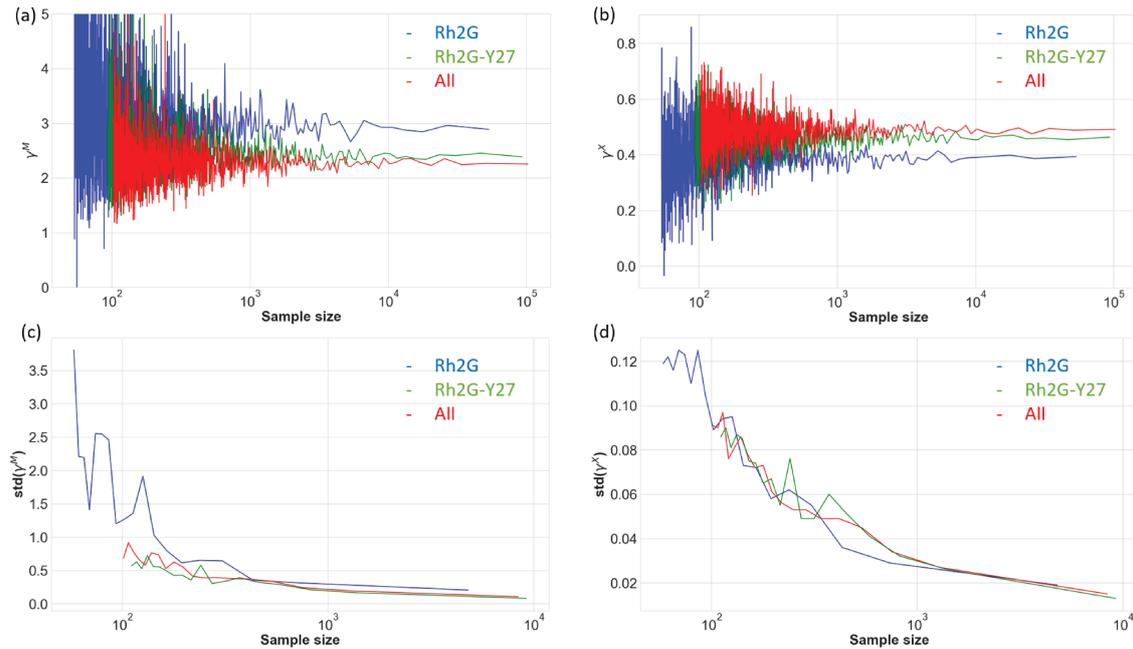


FIGURE 5.17 – Résultats comparatifs des trois conditions des bootstrap sur (a) γ^M (b) β^X (c) l'écart type de γ^M (d) l'écart type de β^X , en fonction de la taille de l'échantillon en échelle logarithmique à chaque fois.

On constate le comportement semblable de Y27 et T17V (l'ajout de T17V ne crée pas de différence majeure), tandis que Rh2G se démarque légèrement. Les valeurs à convergence des β^X et γ^M sont significativement différentes pour Rh2G. En revanche, la vitesse de convergence des β^X et γ^M ainsi que leurs incertitudes associées sont très semblables. Seule Rh2G présente des oscillations plus fortes au début de la décroissance, signe de la plus forte influence du bruit chez elle. D'un point de vue mathématique, ces trois conditions sont également justifiées pour servir au calcul des β^X et γ^M .

5.6 Abréviations et vocabulaire technique

Blebs (bulle) Excroissance de la membrane plasmique en forme de bulle, suite au découplage local du cytosquelette de la membrane.

AFs Adhésions focales.

PSF Point Spread Function : fonction d'étalement spatial optique du signal optique à travers les optiques du microscope.

Rh2G Biosenseur RhoA-2G ("deuxième génération") rapportant l'activité de RhoA (source O. Pertz).

SNR "Signal to noise ratio" : rapport signal à bruit.

