



HAL
open science

Etude de l'adhésion de vésicules géantes et de cellules vivantes par nanoscopie de fluorescence

Marcelina Cardoso dos Santos

► **To cite this version:**

Marcelina Cardoso dos Santos. Etude de l'adhésion de vésicules géantes et de cellules vivantes par nanoscopie de fluorescence. Optique / photonique. Université de Technologie de Troyes, 2015. Français. NNT : 2015TROY0012 . tel-03359601

HAL Id: tel-03359601

<https://theses.hal.science/tel-03359601>

Submitted on 30 Sep 2021

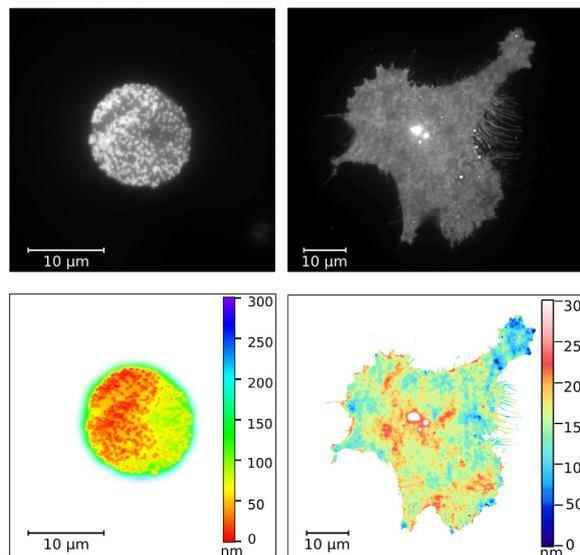
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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
de doctorat
de l'UTT

Marcelina CARDOSO DOS SANTOS

Etude de l'adhésion de vésicules géantes et de cellules vivantes par nanoscopie de fluorescence



Spécialité :
Optique et Nanotechnologies

2015TROY0012

Année 2015

THESE

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITE
DE TECHNOLOGIE DE TROYES
Spécialité : OPTIQUE ET NANOTECHNOLOGIES**

présentée et soutenue par

Marcelina CARDOSO DOS SANTOS

le 14 avril 2015

**Etude de l'adhésion de vésicules géantes et de cellules vivantes
par nanoscopie de fluorescence**

JURY

Mme M. DONTENWILL	DIRECTEUR DE RECHERCHE CNRS	Présidente
M. L. COGNET	DIRECTEUR DE RECHERCHE CNRS	Rapporteur
M. F. FLEURY	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	Examineur
M. R. JAFFIOL	MAITRE DE CONFERENCES	Directeur de thèse
M. L. LIMOZIN	CHARGE DE RECHERCHE CNRS - HDR	Rapporteur
M. H. MORJANI	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	Directeur de thèse
M. J.-P. RIEU	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	Examineur

Personnalité invitée

M. Cyrille VEZY	ENSEIGNANT CHERCHEUR
-----------------	----------------------

Remerciements

En premier lieu, je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Rodolphe Jaffiol pour la direction de ce travail de thèse. Ce fut une véritable chance de vous avoir comme "boss". Merci de m'avoir convaincue d'effectuer cette thèse et m'avoir fait confiance dès le début. J'admire toujours vos talents pédagogiques et votre passion contagieuse pour ce métier. Merci pour votre encadrement exceptionnel, tellement indispensable dans la réalisation d'une thèse expérimentale. Vos conseils et toutes les "pistes" que vous m'avez donnés m'ont permis de progresser rapidement et d'obtenir tous ces jolis résultats. Merci pour votre disponibilité et votre patience sans limites. Vous avez toujours trouvé le temps pour répondre à mes questions naïves de thésard. Je vous remercie pour votre soutien lors de la difficile période de rédaction (vous avez toujours su dédramatiser la situation et me remonter le moral) ainsi que votre profond engagement dans les corrections du manuscrit. Enfin un grand merci pour votre côté humain, typiquement de m'avoir souvent recueillie chez vous, de m'avoir nourrie et m'avoir gâtée avec les croissants le matin. Sachez que je quitte ce laboratoire avec un cœur très lourd.

Je remercie également mon co-directeur de thèse Hamid Morjani pour sa gentillesse et son expertise biologique. Merci de nous avoir approvisionnés systématiquement en cellules et échantillons biologiques. Je vous remercie aussi pour les corrections apportées au manuscrit de thèse.

J'ai eu la chance d'être également encadrée par Cyrille Vézy. Merci Cyrille pour ta constante disponibilité et tes conseils scientifiques et techniques. Tu m'as tout appris sur les vésicules mais surtout sur comment apprivoiser Igor... Ton talent pour développer les procédures m'a été indispensable. Merci pour tes encouragements pendant la rédaction, même si je ne souriais plus... Grâce à toi, j'ai fait de gros progrès en maîtrise de moi-même : je casse de moins en moins de verrerie et je m'énerve beaucoup moins (ce point nécessitera encore quelques améliorations), merci pour ta compréhension. Je n'oublierai jamais notre escapade à San Francisco, à côté d'un grand stress, nous avons eu de grands moments de rigolade ! Je suis honorée que tu fasses partie de mon jury de thèse.

Je remercie Pierre Jeannesson de m'avoir motivée à relever ce défi d'entreprendre une thèse à l'interface biophysique. Vous avez eu une excellente intuition pour ce sujet de recherche passionnant qui m'a permis de dépasser mes limites et de m'épanouir professionnellement.

Je remercie Régis pour ces talents en C++ et donc pour nous avoir développé un super logiciel pour ma manip'-chérie.

Au cours de cette thèse, j'ai eu la possibilité d'effectuer un peu d'enseignement. Ainsi, j'aimerais remercier Xavier pour ses nombreuses interventions pour m'aider à régler des problèmes techniques ou gérer les étudiants. Merci de m'avoir souvent prêté ton matériel et pour ta patience quand j'ai systématiquement oublié de te le rendre.

Je n'oublierai pas bien sûr la précieuse contribution de Delphine (et ses potes), apportée à la rédaction de ce manuscrit. Merci pour toutes les corrections d'orthographe et grammaire qui ont permises de le perfectionner. Merci pour toutes les longues journées de corrections dans ta véranda, accompagnées des éclats de rires. Merci d'avoir pris soin de moi et de m'avoir réconfortée dans cette période difficile. Puis merci pour la streptadivine que je sortirai certainement à ma soutenance.

Merci à tous mes amis doctorants et post-doctorants pour l'excellente ambiance pendant ces 3 années. Merci à ma merveilleuse collègue de bureau, Irenita, pour son inépuisable bonne humeur et ses encouragements. J'admire toujours ton immense indulgence envers tout le monde et ta générosité. Nos fous rires vont me manquer. Je ne citerai pas Irene sans son grand amour André. Merci André pour ta sincérité et pour ton sens de l'humour très aiguisé. Merci à tous les deux pour vos explications techniques concernant le domaine de la chimie et votre aide pour les manip. Je suis également reconnaissante pour vos précieuses corrections de mon manuscrit sur la chimie de surface. Je vous remercie aussi pour votre merveilleux accueil lors de notre voyage avec Doudou au Portugal. J'espère qu'avec les années, on ne se perdra pas de vue. Courage pour la suite, vous allez réussir à repartir en Espagne : "chacun a ce qu'il mérite" ! Ensuite, je tiens à remercier mon "cigarette-friend", Matthieu, pour nos innombrables pauses clopes dans le froid, sous la pluie mais aussi dernièrement au soleil. J'ai beaucoup apprécié nos délires et discussions qui portaient dans tous les sens. Merci de m'avoir écoutée quand j'ai ragé. Nos séances de sport m'ont beaucoup aidée, surtout le fait de gagner tout le temps au bad. Un grand merci pour ta précieuse aide informatique (latex, script et tout et tout). Courage pour la recherche d'un poste ! J'aimerais également remercier Elyn et Syrine pour leur sympathie et l'accès à leur super machine à café. J'ai beaucoup apprécié nos déconnades en salle de sport, inoubliable ! C'est bientôt à toi Elyn : courage pour la rédaction. Merci à Yassine, à Julie et à Julien pour votre amitié, votre bonne humeur et nos discussions métaphysiques autour des plateaux de resto U. Merci à Lina pour sa gentillesse, ses petits gâteaux et ses échantillons de QDots. Courage pour la suite de ta thèse. Je remercie enfin d'autres thésards du LNIO : Thomas, Sylvain, Samuel et également ceux qui sont déjà partis : Julien et Julie, pour leur grande sympathie et le transfert de connaissances.

J'exprime mes remerciements à Laurent Cagnet et Laurent Limozin d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs scientifiques ainsi que pour leurs commentaires constructifs sur ce manuscrit. Je suis également très honorée par la présence de Monique Dontenwill, Fabrice Fleury et de Jean-Paul Rieu dans mon jury de thèse.

Je n'oublie évidemment pas dans cette longue liste de remerciements mes parents et surtout mon petit frère. Merci d'avoir cru en moi et merci pour votre soutien moral. Je remercie également

ma merveilleuse belle-sœur Gracielle qui s'est toujours si bien occupée de moi en me préparant ses délicieux petits plats pour que je ne meure pas de faim pendant la rédaction. Merci à Jérôme pour sa bonne humeur et sa relecture de mon manuscrit et à mon petit Néné pour ses gros câlins pour reconforter sa tatie. Merci pour votre amitié, votre soutien et les grands moments de détente les samedis soirs. Enfin, du fond de mon cœur, j'adresse mes remerciements à mon Doudou. Tu es ma source d'inspiration et ma force. Tu m'as suivi dans ma décision de faire cette thèse et tu ne m'as jamais permis de baisser les bras. Merci pour ta patience, d'avoir supporté mes sauts d'humeur et pour ton amour inconditionnel, je t'aime très fort.