5.7 Transfections de Ce, Ve ou TFP sur fibroblastes 3T3

Le protocole :

- Dans petits eppendorfs, mettre 50uL OPTIMEM + 1uL ADN (vortex+spinout) par condition, et N fois (2.5uL L2K + 50uL OPTIMEM) pendant 5' RT.
- Mélanger (vortex+spinout) et laisser pendant 20min.
- Lancer immédiatement le passage des cellules avec du milieu SANS P/S.
- Préparer une boîte 6 puits et une lamelle par conditions, aspergée d'éthanol et laissée sécher. 1mL milieu SANS P/S.
- Compter les cellules, il en faut 25k par puits (ou un peu plus ça va). Ce jour j'avais 620k cellules par cellule, j'ai mis 50uL par puits soit 31k cellules.
- Ajouter les cellules dans les eppendorfs, mélanger. Déposer en gouttes sur lamelles sans remuer.
- Attendre 5min, remuer la 6-puits.
- Lendemain ou après midi, changer le milieu.

Avec le Jetprime For optimal DNA transfection conditions, we recommend using cells which are 60 to 80% confluent at the time of transfection. Typically, for experiments in 6-well plates, 200 000 cells are seeded per well in 2 ml of cell growth medium 24 h prior to transfection.

Culture vessel	6-well / 35 mm
Number of adherent cells to seed	150 000 - 250 000
Surface area per well (cm ²)	9.4
Volume of medium per well to seed the cells (ml)	2

The following conditions are given per well of a 6-well plate. For other culture format, please refer to Table 2.

1. Dilute 2 ug DNA into 200 ul jetPRIME buffer (supplied). Mix by vortexing.
2. Vortex jetPRIME reagent for 5 sec and spin down before use.
3. Add 4 ul jetPRIME, vortex for 1 sec, spin down briefly.
4. Incubate for 10 min at RT.
5. Add 200 ul of transfection mix per well dropwise onto the cells in serum containing medium, and distribute evenly.
6. Gently rock the plates back and forth and from side to side, incubate the plate at 37 degC.
7. If needed, replace transfection medium after 4 h by cell growth medium and return the plates to the incubator.
8. Analyze after 24 h or later.

Culture Vessel	6-well / 35 mm
Volume of jetPRIME® Buffer uL	200
Amount of DNA ug	2
Volume of jetPRIME® reagent uL	4 - 6
Volume of growth medium mL	2

Prepare a master mix of minimum 50 ul to allow accurate pipetting and homogenous preparation of the complexes.

Standard conditions : 1 :2 DNA to jetPRIME ratio (w/v) for 1 ug of DNA use 2 μ l of jetPRIME.

Référence internet : <https://www.polyplus-transfection.com/resources/cell-transfection-database/?type=invitro&cell%5B%5D=1090&cell%5B%5D=1055&biomolecule%5B%5D=82&reagent%5B%5D=88&fsearch=&subbtn=Search>.

5.8 Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour les REF52 est celui utilisé par [Martin et al., 2014]. Il doit être supplémenté en L-glutamine.

5.9 Réglage du microscope

- Centrer le condenseur en lumière blanche, aligner également le laser.
- Avec une lamelle recouverte de billes (micrométriques), mettre au point et refermer le condenseur.
- DIC : enclencher la lame $\lambda/4$, puis le Wollaston adapté au grossissement de l'objectif, centrer le Wollaston, Enclencher le Wollaston en sortie ainsi que le polariseur à 45° .
- Centrer la caméra sur l'image des oculaires avec les miroirs de l'optosplit.
- Centrer le profil d'intensité du laser (avec les miroirs en amont du statif).
- Ajuster le z entre les deux canaux de l'optosplit avec le motif USARF et les billes fluorescentes.
- Avec ce même pattern, calibrer la correspondance pixels- μ m.

Chapitre 6

Remerciements

N'étant pas un habitué des effusions, je ferai un rapide chapitre de remerciements.

Merci à tous mes ami(e)s qui m'ont accompagné(e)s durant ces trois années, dans le cadre du travail, mais aussi hors de ce cadre : tous les doctorants, stagiaires, post-docs du Liphy mais plus particulièrement Léo, Thomas, Artur, Adrien, Maxime, Sylvain, Agathe, Alexis, Elisa, Manon, Cécile, Magali, les amis Théophile, Benjamin, Ghyslain, Emeric, Boris, Marian, Aurélia, Seb, Antonin, Julien, Stéphane avec une mention toute particulière à Valentin qui m'a apporté soutien et réconfort dans certains moments difficiles. Pardon à toutes celles et ceux que j'oublie de lister ici.