Table des matières

1	Adhésion et migration cellulaire	13
1.1	Description générale	13
1.1.1	Adhésion cellulaire	13
1.1.2	Migration aléatoire et dirigée	15
1.1.3	Description générale de la migration	16
1.2	Ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire : description biochimique	20
1.2.1	Intégrines : chef d'orchestre de la formation des points d'adhésion focaux	20
1.2.2	Rôle de la matrice extracellulaire	23
1.2.3	Systèmes de reconnaissance cellule-matrice	29
1.2.4	Rôle de la membrane plasmique	30
1.3	Adhésion en absence de la matrice extracellulaire	38
1.4	Etudes qualitatives de l'adhésion et la migration	39
1.4.1	Techniques utilisant la microscopie optique	40
1.4.2	Mesure de la force d'adhésion	44
2	Fluorescence et réflexion totale interne	49
2.1	Fluorescence	49
2.1.1	Etats électroniques d'une molécule fluorescente	49
2.1.2	Dynamique intramoléculaire	51
2.1.3	Sondes membranaires	53
2.1.4	Nanocristaux semi-conducteurs (Quantum dots)	57
2.2	Propriétés de l'émission d'une molécule à proximité d'une interface	58
2.2.1	Cas d'un ensemble de dipôles, perpendiculaires à l'interface	59

2.2.2	Cas d'un ensemble de dipôles orientés aléatoirement, parallèlement à l'interface	61
2.2.3	Diagrammes de rayonnement	62
2.2.4	Signal collecté par l'objectif	62
2.3	Epifluorescence	63
2.4	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy	65
2.4.1	Principe de la microscopie TIRF	65
2.4.2	Approche théorique	66
2.4.3	Exemples de montages TIRF	69
2.5	Mesures de la distance membrane-substrat par TIR	71
3	Dispositif expérimental TIRFM dédié à la mesure des distances membrane-substrat	75
3.1	Introduction	75
3.2	Montage expérimental	77
3.2.1	Mesure du waist du faisceau laser	78
3.2.2	Voie d'excitation	79
3.2.3	Voie de détection	82
3.2.4	Chambre d'observation	82
3.3	Calibration de l'angle d'incidence	83
3.3.1	Echantillon de calibration	83
3.3.2	Relation de grandissement entre α et θ	85
3.3.3	Détermination de θ	87
4	Etude de l'adhésion des vésicules par nTIRFM	93
4.1	Elaboration des vésicules géantes (Giant Unilamellar Vesicles)	93
4.1.1	Electroformation des vésicules	93
4.1.2	Composition des membranes phospholipidiques	94
4.2	Fonctionnalisation des lamelles de verre	96
4.2.1	Réalisation de surfaces chargées négativement	96
4.2.2	Réalisation de surfaces chargées positivement	98
4.2.3	Fonctionnalisation des surfaces avec des polyéthylènes glycols (PEG)	100

4.2.4	Fonctionnalisation des surfaces avec de la streptavidine	101
4.3	Caractérisation des surfaces par mesure d'angles de contact	102
4.3.1	Principe général de la mesure d'angles de contact	102
4.3.2	Mesure d'angles de contact	103
4.4	Mesure de la distance membrane-surface par TIRF normalisé (nTIRF)	105
4.4.1	Calcul de la distance membrane-interface (approche théorique)	106
4.4.2	Détermination de κ , γ et β	109
4.5	Analyse des images en TIRF et en épi-fluorescence	114
4.6	Détermination des distances membrane-surface	116
4.6.1	Adhésion non spécifique	116
4.6.2	Adhésion spécifique	119
4.6.3	Discussion	120
4.7	Simulations Monte Carlo	124
4.7.1	Simulations du signal de fluorescence	125
4.7.2	Influence du nombre d'itérations et de σ_F (ou $\delta F(t)$)	126
4.7.3	Influence du bruit de fond	127
4.7.4	Erreur absolue Δz_0	128
4.8	Conclusion	129
5	Etude de l'adhésion cellulaire par VA-TIRFM	131
5.1	Introduction	131
5.2	Modèles cellulaires	132
5.3	Fonctionnalisation des lamelles de verre	134
5.3.1	Réalisation de surfaces chargées négativement	134
5.3.2	Surface chargée positivement (poly-L-lysine)	135
5.3.3	Fonctionnalisation des surfaces pour l'adhésion spécifique	135
5.4	Caractérisation des surfaces	136
5.5	Mesure de la distance membrane-surface par VA-TIRF	138
5.5.1	Calcul de la distance membrane-surface (approche théorique)	138
5.5.2	Approche expérimentale	140
5.5.3	Détermination de κ et γ	143

5.5.4	Vérification dans le cas où $z_0=0$	147
5.6	Adhésion cellulaire	147
5.6.1	Adhésion non spécifique	147
5.6.2	Adhésion spécifique	151
5.7	Simulations Monte Carlo	157
5.7.1	Simulation du signal de fluorescence	157
5.7.2	Influence du nombre d'itérations et de σ_F	157
5.7.3	Erreur absolue Δz_0	159
5.8	Conclusion	160
Références bibliographiques		167

Introduction

Aujourd'hui, la microscopie optique reste un outil incontournable en sciences, notamment en biologie. Grâce à elle, il est possible de visualiser l'organisation tissulaire et cellulaire et même de suivre en dynamique le déplacement de biomolécules individuelles. Ces performances sont notamment réalisables en raison des progrès récents des composants optiques comme les objectifs de grande ouverture numérique ($ON > 1.4$) et les caméras sensibles (efficacité quantique $> 90\%$). Les enjeux de la biologie contemporaine nécessitent plus que jamais de s'affranchir de la limite de diffraction qui fixe le pouvoir de résolution en microscopie optique à $\frac{\lambda}{2ON}$ (théorie de Ernst Abbe, 1873). Depuis un peu plus de 20 ans, on sait contourner cette limite physique par différentes approches, dont les plus performantes utilisent les propriétés remarquables des molécules fluorescentes. Ainsi, la nanoscopie de fluorescence regroupe les techniques qui repoussent la limite de résolution en microscopie optique, à l'échelle nanométrique. Ces nouvelles approches ont été récompensées par le prix Nobel de chimie en 2014 [1]. Dans cette perspective, la microscopie TIRF (pour Total Internal Reflection Fluorescence) se place comme l'un des outils les plus pertinents pour observer la membrane plasmique des cellules vivantes. Le but de mon travail de thèse a été de développer des outils de nanoscopie de fluorescence, basés sur la microscopie TIRF dont l'objectif est d'étudier l'adhésion cellulaire.

La microscopie TIRF a été proposée pour la première fois à l'imagerie cellulaire au début des années 80 par D. Axelrod. Ce dernier a énormément contribué à populariser cette technique dans le domaine de la biologie [2, 3]. La microscopie TIRF a connu un regain d'intérêt à la fin des années 90, lorsqu'il a été proposé d'accomplir la réflexion totale à l'aide d'un objectif à l'huile de grande ouverture numérique. En effet, les premiers dispositifs utilisaient des prismes qui rendaient les conditions de travail très délicates. La première tâche de mon travail de thèse a consisté à mettre en place un microscope TIRF basé sur l'utilisation d'un objectif dédié, d'ouverture numérique $ON = 1.45$. Dans ces conditions, les ondes évanescentes qui résultent de la réflexion totale interne sont localisées au niveau de l'interface avec l'échantillon. Le même objectif peut alors être utilisé pour collecter le signal de fluorescence produit par les molécules excitées par l'onde évanescente. Cette double fonction assurée par l'objectif facilite beaucoup le développement d'un montage TIRF. La mise en place d'un dispositif TIRF a été initiée au laboratoire avec le commencement de ma thèse. En une année, nous avons réussi à finaliser un premier montage qui m'a permis d'initier une

série d'études sur l'adhésion de vésicules géantes. A l'issue de ce premier travail, nous avons fait évoluer le dispositif pour l'adapter à l'analyse de l'adhésion de cellules vivantes. Les approches, qui seront présentées dans mon manuscrit, m'ont permis d'étudier la topographie d'une membrane en adhésion sur une surface avec une résolution axiale d'environ 10-20 nm. Il est important de souligner qu'il existe peu de méthodes qui possèdent un tel pouvoir de résolution. A titre d'exemple, on peut citer la microscopie RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy) très largement utilisée pour étudier l'adhésion de vésicules lipidiques.

Nous pensons qu'à l'aide des techniques que nous avons développées, il est envisageable d'extraire de nouvelles informations pertinentes pour mieux comprendre le processus d'adhésion cellulaire, par exemple lorsqu'une cellule est déposée sur une surface recouverte de protéines de la matrice extracellulaire (MEC). A l'heure actuelle, la façon dont s'organise la membrane de la cellule sur les composants de la MEC, est encore mal connue. L'évaluation de ce processus sur certains polymères ou sur certaines séquences RGD, a été réalisée en TIRF par J. S. Burmeister et collaborateurs [4]. Néanmoins, ces études ont besoin d'être approfondies sur d'autres protéines telles que le collagène ou la fibronectine. Une telle contribution pourrait améliorer la compréhension du processus d'adhésion ou de migration de cellules cancéreuses sur la MEC. Il serait alors possible d'étudier le comportement adhésif des cellules en réponse à un traitement anticancéreux, par exemple un antagoniste des récepteurs membranaires (intégrines) [5].

Ce manuscrit s'organise en cinq chapitres. Dans un premier chapitre je présenterai le contexte scientifique lié à l'étude du phénomène d'adhésion et migration cellulaire. Je détaillerai d'une part le rôle de la matrice extracellulaire dans le processus d'adhésion et d'autre part, je décrirai la contribution de la membrane plasmique au processus d'adhésion. Enfin, j'exposerai les différentes techniques qui permettent d'étudier l'adhésion cellulaire. Dans le chapitre 2, je développerai le principe de la microscopie de fluorescence, en décrivant le phénomène de fluorescence et les propriétés d'émission des molécules au voisinage d'une interface. Je développerai ensuite le principe de la microscopie TIRF, d'un point de vue théorique et expérimental. Dans le chapitre 3, je détaillerai le dispositif expérimental que j'ai mis en place, ainsi que la phase de calibration de l'angle d'incidence du faisceau laser sur l'échantillon. Le chapitre 4 sera dédié à l'adhésion de vésicules géantes sur différentes surfaces fonctionnalisées de façon à produire une adhésion spécifique et non spécifique. Le chapitre 5 traitera de l'étude de l'adhésion cellulaire. Pour extraire une information précise sur le degré d'adhésion d'une vésicule ou d'une cellule, nous avons choisi de mesurer les distances qui séparent la membrane du substrat. En conséquence, dans ces deux derniers chapitres, je présenterai d'un point de vue théorique les méthodes que nous avons mise en œuvre pour déterminer les distances membrane/substrat.

Chapitre 1

Adhésion et migration cellulaire

Pour rédiger ce chapitre, je me suis référée en grande partie aux informations contenues dans l'ouvrage "Molecular Biology of the Cell" de B. Alberts et al. [6].