Merci aux collaborateurs(trices) : Shiwei, Ingrid, Corinne, Mathilde, Christiane et tous ceux que j'oublie.

Merci aux chercheurs permanents du Liphy avec qui j'ai interagi : Martial, Thomas, Irène, Philippe, Antoine, Cyril, Hans, Aurélien, Jean, Giovanni et l'équipe administrative.

Bien sûr, un très grand merci à Aurélie pour ce très beau sujet, ton encadrement, les moyens intellectuels et humains que tu m'as donné, ta présence, ton aide pour les moments difficiles sur la fin.

Enfin, c'est à ma famille que je pense en dernier lieu. Merci papa, maman, Camille, Pierre, pour tout, ce n'est pas facile de détailler ici... Pour tout votre amour et tendresse qui construit. Merci papilou, mamine, Monique et toute la famille élargie.

Merci à mamie et grand-père pour votre présence avant et maintenant, tout ce que vous m'avez apporté et notamment la passion des sciences, de l'enseignement, la douceur et la patience. Votre grandeur humble restera à tout jamais gravée en moi, elle m'accompagne partout où je vais et me guide, m'aide à poursuivre.

Bibliographie

- [Andersson et al., 1998] Andersson, H., Baechi, T., Hoechl, M., and Richter, C. (1998). Autofluorescence of living cells. *Journal of microscopy*, 191(Pt 1) :1–7. [98](#)
- [Axelrod, 2001] Axelrod, D. (2001). Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2(11) :764–774. [75](#)
- [Berney and Danuser, 2003] Berney, C. and Danuser, G. (2003). Fret or no fret : a quantitative comparison. *Biophysical journal*, 84(6) :3992–4010. [29](#)
- [Bertolin et al., 2016] Bertolin, G., Sizaïre, F., Herbomel, G., Reboutier, D., Prigent, C., and Tramier, M. (2016). A fret biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase a in living cells. *Nature communications*, 7(1) :1–16. [24](#)
- [Bidan et al., 2018] Bidan, C. M., Fratzl, M., Coullomb, A., Moreau, P., Lombard, A. H., Wang, I., Balland, M., Boudou, T., Dempsey, N. M., Devillers, T., et al. (2018). Magnetoactive substrates for local mechanical stimulation of living cells. *Scientific reports*, 8(1) :1464. [13](#), [78](#)
- [Blanchoin et al., 2014] Blanchoin, L., Boujemaâ-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological reviews*, 94(1) :235–263. [16](#)
- [Boulter et al., 2010] Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P. J., and Burridge, K. (2010). Regulation of rho gtpase crosstalk, degradation and activity by rhogdi1. *Nature cell biology*, 12(5) :477. [25](#)
- [Cai et al., 2014] Cai, D., Chen, S.-C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choessel-Cadamuro, V., Sawyer, J. K., Danuser, G., and Montell, D. J. (2014). Mechanical feedback through e-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell*, 157(5) :1146–1159. [56](#)
- [Carpi et al., 2011] Carpi, N., Piel, M., Azioune, A., and Fink, J. (2011). Micropatterning on glass with deep uv. *Protoc. Exch*, 10. [62](#)
- [Coullomb, 2018] Coullomb, A. (2018). *Développement de substrats actifs et d’une méthode d’analyse de FRET quantitative pour décoder la mécanotransduction*. PhD thesis, Grenoble Alpes. [8](#), [27](#), [31](#), [96](#), [98](#), [102](#)
- [Coullomb et al., 2020] Coullomb, A., Bidan, C. M., Qian, C., Wehnekamp, F., Oddou, C., Albigès-Rizo, C., Lamb, D. C., and Dupont, A. (2020). Quanti-fret : a framework for quantitative fret measurements in living cells. *Scientific reports*, 10(1) :1–11. [10](#), [14](#), [29](#), [31](#), [37](#), [44](#), [48](#), [53](#), [58](#), [66](#), [67](#)
- [de Beco et al., 2018] de Beco, S., Vaidžiulytė, K., Manzi, J., Dalier, F., Di Federico, F., Cornilleau, G., Dahan, M., and Coppey, M. (2018). Optogenetic dissection of rac1 and cdc42 gradient shaping. *Nature communications*, 9(1) :1–13. [21](#), [56](#)