1.1 Description générale

1.1.1 Adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est un processus très complexe qui mobilise la participation de divers acteurs comme le cytosquelette ou la membrane plasmique, via différentes voies de signalisation. L'adhésion d'une cellule sur une surface se caractérise par un étalement et un aplatissement plus ou moins important de cette dernière. Les premières observations du processus d'adhésion ont été réalisées à l'aide d'un microscope à contraste de phase. A l'origine, le phénomène a été décrit et schématisé d'un point de vue morphologique, par Taylor dans les années 60 [7]. Depuis, la description de l'adhésion s'est beaucoup enrichie. Actuellement, elle est décrite en trois phases [8]. Dans des conditions *in vitro*, une fois remise en suspension dans son milieu de culture, la cellule se dépose progressivement sur la surface du substrat. Lors de la première phase d'adhésion, la cellule prend l'aspect d'une sphère "bourgeonnante" et forme une petite zone uniforme d'adhésion avec la surface (figure 1.1 A), recouverte ou non de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (collagène, fibronectine, laminine, etc.). Ensuite, la membrane plasmique en contact avec la surface subit des déformations par les filaments d'actine (figure 1.1 B). La dernière étape conduit à l'étalement de la cellule grâce à l'expansion d'un ou plusieurs lamellipodes (figure 1.1 C). Les lamellipodes correspondent à de larges protrusions qui occupent une surface importante de la cellule, comme celui observé sur l'image de la figure 1.2. Ils se forment lors de la polarisation cellulaire et déterminent la direction future de migration. Ce type de prolongement membranaire sera abordé plus en détails lors de la description du processus de la migration cellulaire. Dans ce premier chapitre, je ne vais décrire que les aspects "biomécaniques" de l'adhésion.

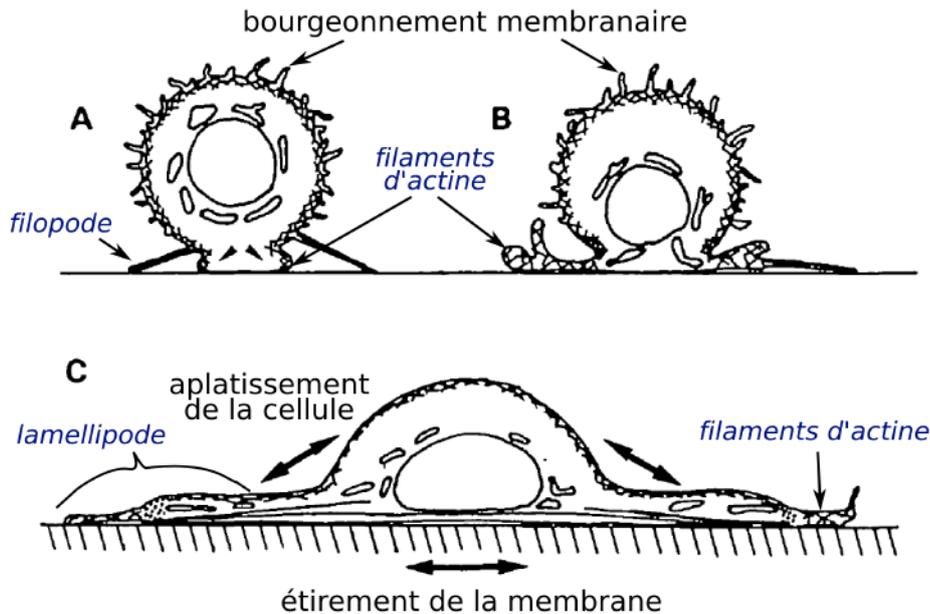


FIGURE 1.1 – Processus de l'adhésion d'une cellule vivante : (A) attachement de la cellule à la surface par une petite zone d'adhésion ; (B) déploiement des prolongements membranaires et formation d'un réseau d'actine aux bords des prolongements ; (C) étalement de la cellule grâce à la création de lamellipodes et la polymérisation des filaments d'actine. Le schéma est extrait des travaux de Bereiter-Hahn [8].

La première phase du processus d'adhésion ne semble pas exiger d'apport en énergie pour permettre l'ancrage de la cellule à la surface. En revanche, durant les phases suivantes, un fort besoin énergétique se fait ressentir, en particulier lors de la formation des filaments d'actine que l'on retrouve au niveau des prolongements membranaires. Les filaments d'actine, aux côtés des filaments intermédiaires et des microtubules, forment le cytosquelette. La cellule construit le cytosquelette par polymérisation d'une grande quantité de macromolécules (actines, keratines, tubulines...) présentes dans le cytoplasme. De cette façon, les cellules peuvent contrôler leur organisation spatiale par un assemblage et désassemblage rapide des composants du cytosquelette. Le rôle du cytosquelette est multiple. Par exemple, les microtubules déterminent l'organisation des organites et servent de support pour le trafic intracellulaire.

D'un point de vue mécanique, au moment où la cellule rencontre le substrat, elle explore son environnement grâce à des filopodes. Les filopodes sont les protrusions membranaires les plus fines. Ils peuvent être extrêmement longs et atteindre une longueur de $\sim 10 \mu\text{m}$, donnant un aspect tentaculaire à la cellule 1.2, figure 1.2. On leur attribue alors une fonction sensorielle et de sélection du site d'adhésion. Le bourgeonnement cellulaire à la proximité de la surface résulte d'une part de la différence de pression osmotique plus élevée à l'intérieur de la cellule [9], et d'autre part d'un affaiblissement de la structure du cytosquelette [10]. Les contractions cellulaires, régulées par le

flux ionique, propulsent d'importantes quantités de cytoplasme, provoquant l'apparition de prolongements membranaires au contact du substrat. Durant cette étape, le noyau est transféré vers la partie ventrale de la cellule (figure 1.1 B). Ensuite, le cytoplasme progresse et étend de plus en plus la membrane plasmique, provoquant ainsi l'aplatissement de la cellule (figure 1.1 C). Un anneau excentrique de filaments d'actine se forme afin d'éviter que les organites ne se retrouvent au niveau des prolongements de la membrane. Les mitochondries s'organisent autour de l'anneau d'actine, d'où la nécessité d'apport énergétique pour la polymérisation des filaments d'actine. A la fin du processus, la cellule forme des points d'ancrage avec la surface, aux extrémités des filaments d'actine, appelés "contacts focaux d'adhésion". On peut considérer ces contacts focaux comme la conséquence de la tension exercée par la cellule sur le substrat. Les filaments d'actine sont alignés parallèlement à la surface membranaire, le long de la partie ventrale de la cellule (i.e. côté substrat) : ils stabilisent l'étalement de la cellule en lui permettant par la suite de se contracter et d'effectuer un déplacement sur la surface.

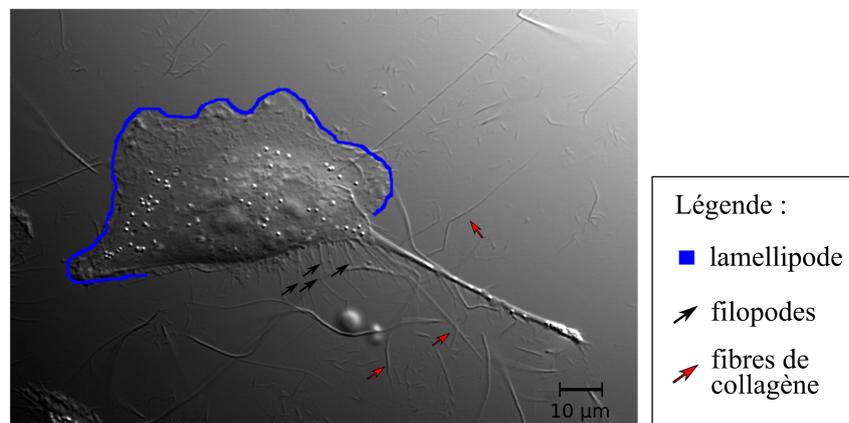


FIGURE 1.2 – Formation de prolongements membranaires dans le cas d'une cellule MDA MB 231. Il s'agit d'une image en contraste interférentiel différentiel (DIC) de la cellule en train de migrer sur une couche de collagène de type I (c'est-à-dire d'une couche très aérée d'une épaisseur d'environ 40 nm). L'observation a été réalisée à l'aide d'un objectif à immersion de grande ouverture numérique (ON=1.45 ; x60) à 37°C.

1.1.2 Migration aléatoire et dirigée

Les contours d'une cellule se déforment de manière importante au cours de son déplacement. Ces paramètres morphologiques constituent d'ailleurs une signature précise d'un type cellulaire sur un substrat donné. Les cellules qui ont la morphologie d'une sphère bourgeonnante (lymphocytes, macrophages et certaines cellules cancéreuses), se déplacent en adhérant faiblement, accrochant le corps de la cellule à la surface à l'aide de nombreux filopodes. Ce type de migration est nommé migration "amiboïde" car ses caractéristiques ont été établies à travers l'étude d'une amibe (*Dictyostelium*)

[11]. A l'opposé, les cellules hautement étalées, comme les cellules endothéliales ou les fibroblastes, progressent suivant un déplacement de type mésenchymateux caractérisé par une adhésion forte avec de nombreux contacts focaux. En réalité, il existe un large éventail de profils migratoires compris entre ces deux cas extrêmes.

Une migration aléatoire est observée lorsque les cellules sont soumises à une stimulation intrinsèque, par exemple sous l'effet d'un facteur dit motogénique, comme le facteur de croissance PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Lorsque ce facteur est présent en forte concentration dans le milieu, il active, via des récepteurs membranaires, la motilité cellulaire, cependant sans détermination précise quant à la direction de migration. On observe alors un mouvement aléatoire des cellules [12]. Une migration dirigée extrinsèque peut se produire lorsque la cellule est exposée à un gradient de concentration du même facteur motogénique, présent dans le microenvironnement. Dans ce cas, les cellules se déplacent par chimiotaxie, c'est-à-dire qu'elles orientent leur déplacement dans la direction du gradient volumique de concentration. Elles peuvent également être attirées par des nutriments, un facteur de croissance ou encore être repoussées par la présence de substances toxiques dans leur milieu. L'haptotaxie est un autre mode de propagation cellulaire induit par un gradient de protéines matricielles d'adhésion fixées sur une surface. Un tel gradient peut apparaître lors d'un processus de cicatrisation, d'angiogenèse (formation de vaisseaux sanguins) [13], ou encore dans des cas pathologiques telle la néoangiogenèse tumorale (vascularisation d'une tumeur). Un autre type de tactisme est la durotaxie [14] qui correspond à la réponse cellulaire aux stimuli mécaniques issus d'interaction cellule-microenvironnement. La rigidité du substrat, la topographie ou la composition protéique de la MEC peuvent forcer la cellule à modifier son comportement migratoire. Inversement, comme nous le verrons par la suite, la cellule est également capable de faire évoluer son environnement en exerçant différentes forces sur la matrice au cours de la migration [15].

1.1.3 Description générale de la migration

Dans les cellules eucaryotes, quasiment toute la mobilité cellulaire se réalise par progression de la partie ventrale. Afin que la migration soit efficace, la cellule développe une morphologie asymétrique, présentant un front de migration du côté où elle va se déplacer et une partie arrière de rétractation (figure 1.3 A). Les caractéristiques de la migration ont été initialement étudiées sur les fibroblastes et les keratinocytes [16],[17]. D'après ces études, la migration cellulaire sur un substrat peut être résumée en quatre étapes :

1. une polarisation de la cellule (figure 1.3 A),
2. l'apparition de protrusions à l'avant de la cellule qui implique la propagation d'un front de migration et l'extension d'un lamellipode (figure 1.3 B),
3. une translocation du noyau lorsque tout le contenu cytoplasmique est propulsé vers l'avant (figure 1.3 C),

4. une rétraction durant laquelle la partie arrière de la cellule se contracte et tout le contenu cytoplasmique est propulsé vers l'avant (figure 1.3 D).

La polarisation résulte d'une communication entre le cytosquelette d'actine et le réseau de microtubules. Dans la plupart des cellules dites "*rampantes*", la position du centre de nucléation des microtubules (aussi appelé centrosome) est guidée par le cytosquelette d'actine vers les prolongements membranaires [18]. En conséquence, le centrosome se trouve entre le front de migration naissant et le noyau (figure 1.3). L'emplacement du centrosome permet alors de déterminer la direction de la migration [19]. La croissance des microtubules influence aussi indirectement l'adhésion de la cellule via l'activation des protéines qui vont permettre la polymérisation de l'actine.

La deuxième étape de la migration repose sur la formation d'une protrusion. De nombreux points d'adhésion apparaissent alors à l'avant de la cellule (figure 1.3 B). Ils font office de point d'ancrage aux extrémités du cytosquelette afin de tracter la cellule. Ces points d'adhésion sont majoritairement localisés au niveau des protrusions de la cellule. Il existe des types de protrusion variés et leur organisation dépend de différents paramètres comme par exemple le type cellulaire ou le substrat sur lequel la cellule adhère. Ainsi, une protrusion peut prendre la forme d'un filopode (croissance en 1D) ou d'un lamellipode (croissance en 2D) comme mentionné auparavant, ou encore de pseudopode (croissance en 3D) [20]. Chacune de ces trois structures est caractérisée par une organisation spatiale des filaments d'actine différente. Ces derniers baignent dans une fine couche de cytoplasme, dépourvue d'organites, où ils sont englobés par la membrane plasmique. Les filopodes sont les prolongements les plus fins et les plus longs. Ils sont constitués de longs filaments d'actine qui peuvent croître indéfiniment. Plusieurs noms ont été attribués auparavant à ces structures tels que les microextensions, les microfibrilles, les projections "*finger-like*" ou les pieds. Finalement, le terme filopode (i.e. pied en fil) a été retenu. Les extensions membranaires ont un diamètre typique d'environ 200 nm, et peuvent mesurer entre 10 et 100 μm de long. Elles jouent un rôle important, en particulier dans la phase d'étalement cellulaire, pour accrocher le corps cellulaire à la surface.

L'étape suivante concerne l'extension de la membrane, dans le but de former un plus large prolongement membranaire appelé lamellipode. Ce dernier est considéré comme un moteur tractant le corps cellulaire. Le lamellipode se constitue d'un réseau complexe de filaments d'actine liés orthogonalement les uns aux autres et agencés parallèlement à la surface. Les pseudopodes sont les plus épais des prolongements membranaires. Ils s'étendent en trois dimensions. Ils sont constitués d'un réseau tridimensionnel de filaments d'actine. Le cytoplasme passe d'un état fluide à gel pour permettre au réseau d'actine de polymériser et dépolymériser au fur et à mesure que la cellule migre. Les filopodes et les lamellipodes peuvent être observés dans de nombreux types cellulaires telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales. Au cours de mon travail de thèse, je me suis focalisée sur l'étude de la migration des cellules cancéreuses. Leur schéma de migration est celui décrit dans la figure 1.3. Au cours de la migration, elles adoptent une forme de type "*teardrop*" en déployant de larges lamellipodes au niveau du front de migration et étendant de nombreux filopodes vers le substrat.

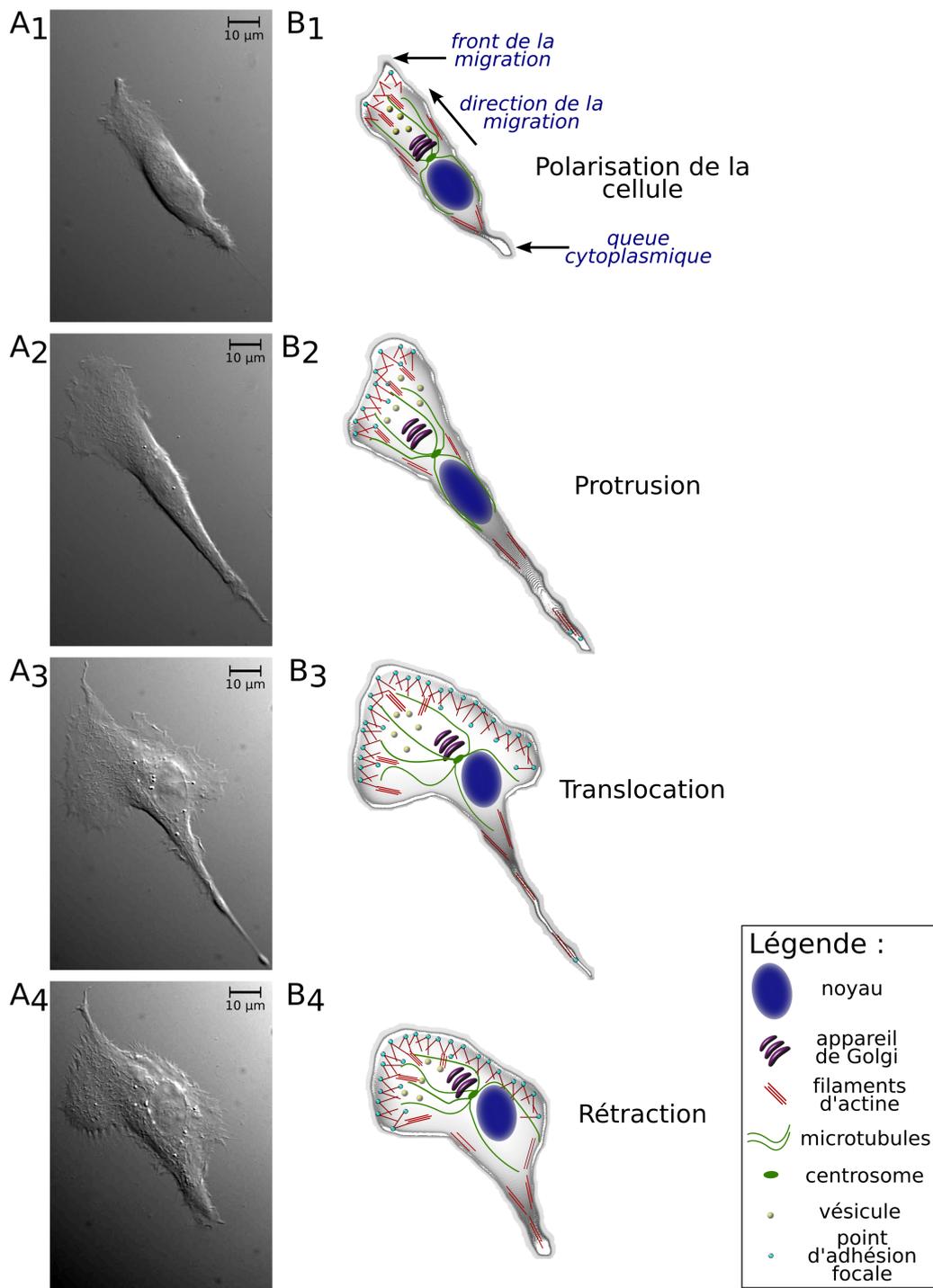


FIGURE 1.3 – Illustration des différentes étapes de la migration d’une cellule. Les images A_i montrent l’évolution de la morphologie d’une cellule HT1080 (fibrosarcome humain) au cours du temps à t_0 (A_1), $t_0 + 20$ mn (A_2), $t_0 + 50$ mn (A_3) et $t_0 + 60$ mn (A_4). (B_i) A droite de chaque image optique, je représente la position de différents composants de la cellule au cours du déplacement. La migration de cette cellule a été enregistrée sur verre dans son milieu de culture à 37°C, à l’aide d’un objectif de grandissement 60x, d’ouverture numérique 1.45, en microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC).

Le maintien d'un mouvement unidirectionnel au cours du déplacement de la cellule est la conséquence de l'activation de différents processus moléculaires. Le processus d'extension de la membrane pour former des protrusions est typiquement étudié de deux façons. Certains travaux de recherche sont axés sur l'importance des filaments d'actine [21]. D'autres s'intéressent d'avantage à la réorganisation de la membrane à l'extrémité du lamellipode [22]. La génération des protrusions est actuellement décrite comme un processus dépendant de l'activité du réseau d'actine. La polymérisation des filaments d'actine est localisée sur le pourtour du front de progression (figure 1.4). La croissance des filaments à cet endroit permet de pousser la membrane plasmique vers l'avant. Au cours de la progression du lamellipode, on assiste à une polymérisation à l'avant et une dépolymérisation des filaments à l'arrière du front de migration (figure 1.4).