- [del Rio et al., 2009] del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J. M., and Sheetz, M. P. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*, 323(5914) :638–641. [17](#), [26](#)
- [Demené et al., 2015] Demené, C., Deffieux, T., Pernot, M., Osmanski, B.-F., Biran, V., Gennisson, J.-L., Sieu, L.-A., Bergel, A., Franqui, S., Correas, J.-M., et al. (2015). Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast ultrasound data highly increases doppler and ultrasound sensitivity. *IEEE transactions on medical imaging*, 34(11) :2271–2285. [68](#)
- [Elosegui-Artola et al., 2016] Elosegui-Artola, A., Oria, R., Chen, Y., Kosmalska, A., Pérez-González, C., Castro, N., Zhu, C., Trepát, X., and Roca-Cusachs, P. (2016). Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nature cell biology*, 18(5) :540–548. [17](#)
- [Engler et al., 2006] Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4) :677–689. [15](#)
- [Fritz et al., 2013] Fritz, R. D., Letzelter, M., Reimann, A., Martin, K., Fusco, L., Ritsma, L., Ponsioen, B., Fluri, E., Schulte-Merker, S., van Rheenen, J., et al. (2013). A versatile toolkit to produce sensitive fret biosensors to visualize signaling in time and space. *Sci. Signal.*, 6(285) :rs12–rs12. [11](#), [50](#), [62](#), [83](#), [84](#)
- [Fritz et al., 2015] Fritz, R. D., Menshykau, D., Martin, K., Reimann, A., Pontelli, V., and Pertz, O. (2015). Srgap2-dependent integration of membrane geometry and slit-robo-repulsive cues regulates fibroblast contact inhibition of locomotion. *Developmental cell*, 35(1) :78–92. [74](#)
- [Fritz and Pertz, 2016] Fritz, R. D. and Pertz, O. (2016). The dynamics of spatio-temporal rho gtpase signaling : formation of signaling patterns. *F1000Research*, 5. [71](#), [73](#)
- [Gauthier and Roca-Cusachs, 2018] Gauthier, N. C. and Roca-Cusachs, P. (2018). Mechanosensing at integrin-mediated cell–matrix adhesions : from molecular to integrated mechanisms. *Current opinion in cell biology*, 50 :20–26. [17](#), [64](#)
- [Gayrard and Borghi, 2016] Gayrard, C. and Borghi, N. (2016). Fret-based molecular tension microscopy. *Methods*, 94 :33–42. [23](#), [26](#)
- [Goedhart and van Unen, 2019] Goedhart, J. and van Unen, J. (2019). Molecular perturbation strategies to examine spatiotemporal features of rho gef and rho gtpase activity in living cells. *Small GTPases*, 10(3) :178–186. [19](#), [20](#)
- [Gordon et al., 1998] Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H., Levine, B., and Herman, B. (1998). Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 74(5) :2702–2713. [31](#), [35](#)
- [Grashoff et al., 2010] Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M. T., McLean, M. A., Sligar, S. G., Chen, C. S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466(7303) :263–266. [23](#), [26](#), [85](#)
- [Hall, 1998] Hall, A. (1998). Rho gtpases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279(5350) :509–514. [18](#), [20](#)
- [Hall, 2005] Hall, A. (2005). Rho gtpases and the control of cell behaviour. *Biochemical Society Transactions*, 33(5) :891–895. [18](#), [21](#)
- [Hedrick et al., 2016] Hedrick, N. G., Harward, S. C., Hall, C. E., Murakoshi, H., McNamara, J. O., and Yasuda, R. (2016). Rho gtpase complementation underlies bdnf-dependent homo-and heterosynaptic plasticity. *Nature*, 538(7623) :104–108. [18](#)