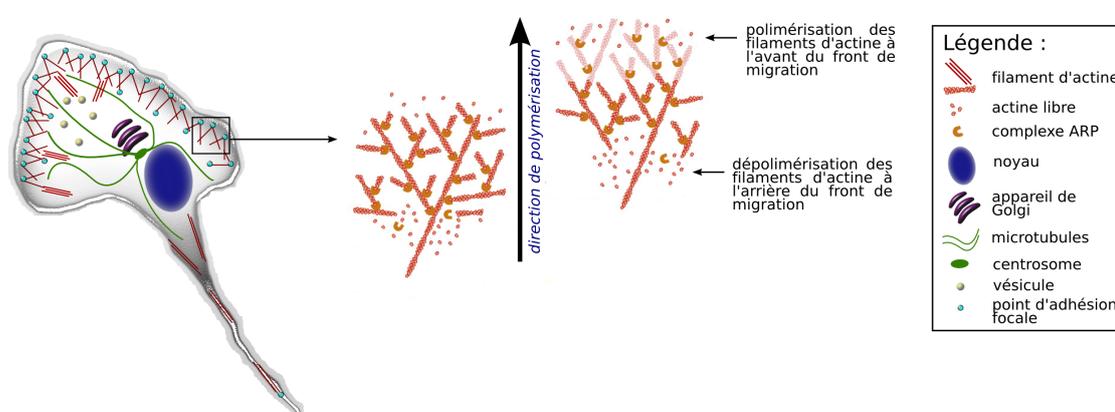


FIGURE 1.4 – Mécanisme de polymérisation du réseau d'actine lors de la génération des protrusions : la polymérisation des filaments d'actine s'effectue à l'avant du front de migration. Au fur et à mesure que la cellule déploie son lamellipode, les filaments dépolymérisent à l'arrière du front et l'actine libre se polymérise de nouveau à l'avant.

Une théorie alternative favorise le phénomène d'exocytose qui jouerait un rôle majeur dans le déplacement de la cellule vers l'avant. Un modèle qui illustre l'extension de la membrane via ce mécanisme a été proposé par Bretscher [22]. La membrane plasmique serait alors réorganisée à la fois par des mécanismes d'exocytose et d'endocytose afin d'augmenter le front de migration. La circulation de vésicules à l'intérieur de la cellule, le long des microtubules, provoquerait un flux de lipides du front avant vers l'arrière de la cellule, propulsant ainsi la membrane vers l'avant. De telles vésicules sont visibles sur les images DIC de la figure 1.3.

Lorsque le lamellipode est bien établi, la cellule a besoin de s'accrocher au substrat en générant des contacts focaux. La stabilisation des contacts focaux renforce l'attachement de la cellule au substrat et réduit la vitesse de migration, alors que l'affaiblissement de la force d'adhésion accélère la migration (dans une certaine mesure) [23], [24]. Les sites d'adhésion, dont je vais développer

la structure dans le paragraphe suivant (paragraphe 1.2), ont pour fonction l'ancrage de la cellule à la surface et participent également à la translocation du corps cellulaire. L'action combinée de l'actine et la myosine permet de générer une force de traction. A la fonction des filaments s'ajoute la contraction du cytosquelette d'actine qui tire l'arrière de la cellule en affaiblissant les anciens sites d'adhésion. La rétractation de la partie arrière de la cellule commence par un relâchement total des sites d'ancrage à la surface. En conséquence, le cytosquelette qui a tiré un long et très fin prolongement membranaire (appelé la queue cytoplasmique, figure 1.3) est à présent dépolymérisé. Les microtubules à l'arrière de la cellule sont extrêmement dynamiques, ce qui permet un remodelage rapide afin de rétracter la queue. Les microtubules jouent un rôle primordial dans cette étape car leur inhibition provoque la défaillance dans la rétractation de la queue cytoplasmique et une perte de la directionnalité de la migration [25].

1.2 Ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire : description biochimique

Dans des conditions physiologiques, les cellules ne se déplacent pas simplement sur une surface plane mais migrent en trois dimensions dans la matrice extracellulaire (MEC), avec laquelle elles interagissent en permanence. Dans ces conditions, la cellule produit *in vivo* une force sur son microenvironnement. De plus, les constituants de la MEC (par exemple les fibres de collagène) exercent une contre réaction sur les forces appliquées par la cellule. Les conditions physiologiques sont extrêmement difficiles à reproduire en laboratoire. Néanmoins, l'étude de l'adhésion et de la migration sur les surfaces qui miment les constituants de la MEC présente de nombreux intérêts, tant du point de vue fondamental, qu'appliqué. Il peut s'agir par exemple d'évaluer les effets de molécules inhibitrices de l'adhésion et/ou de la migration en cancérologie, ou bien de comprendre l'influence des molécules de la MEC sur l'adhésion cellulaire.

1.2.1 Intégrines : chef d'orchestre de la formation des points d'adhésion focaux

L'adhésion d'une cellule à la MEC repose sur la formation de liaisons biochimiques entre les composants de la MEC et les récepteurs transmembranaires. Pour se lier efficacement à la MEC, ces récepteurs transmembranaires s'organisent tout d'abord pour former des points discrets d'adhésion. Ces premières structures sont ensuite stabilisées par d'autres composants que l'on peut qualifier d'architecturaux à l'échelle globale de la cellule, comme le cytosquelette d'actine. A la suite de leurs liaisons aux filaments d'actine, ces points discrets deviennent des points d'adhésion focaux ou plaques d'adhésion focales. A travers ces points d'adhésion, un certain nombre de récepteurs membranaires sont capables de relayer divers signaux liés au comportement migratoire de la cellule. Bien que les cellules expriment à la surface de la membrane différentes sortes de récepteurs d'adhésion tels que les cadherines, les proteoglycanes, etc., les plus étudiées à ce jour sont les intégrines.

Les intégrines constituent une grande famille de protéines transmembranaires. Elles possèdent de remarquables capacités d'activation des voies de signalisation dans deux directions (on parle de signalisation bidirectionnelle). D'une part, en se liant aux intégrines, les composants de la MEC peuvent activer des voies de signalisation intracellulaires. D'autre part, les conditions intracellulaires peuvent initialiser des voies de signalisation vers l'extérieur pour contrôler l'adhésion à la matrice.

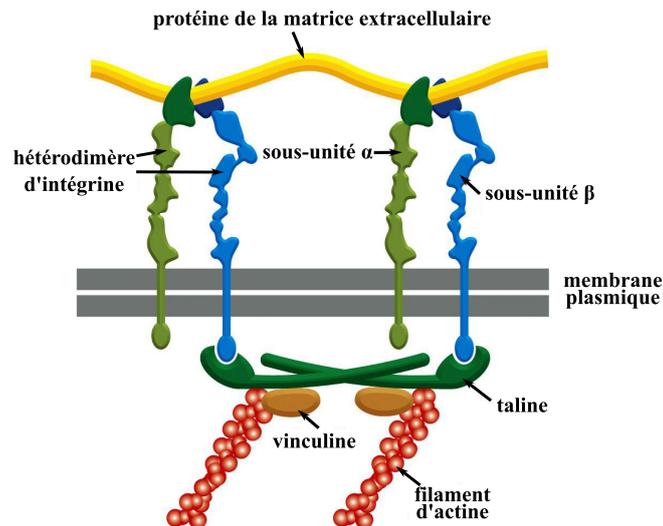


FIGURE 1.5 – Structure d'un hétérodimère d'intégrine lié à une protéine de la MEC : les intégrines, lorsqu'elles sont activées, sont composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Leur partie extracellulaire forme une liaison avec les composants de la matrice extracellulaire, la partie intracellulaire se fixe quant à elle sur un complexe protéique relié au cytosquelette d'actine [6].

Les intégrines sont composées de deux sous unités distinctes : α et β . Les sous-unités α et β se lient de façon non covalente pour former un hétérodimère (figure 1.5). La partie extracellulaire reconnaît des séquences peptidiques spécifiques présentes sur les protéines de la MEC. Du côté intracellulaire, les intégrines recrutent un complexe de nombreuses protéines intracellulaires impliquées dans la régulation de l'organisation du cytosquelette (figure 1.5). L'ensemble de toutes les protéines impliquées dans la génération d'un contact focal forme l'adhésome. De nombreuses études récentes cherchent à décrire la composition protéique des adhésomes. Elles démontrent que les protéines sont recrutées dans un ordre chronologique bien précis au cours de la formation de cette structure [26]. Elles permettent également de comprendre les interactions moléculaires entre les différents acteurs des points d'adhésion focaux [27].

Afin de contrôler la force d'adhésion, et indirectement influencer la vitesse de migration de la cellule, les complexes focaux doivent être en constante réorganisation spatiotemporelle. La liaison des intégrines avec leur ligand matriciel est à l'origine d'une régulation allostérique de la conformation de

l'hétérodimère. Les sites de liaison avec la MEC des sous unités α et β possèdent deux conformations : l'une fermée sans affinité pour le ligand, et l'autre ouverte qui permet une liaison vers la séquence de haute affinité sur la protéine matricielle. La liaison des intégrines avec leur ligand induit un changement de conformation au niveau des domaines cytoplasmiques. Les domaines intracellulaires des sous-unités α et β s'exposent à d'autres sites de liaison. La sous-unité β reconnaît par exemple la taline [28]. L'accrochage de cette protéine provoque une cascade d'assemblage d'autres protéines, formant ainsi le complexe d'adhésion qui se liera au cytosquelette via les filaments d'actine (figure 1.6) [28].

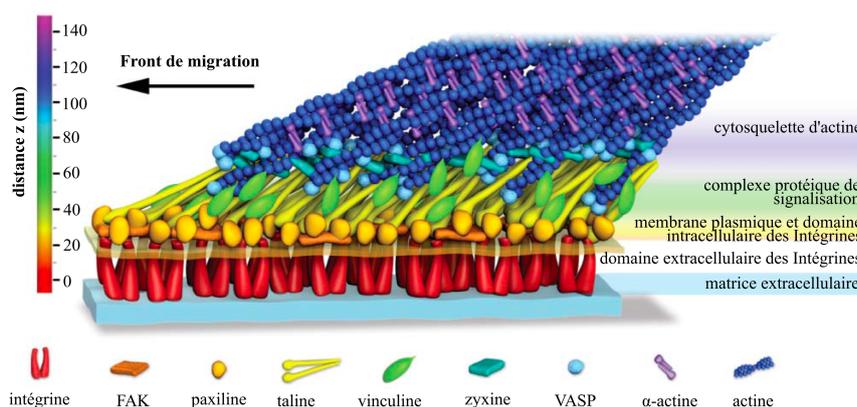


FIGURE 1.6 – Organisation des protéines au niveau d'un point d'adhésion focal tel que décrit par Kanchanawong [28]. Les protéines qui participent à la formation d'un point d'adhésion focal, forment un réseau complexe reliant les composants de la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine. Les protéines participant au complexe d'adhésion sont entre autres les intégrines, les paxilines, les talines, les vinculines, aidées par d'autres protéines régulatrices du complexe (la FAK, VASP).