- [Hennig et al., 2020] Hennig, K., Wang, I., Moreau, P., Valon, L., DeBeco, S., Coppey, M., Miroshnikova, Y., Albiges-Rizo, C., Favard, C., Voituriez, R., et al. (2020). Stick-slip dynamics of cell adhesion triggers spontaneous symmetry breaking and directional migration of mesenchymal cells on one-dimensional lines. *Science advances*, 6(1) :eaau5670. [16](#), [62](#)
- [Hui et al., 2015] Hui, S., Silverman, J. M., Chen, S. S., Erickson, D. W., Basan, M., Wang, J., Hwa, T., and Williamson, J. R. (2015). Quantitative proteomic analysis reveals a simple strategy of global resource allocation in bacteria. *Molecular systems biology*, 11(2). [13](#)
- [James et al., 2008] James, J., Goluch, E. D., Hu, H., Liu, C., and Mrksich, M. (2008). Subcellular curvature at the perimeter of micropatterned cells influences lamellipodial distribution and cell polarity. *Cell motility and the cytoskeleton*, 65(11) :841–852. [62](#)
- [Kanchanawong et al., 2010] Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F., and Waterman, C. M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323) :580–584. [8](#), [17](#)
- [Kapanidis et al., 2006] Kapanidis, A. N., Margeat, E., Ho, S. O., Kortkhonjia, E., Weiss, S., and Ebright, R. H. (2006). Initial transcription by rna polymerase proceeds through a dna-scrunching mechanism. *Science*, 314(5802) :1144–1147. [25](#), [31](#)
- [Kim et al., 2014] Kim, H., Abeyvirigunawardena, S. C., Chen, K., Mayerle, M., Ragunathan, K., Luthey-Schulten, Z., Ha, T., and Woodson, S. A. (2014). Protein-guided rna dynamics during early ribosome assembly. *Nature*, 506(7488) :334–338. [25](#)
- [Kolin and Wiseman, 2007] Kolin, D. L. and Wiseman, P. W. (2007). Advances in image correlation spectroscopy : measuring number densities, aggregation states, and dynamics of fluorescently labeled macromolecules in cells. *Cell biochemistry and biophysics*, 49(3) :141–164. [71](#)
- [Koushik et al., 2006] Koushik, S. V., Chen, H., Thaler, C., Puhl III, H. L., and Vogel, S. S. (2006). Cerulean, venus, and venusy67c fret reference standards. *Biophysical journal*, 91(12) :L99–L101. [40](#)
- [Kroon et al., 2017] Kroon, J., Heemskerk, N., Kalsbeek, M. J., de Waard, V., van Rijssel, J., and van Buul, J. D. (2017). Flow-induced endothelial cell alignment requires the rhogef trio as a scaffold protein to polarize active rac1 distribution. *Molecular biology of the cell*, 28(13) :1745–1753. [82](#), [83](#)
- [Lakowicz, 2013] Lakowicz, J. R. (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer science & business media. [8](#), [28](#)
- [Lawson and Ridley, 2018] Lawson, C. D. and Ridley, A. J. (2018). Rho gtpase signaling complexes in cell migration and invasion. *Journal of Cell Biology*, 217(2) :447–457. [16](#), [18](#), [20](#)
- [Lee et al., 2005] Lee, N. K., Kapanidis, A. N., Wang, Y., Michalet, X., Mukhopadhyay, J., Ebright, R. H., and Weiss, S. (2005). Accurate fret measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. *Biophysical journal*, 88(4) :2939–2953. [35](#)
- [Leray et al., 2013] Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Héliot, L., and Tramier, M. (2013). 827spatio-temporal quantification of fret in living cells by fast time-domain film : a comparative study of non-fitting methods. *PloS one*, 8(7) :e69335. [30](#)