Ce type d'interaction, qui débute par une reconnaissance du ligand extracellulaire et intégrant la fonction du cytosquelette par la suite, est connu sous le nom d'activation "*outside-in*" (d'extérieur vers l'intérieur). L'enchaînement des événements peut également se produire dans le sens inverse, notamment via une activation "*inside-out*" (de l'intérieur vers l'extérieur). Par exemple, l'association de la sous-unité β de l'hétérodimère avec la taline active différentes voies de signalisation intracellulaire dont le but est, entre autres, de renforcer les liens avec la MEC. Grâce à cette exceptionnelle propriété de contrôle de l'adhésion dédiée aux intégrines, les points focaux sont qualifiés de complexes d'adhésion "*integrin-based*". L'activation d'un seul hétérodimère d'intégrine a en revanche peu d'impact au sens physiologique car, comparée aux autres récepteurs transmembranaires, les intégrines ont une très faible affinité pour leurs ligands (constante de dissociation (K_d) de l'ordre de $1 \mu\text{M}$ contre un $K_d \sim 1 \text{ nM}$ pour les protéines G [29], [30]). Cependant, elles se distinguent par leur niveau d'expression à la surface de la membrane plasmique. En d'autres termes, elles peuvent être exprimées en quantité 100 fois plus importante que les autres récepteurs. La force de l'adhésion est alors uniquement induite par le regroupement des intégrines (figure 1.7). Cette force d'adhésion a

pu être quantifiée pour une liaison unique (~ 50 pN) et pour un point d'adhésion (≤ 700 pN) [31].

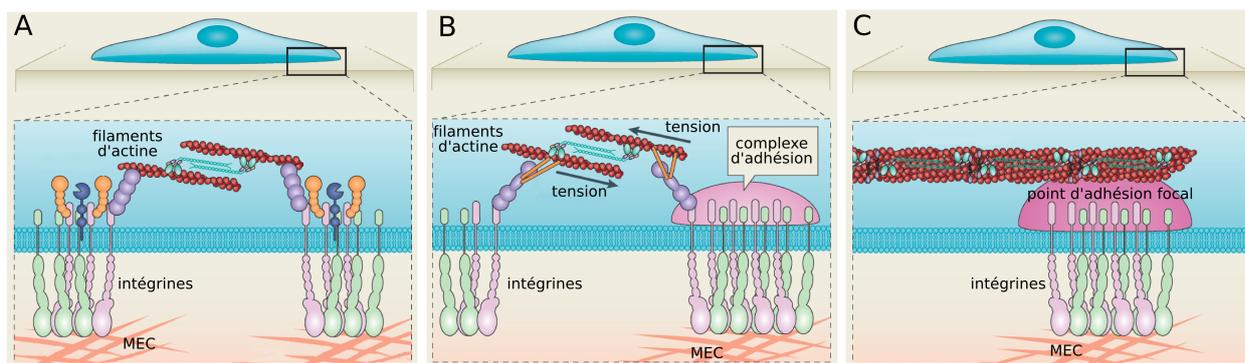


FIGURE 1.7 – Formation d'un point d'adhésion focal. (A) Liaison intégrine-MEC, (B) renforcement de l'adhésion (C) maturation d'un point d'adhésion focal [32].

En résumé, la formation des points d'adhésion focaux joue un rôle essentiel dans les processus d'adhésion et de migration. Grâce aux différentes voies de signalisation, les contacts focaux contrôlent activement le comportement migratoire des cellules. Ils ont donc également un impact sur la prolifération ou la survie cellulaire. Les cascades de signalisation intracellulaire qui gouvernent la prolifération et la survie cellulaires sont très complexes. C'est pourquoi elles nécessitent généralement l'activation de différents récepteurs. Les intégrines en font partie.

1.2.2 Rôle de la matrice extracellulaire

Nous avons vu précédemment que les cellules sont capables d'explorer leur environnement via les intégrines, tout du moins en ce qui concerne sa nature biochimique. Parce que certaines intégrines sont spécifiques à des ligands particuliers, elles permettent à la cellule d'adapter son comportement à son microenvironnement. *In vivo*, les cellules se développent entourées par un environnement composé de cellules, de facteurs solubles (cytokines, facteurs de croissance, etc.) et de protéines organisées (fibronectine, collagène, etc.). On parle de matrice extracellulaire (MEC). Son rôle est d'organiser l'architecture physique des tissus, tout en soutenant les cellules. Cependant, des études récentes ont montré que la réponse cellulaire n'est pas uniquement générée par la composition biochimique de son environnement mais intègre divers paramètres physiques et topographiques comme l'organisation spatiale des protéines matricielles en termes de densité, d'état fibrillaire et d'orientation [33, 34].

La composition de la MEC est extrêmement variée d'un tissu à l'autre. On peut toutefois distinguer deux catégories de matrice selon les fonctions qu'elles exercent. Dans les tissus conjonctifs denses ou adipeux, la MEC est fluide et les cellules sont dispersées dans la matrice. Le tissu conjonctif a un rôle de protection et de soutien dans ce cas. Il est donc très riche en diverses molécules

fibrillaires qui supportent le stress mécanique auquel le tissu est exposé. A l'opposé, dans une matrice très compacte comme le tissu épithélial, les cellules sont serrées les unes contre les autres et forment un feuillet couvert par un dense tapis de protéines matricielles appelé "lame basale". Dans ces différents tissus, la MEC diffère en composition et en quantité de macromolécules, de même que du point de vue de son organisation spatiale. Décrit de cette façon, on pourrait imaginer la MEC comme un simple échafaudage qui soutient les cellules. Aussi, elle joue un rôle de régulation sur des fonctions cellulaires telles que la migration, la prolifération et la survie cellulaires.

Tous les composants de la MEC sont susceptibles d'être synthétisés et renouvelés localement par quasiment tous les types cellulaires. Les cellules spécialisées dans la production des composants de la matrice dans le tissu conjonctif sont les fibroblastes. On peut distinguer les composants de la MEC en deux grandes classes de macromolécules : les glycosaminoglycanes (GAGs) et les protéines matricielles (collagènes, fibronectine, laminine, vitronectine, fibrinogène, élastine). Les GAGs sont de longs polymères de polysaccharides qui combleraient l'espace intracellulaire. Les protéines de la MEC, comme les collagènes, structurent la matrice et régulent de nombreux processus cellulaires grâce à leurs séquences peptidiques spécifiques aux récepteurs membranaires. Les progrès récents dans la conception de microenvironnements artificiels ont révélé l'importance des protéines matricielles dans le comportement cellulaire [35]. Dans mon étude, j'ai également mis en place des modèles 2D de microenvironnement grâce à la fonctionnalisation de surface, à l'aide du collagène de type IV et de fibronectine. Dans la suite de ce chapitre, je vais me focaliser sur les deux types de protéines, les plus répandues dans la MEC, qui interagissent avec les cellules grâce à leurs relations avec les intégrines ($\alpha_2\beta_1$ pour le collagène IV et $\alpha_5\beta_1$ pour la fibronectine).

A Le collagène

Le collagène a été décrit au XIX^e siècle comme étant une "colle" naturelle. Son nom provient notamment du grec *kolla* qui signifie colle et *gen* qui signifie produire. Le collagène ne constitue pas un type de protéine. On parle plutôt d'une "superfamille", de protéines caractérisée par une grande diversité en termes de structure moléculaire, de fonction ou d'organisation tissulaire. Environ quarante gènes codent pour les différentes sous-unités des collagènes. L'association de ces sous-unités donne naissance à de nombreux isotypes exprimés en fonction du type tissulaire. On distingue les collagènes fibrillaires (type I, II, III, V, XI) ; les collagènes associés aux fibrilles (type IX, XII) ; les collagènes en réseaux (type IV, VII) ou collagènes transmembranaires "*protein-like*" (type XVII, XVIII). Malgré les différentes conformations qu'elles peuvent adopter, toutes les protéines de cette famille partagent une caractéristique structurale commune. Une protéine appartient à la "superfamille" des collagènes lorsqu'elle possède un domaine en triple hélice. Cette structure tertiaire est constituée de l'association de trois chaînes polypeptidiques, identifiée par le sigle α . Les chaînes s'enroulent les unes autour des autres, formant ainsi une triple hélice (figure 1.8). Les acides aminés importants dans la structure de cette triple hélice sont la proline et la glycine. La proline stabilise les

chaînes polypeptidiques entre elles grâce à la répulsion entre les cycles pyrrolidines. La glycine, étant un petit acide aminé, permet quant à elle de compacter la structure en évitant le chevauchement des autres résidus entre eux. Les résidus lysine permettent d'établir des liaisons croisées entre les triples hélices afin de former une fibrille de collagène.

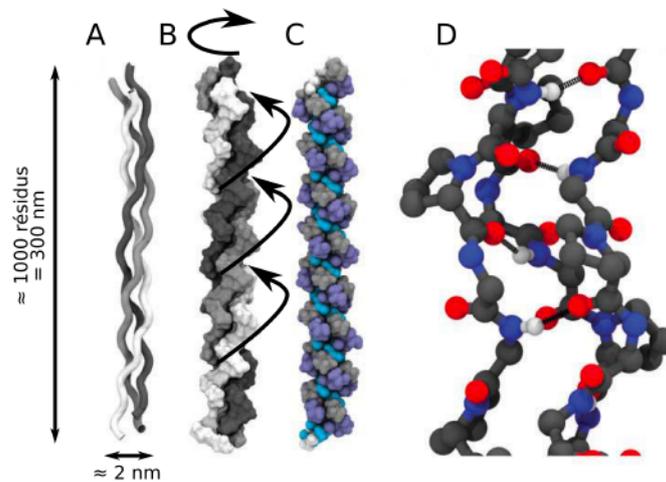


FIGURE 1.8 – Structure d'une triple hélice de collagène [36]. (A) et (B) Organisation du collagène caractérisée par une structure en triple hélice droite formée par l'assemblage de trois hélices gauches. (C) Organisation spatiale des acides aminés où chaque hélice est constituée de la répétition successive des triplets (Gly-X-Y)_n où Gly est une glycine (turquoise). X est la plupart du temps une proline (violet) et Y une hydroxyproline (gris). (D) Interactions des glycines à l'intérieur de la triple hélice : formation des liaisons hydrogènes entre l'azote (bleu), l'hydrogène (blanc) et l'oxygène (rouge).