- [Lerner et al., 2018] Lerner, E., Cordes, T., Ingargiola, A., Alhadid, Y., Chung, S., Michalet, X., and Weiss, S. (2018). Toward dynamic structural biology : Two decades of single-molecule Förster resonance energy transfer. *Science*, 359(6373) :eaa1133. 25
- [Lo et al., 2000] Lo, C.-M., Wang, H.-B., Dembo, M., and Wang, Y.-l. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*, 79(1) :144–152. 15
- [Machacek et al., 2009] Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G. L., Hahn, K. M., and Danuser, G. (2009). Coordination of rho gtpase activities during cell protrusion. *Nature*, 461(7260) :99. 8, 21, 71, 73, 78, 82, 84
- [Martin et al., 2016] Martin, K., Reimann, A., Fritz, R. D., Ryu, H., Jeon, N. L., and Pertz, O. (2016). Spatio-temporal co-ordination of rhoa, rac1 and cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics. *Scientific reports*, 6 :21901. 8, 21, 22, 57, 62, 74
- [Martin et al., 2014] Martin, K., Vilela, M., Jeon, N. L., Danuser, G., and Pertz, O. (2014). A growth factor-induced, spatially organizing cytoskeletal module enables rapid and persistent fibroblast migration. *Developmental cell*, 30(6) :701–716. 74, 106
- [Mihalcescu et al., 2015] Mihalcescu, I., Gateau, M. V.-M., Chelli, B., Pinel, C., and Ravanat, J.-L. (2015). Green autofluorescence, a double edged monitoring tool for bacterial growth and activity in micro-plates. *Physical biology*, 12(6) :066016. 98
- [Miyawaki et al., 1997] Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645) :882–887. 23
- [Müller et al., 2020] Müller, P. M., Rademacher, J., Bagshaw, R. D., Wortmann, C., Barth, C., van Unen, J., Alp, K. M., Giudice, G., Eccles, R. L., Heinrich, L. E., et al. (2020). Systems analysis of rhogef and rhogap regulatory proteins reveals spatially organized rac1 signalling from integrin adhesions. *Nature Cell Biology*, 22(4) :498–511. 22
- [Muschiellok et al., 2008] Muschiellok, A., Andrecka, J., Jawhari, A., Brückner, F., Cramer, P., and Michaelis, J. (2008). A nano-positioning system for macromolecular structural analysis. *Nature methods*, 5(11) :965. 25
- [Nobis et al., 2018] Nobis, M., Herrmann, D., Warren, S. C., Strathdee, D., Cox, T. R., Anderson, K. I., and Timpson, P. (2018). Shedding new light on rhoa signalling as a drug target in vivo using a novel rhoa-fret biosensor mouse. *Small GTPases*, pages 1–8. 26
- [Padilla-Parra et al., 2009] Padilla-Parra, S., Audugé, N., Lalucque, H., Mevel, J.-C., Coppey-Moisan, M., and Tramier, M. (2009). Quantitative comparison of different fluorescent protein couples for fast fret-flim acquisition. *Biophysical journal*, 97(8) :2368–2376. 30
- [Palmer et al., 2011] Palmer, A. E., Qin, Y., Park, J. G., and McCombs, J. E. (2011). Design and application of genetically encoded biosensors. *Trends in biotechnology*, 29(3) :144–152. 25
- [Palmer and Tsien, 2006] Palmer, A. E. and Tsien, R. Y. (2006). Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nature protocols*, 1(3) :1057–1065. 24