Les chaînes polypeptidiques de collagène sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique sous forme de chaînes pro- α (figure 1.9, étape 1). Elles possèdent une courte séquence appelée propeptide sur leurs extrémités C et N terminales afin d'éviter l'aggrégation à l'intérieur de la cellule. Dans le réticulum endoplasmique, le collagène subit une série de modifications post-traductionnelles. Certaines prolines et lysines sont hydroxylées. Par la suite, les hydroxylysines peuvent être glycosylées (figure 1.9, étapes 2 et 3). Ainsi, les trois chaînes pro- α peuvent s'associer pour former une triple hélice (figure 1.9, étape 4) du type de celle de la (figure 1.8). En effet, les groupements hydroxyles des acides aminés sont destinés à former des liaisons hydrogènes entre les chaînes, empêchant la dissociation des chaînes. Ensuite, la triple hélice est sécrétée par exocytose dans le milieu extracellulaire et les propeptides subissent immédiatement une protéolyse par les enzymes de la MEC. Les molécules peuvent alors s'assembler grâce aux liaisons croisées en structures beaucoup plus volumineuses nommées *fibrilles* (figure 1.9, étape 8), mesurant entre 10 et 300 nm de diamètre et atteignant plusieurs microns de longueur. Les fibrilles commencent leur assemblage à proximité de la cellule, souvent dans des invaginations de la membrane plasmique. Les fibrilles de collagène peuvent s'aligner les unes contre les autres de façon à former de plus importantes structures, que l'on nomme

les *fibres* (figure 1.9, étape 9).

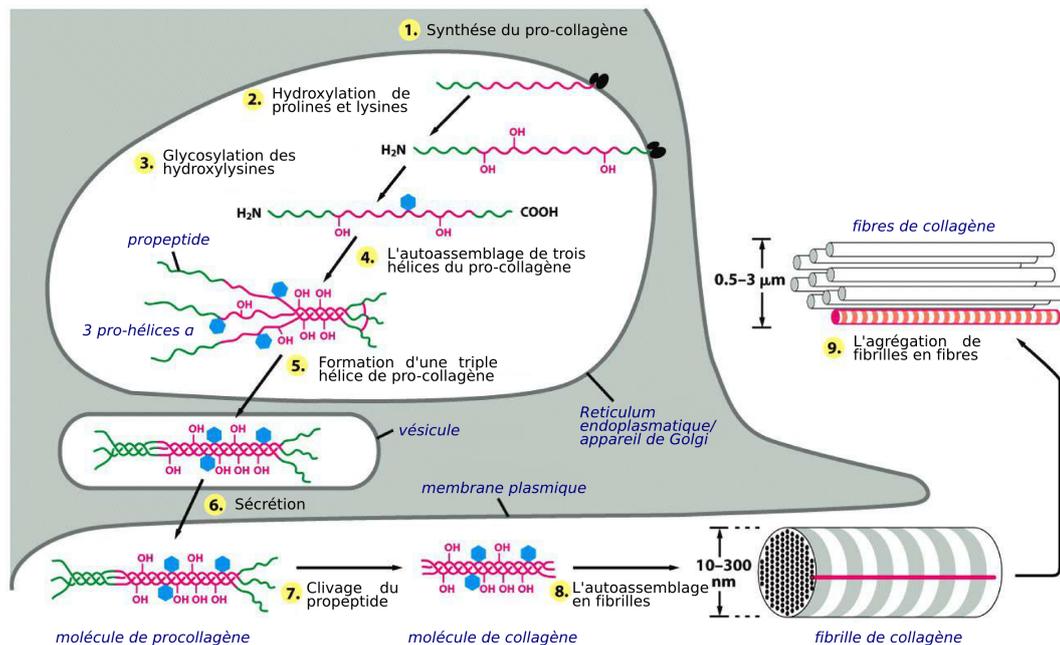


FIGURE 1.9 – Mécanisme intra et extracellulaire de formation des fibrilles de collagène. Un premier assemblage d'une structure tertiaire en triple hélice a lieu dans le milieu intracellulaire. La formation des fibrilles et fibres est un processus extracellulaire, à proximité de la membrane plasmique. Cette figure est extraite de la référence [6].

In vivo les fibrilles s'arrangent de façon très hétérogène. Ceci est à l'origine de la régulation de l'organisation de la matrice par les cellules, qui produisent d'autres sortes de macromolécules matricielles qui à leur tour modèlent l'arrangement des fibrilles de collagène. Lorsque la cellule développe des zones de contact avec les fibrilles, son cytosquelette se contracte et influence l'architecture du tissu conjonctif. Il a été observé que des fibroblastes mis au contact d'un gel constitué de fibrilles de collagène orientées aléatoirement, sont capables d'organiser la matrice en exerçant les mêmes forces que celles utilisées pour le mécanisme de migration [37], [38]. Il semblerait même que les fibroblastes s'alignent le long d'axes préférentiels, définis par l'orientation des plus grosses fibres [37]. Les cellules peuvent exercer ensuite une force de traction dans le sens de leur polarisation afin d'orienter toute la matrice dans cette direction. Dans les conditions *in vitro*, lorsque des explants musculaires sont co-cultivés avec des fibroblastes, cette tension exercée sur la matrice par les cellules permet d'étirer les explants, provoquant ainsi la formation d'un pseudomuscle [37]. Ce mécanisme d'organisation de la matrice désigné par les termes *structuration tractionnelle* et semble être à l'origine de la structuration de certains tissus *in vivo* tels que les muscles, les tendons ou les ligaments.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés au collagène de type IV, le collagène le plus utilisé dans les études d'adhésion. On retrouve ce type de collagène majoritairement au sein des lames

basales. Le collagène de type IV est connu pour s'organiser en réseaux. Il possède pour cela des domaines globulaires à l'une de ses extrémités. Ces domaines permettent l'autoassemblage entre ses monomères ou alors avec le collagène de type VII (figure 1.10). Le rôle du collagène de type IV est de stabiliser la lame basale à l'aide des nombreuses liaisons covalentes qu'il forme avec d'autres molécules comme la laminine ou le nidogène.

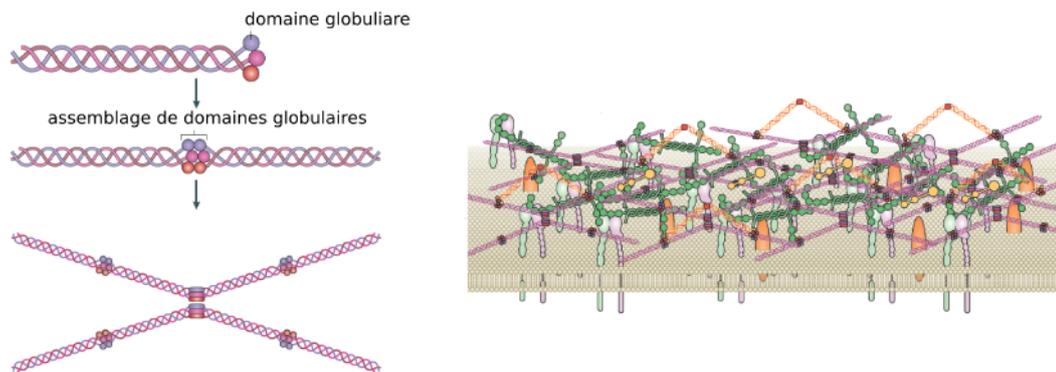


FIGURE 1.10 – (A) L'assemblage de monomères de collagène de type IV. (B) Réseau de collagène au sein de la lame basale [39].

B La fibronectine

Comme le collagène, la fibronectine occupe une place importante parmi les protéines de la MEC. Elle est codée par un seul gène (*Fn1*) qui donne naissance à une diversité de protéines via les modifications transcriptionnelles. La fibronectine existe sous deux formes : une forme soluble dans le sang (la fibronectine plasmatique FNp) et une forme insoluble dite globulaire dans la MEC (la fibronectine cellulaire FNc). La fibronectine plasmatique est synthétisée par les hépatocytes, tandis que la fibronectine matricielle est produite essentiellement par les fibroblastes.

Comme de nombreuses protéines matricielles (laminine, tenascine, etc.), la structure de la fibronectine est une série de petits modules répétitifs (figure 1.11A). Ces modules sont organisés en domaines fonctionnels, qui contiennent les sites de liaison avec d'autres protéines de la MEC, d'autres ligands solubles et les récepteurs membranaires (figure 1.11B). Il existe trois types de modules répétitifs, chacun ayant une fonction spécifique (FNI, FNII, FNIII). Ces modules ont tous une organisation commune en feuillets β qui assure la compacité de la protéine. Un des modules le plus intéressant, qui participe aux liaisons avec les cellules, est caractérisé par une forme en sandwich composée de feuillets β antiparallèles (figure 1.11B). La séquence tripeptidique RGD (arginine-glycine-acide aspartique), présente sur ce module, possède des récepteurs spécifiques à la surface de la membrane plasmique, comme certaines intégrines. Une des caractéristiques spécifiques de la fibronectine est son pouvoir de dimériser. Cette dimérisation a lieu dans le réticulum endoplasmique via la création de deux ponts disulfures entre les extrémités C terminales (carboxyle) de deux molécules.