- [Parker et al., 2002] Parker, K. K., Brock, A. L., Brangwynne, C., Mannix, R. J., Wang, N., Ostuni, E., Geisse, N. A., Adams, J. C., Whitesides, G. M., and Ingber, D. E. (2002). Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *The FASEB journal*, 16(10) :1195–1204. [62](#)
- [Pertz, 2010] Pertz, O. (2010). Spatio-temporal rho gtpase signaling—where are we now? *J Cell Sci*, 123(11) :1841–1850. [21](#)
- [Pertz et al., 2006] Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L., and Hahn, K. M. (2006). Spatiotemporal dynamics of rhoa activity in migrating cells. *Nature*, 440(7087) :1069–1072. [8](#), [21](#)
- [Rizzuto et al., 1992] Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M., and Pozzan, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, 358(6384) :325–327. [23](#)
- [Rothenberg et al., 2018] Rothenberg, K. E., Scott, D. W., Christoforou, N., and Hoffman, B. D. (2018). Vinculin force-sensitive dynamics at focal adhesions enable effective directed cell migration. *Biophysical journal*, 114(7) :1680–1694. [17](#)
- [Saraste et al., 1990] Saraste, M., Sibbald, P. R., and Wittinghofer, A. (1990). The p-loop—a common motif in atp-and gtp-binding proteins. *Trends in biochemical sciences*, 15(11) :430–434. [18](#), [19](#)
- [Small et al., 2002] Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E., and Rottner, K. (2002). The lamellipodium : where motility begins. *Trends in cell biology*, 12(3) :112–120. [21](#)
- [Thaler et al., 2005] Thaler, C., Koushik, S. V., Blank, P. S., and Vogel, S. S. (2005). Quantitative multiphoton spectral imaging and its use for measuring resonance energy transfer. *Biophysical journal*, 89(4) :2736–2749. [40](#)
- [Théry et al., 2006] Théry, M., Pépin, A., Dressaire, E., Chen, Y., and Bornens, M. (2006). Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell motility and the cytoskeleton*, 63(6) :341–355. [62](#)
- [Timmerman et al., 2015] Timmerman, I., Heemskerk, N., Kroon, J., Schaefer, A., van Rijssel, J., Hoogenboezem, M., van Unen, J., Goedhart, J., Gadella, T. W., Yin, T., et al. (2015). A local ve-cadherin and trio-based signaling complex stabilizes endothelial junctions through rac1. *J Cell Sci*, 128(16) :3041–3054. [8](#), [23](#), [82](#)
- [Tsukada et al., 2008] Tsukada, Y., Aoki, K., Nakamura, T., Sakumura, Y., Matsuda, M., and Ishii, S. (2008). Quantification of local morphodynamics and local gtpase activity by edge evolution tracking. *PLoS computational biology*, 4(11) :e1000223. [79](#)
- [van der Walt et al., 2014] van der Walt, S., Schönberger, J. L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J. D., Yager, N., Goullart, E., Yu, T., and the scikit-image contributors (2014). scikit-image : image processing in Python. *PeerJ*, 2 :e453. [98](#)
- [Van Unen et al., 2015] Van Unen, J., Reinhard, N. R., Yin, T., Wu, Y. I., Postma, M., Gadella, T. W., and Goedhart, J. (2015). Plasma membrane restricted rhogef activity is sufficient for rhoa-mediated actin polymerization. *Scientific reports*, 5 :14693. [20](#)
- [Vilela et al., 2013] Vilela, M., Halidi, N., Besson, S., Elliott, H., Hahn, K., Tytell, J., and Danuser, G. (2013). Fluctuation analysis of activity biosensor images for the study of information flow in signaling pathways. In *Methods in enzymology*, volume 519, pages 253–276. Elsevier. [82](#)
- [Yamao et al., 2015] Yamao, M., Naoki, H., Kunida, K., Aoki, K., Matsuda, M., and Ishii, S. (2015). Distinct predictive performance of rac1 and cdc42 in cell migration. *Scientific reports*, 5 :17527. [21](#), [22](#), [79](#), [82](#)

- [Yang et al., 2016] Yang, H. W., Collins, S. R., and Meyer, T. (2016). Locally excitable cdc42 signals steer cells during chemotaxis. *Nature cell biology*, 18(2) :191. 15, 22
- [Youvan et al., 1997] Youvan, D. C., Coleman, W. J., Silva, C. M., Petersen, J., Bylina, E. J., and Yang, M. M. (1997). Fluorescence imaging micro-spectrophotometer (fims). *Biotechnology et alia*, 1 :1–16. 35
- [Zal and Gascoigne, 2004] Zal, T. and Gascoigne, N. R. (2004). Photobleaching-corrected fret efficiency imaging of live cells. *Biophysical journal*, 86(6) :3923–3939. 35, 67