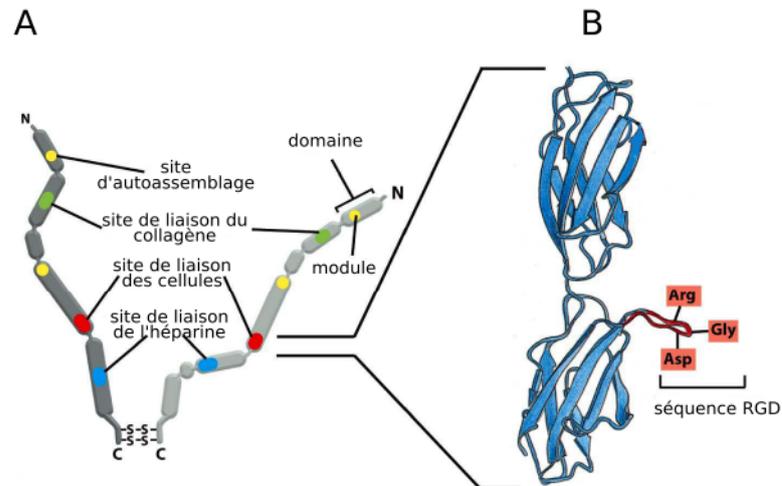


FIGURE 1.11 – Structure d'un dimère de fibronectine. (A) Deux chaînes polypeptidiques reliées par deux ponts disulfures dans leur terminaison carboxyle. Chaque sous-domaine contient un module de liaison spécifique pour d'autres protéines de la MEC ou récepteurs membranaires. (B) Illustration d'une structure tertiaire en feuillets β d'un sous-domaine. En rouge, deux séquences responsables des interactions avec les cellules [6].

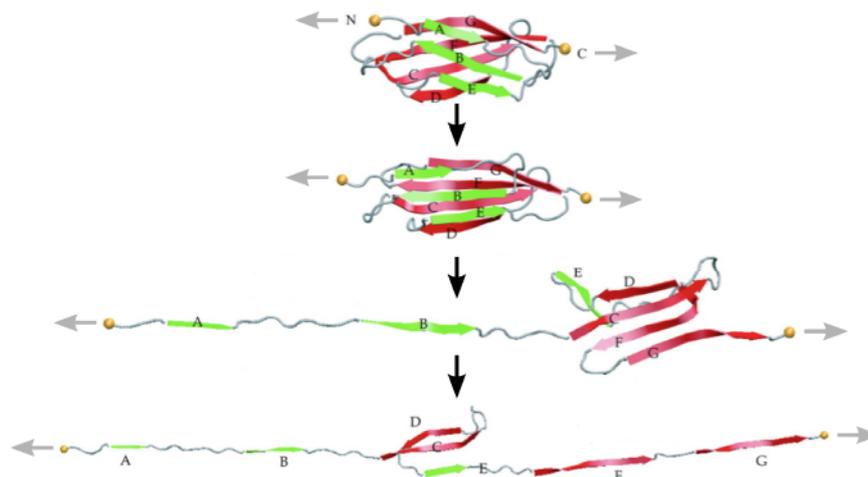


FIGURE 1.12 – Processus de déroulement de la fibronectine dans la MEC proposé par Gao et Craig [40]. La tension exercée par le cytosquelette d'actine sur la protéine provoque l'étirement des feuillets β . Les extrémités C et N terminales sont déroulées dans des sens opposés, exposant divers sites des liaisons pour d'autres protéines matricielles ou pour les récepteurs membranaires.

La polymérisation de la fibronectine a lieu à la surface de la membrane plasmique qui semble dé-

pendre de l'activité des intégrines. Les cellules qui déposent la fibronectine dans la MEC expriment les intégrines qui convertissent la fibronectine globulaire en fibrillaire. Au final, les sites spécifiques d'interaction avec la cellule sont exposés et la cellule peut commencer à former les contacts focaux au niveau de ces sites. Par analogie avec l'organisation des fibrilles de collagène, la cellule exerce une tension via son cytosquelette, qui induit l'étirement de la structure de la fibronectine (déroulement des feuillets β), exposant les sites de liaison et permettant aux dimères de s'associer entre eux (polymérisation figure 1.12). Le recrutement de nombreux dimères aboutit à la formation d'une longue fibre. De plus, les cellules hématopoïétiques du sang sont constamment exposées à la fibronectine plasmatique circulante. Lorsqu'un tissu subit une blessure, les cellules hématopoïétiques sont recrutées sur ce site. Les signaux de la réponse immunitaire activent les intégrines surfaciques des cellules et permettent la fibrillation de la fibronectine soluble en fibrillaire au bon endroit et au bon moment. Cependant, la dérégulation de ce processus a pour conséquence l'implication de la FNp dans l'athérosclérose [41], la thrombose [42] ou le cancer [43].

1.2.3 Systèmes de reconnaissance cellule-matrice

Dans les paragraphes précédents, j'ai abordé l'importance de la formation des contacts focaux ainsi que le rôle de la matrice extracellulaire dans l'adhésion et la migration cellulaire. Afin de mieux comprendre le comportement cellulaire dans les conditions qui miment son environnement *in vivo*, il est nécessaire de décrire le contexte bio-chimique de reconnaissance entre les cellules et les protéines de la MEC.

Un grand nombre de protéines matricielles, comme la fibronectine et le collagène, possèdent une courte séquence peptidique composée de trois acides aminés : arginine, glycine et acide aspartique. Cette séquence, souvent abrégée par l'acronyme RGD, constitue un site de reconnaissance spécifique avec les récepteurs membranaires comme les intégrines. La séquence RGD a été découverte dans la fibronectine par Pierschbacher et Ruoslahti en 1984 [44], puis observée dans de nombreuses protéines matricielles [45]. Cette reconnaissance cellule-matrice peut être reproduite à l'aide d'un petit peptide synthétique contenant la séquence RGD. Les séquences RGD peuvent être utilisées de deux façons différentes, soit pour stimuler, soit pour inhiber l'adhésion [45]. Lorsqu'elles sont immobilisées sur une surface, elles miment le microenvironnement permettant alors à la cellule d'adhérer au support. Lorsqu'elles sont en solution, elles inhibent l'adhésion, en entrant en compétition avec les protéines matricielles présentes sur la surface. Les séquences RGD sont de parfaites candidates pour comprendre le fonctionnement du processus d'adhésion dans diverses conditions physiologiques et pathologiques. Le développement de nouveaux peptides antagonistes (molécule interagissant avec un récepteur membranaire inhibant son activité), inspirés par les propriétés de la séquence RGD sont actuellement étudiés dans les traitements des nombreuses maladies, notamment le cancer [46]. D'autres travaux menés sur des molécules non peptidiques sont utilisés pour une fonction antagoniste dirigée contre les intégrines [5, 47].

Le rôle des séquences RGD dans la reconnaissance cellulaire a été initialement attribué au récepteur de la fibronectine : l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. A l'heure actuelle on sait que 12 des 24 intégrines connues, sont capables de reconnaître cette séquence. Or, la conformation de la séquence RGD est également importante dans la reconnaissance finale ligand-récepteur. Par exemple, la séquence RGD de la fibronectine forme un coude hautement flexible, qui possède une haute affinité pour l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (figure 1.11 B), alors que de petits fragments comportant cette séquence se lient de préférence à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [48]. La reconnaissance d'une cellule avec une molécule de collagène est différente. Par exemple, l'intégrine $\alpha_1\beta_1$ reconnaît de préférence la configuration RD (arginine-acide aspartique), au lieu de la séquence classique RGD au niveau de la triple hélice du collagène de type I [49]. Ce même type de collagène est également connu pour interagir avec l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, grâce à la séquence GER [50].

1.2.4 Rôle de la membrane plasmique

A Les caractéristiques d'une membrane lipidique

Une vue transversale de l'environnement membranaire au niveau des points d'adhésion focaux montre une organisation sur plusieurs niveaux (figure 1.6). Le premier est formé par les protéines de la MEC. Le second contient les intégrines. Ces protéines étant transmembranaires, on peut considérer que le troisième niveau correspond à la membrane plasmique. En dernier lieu, arrive le réseau de protéines du cytosquelette qui est complexé aux intégrines. A l'heure actuelle, la majeure partie des recherches sur l'adhésion se focalise sur le fonctionnement biochimique de l'adhésome [26, 51, 28]. D'autres études soulignent l'importance du cytosquelette [14] ou des microtubules [25]. Malheureusement, très peu de travaux s'intéressent au rôle de la membrane plasmique et à l'influence de sa micro-organisation dans le processus d'adhésion. Un bilan de toutes les découvertes dans le domaine des membranes, commençant par les études de la perméabilité membranaire et aboutissant actuellement sur la compréhension du fonctionnement des domaines membranaires, a été réalisé par Eididin [52].

A l'opposé des protéines membranaires telles les intégrines, les lipides membranaires (phospholipides, cholestérol et sphingolipides) semblent jouer un rôle banal au sein de la membrane. Cette vision est cependant injuste : en s'associant, les lipides sont capables de contrôler l'activité de protéines transmembranaires, le fonctionnement des canaux ioniques, etc. Les compositions lipidiques des membranes des différents organites et celle de la membrane plasmique ne sont pas identiques. Ainsi, on sait que la membrane plasmique est hautement enrichie en cholestérol et glycosphingolipides, alors que ces composants sont peu présents dans la membrane du réticulum endoplasmique [53]. Malgré toutes ces différences de composition, il est possible de mettre en avant une structure générale à toutes les membranes. Elles s'auto-assemblent en une bicouche lipidique, d'une épaisseur typique de quelques nanomètres. Cette structure a été évoquée pour la première fois à la fin des années soixante par Stoeckenius et Engelman [54]. Les lipides les plus abondants qui composent

les membranes sont les phospholipides. Ils sont de nature amphiphile. En d'autres termes, ils comprennent une partie hydrophobe (la queue de la molécule) et une partie hydrophile (la tête). La partie hydrophobe est constituée de deux longues chaînes carbonées. La composition de la partie hydrophile varie d'un type de phospholipide à l'autre. Des exemples de phospholipides sont présentés sur la figure 1.13. La queue phospholipidique est le plus souvent formée d'acides gras qui peuvent être insaturés (possède une ou plusieurs double liaisons sur la chaîne) ou saturés (sans double liaison). La famille des phospholipides se subdivise en deux sous-familles : les sphingomyélines et les phosphoglycérides. Ces derniers sont les plus répandus et sont souvent utilisés dans la formation des modèles membranaires tels que les vésicules lipidiques géantes ou les bicouches lipidiques supportées. Le modèle membranaire que j'ai développé au cours de ma thèse s'inspire de la composition physiologique des membranes. Ces membranes modèles ont une composition très simplifiée. Elles sont composées de trois types des phosphoglycérides, combinant différents acides gras avec des têtes polaires de type phosphatidylcholine (DOPC – dioléoylphosphatidylcholine) et phosphatidylethanolamine (DOPE - dioléoylphosphatidyléthanolamine ou DSPE – distearoylphosphatidyléthanolamine), figure 1.13.

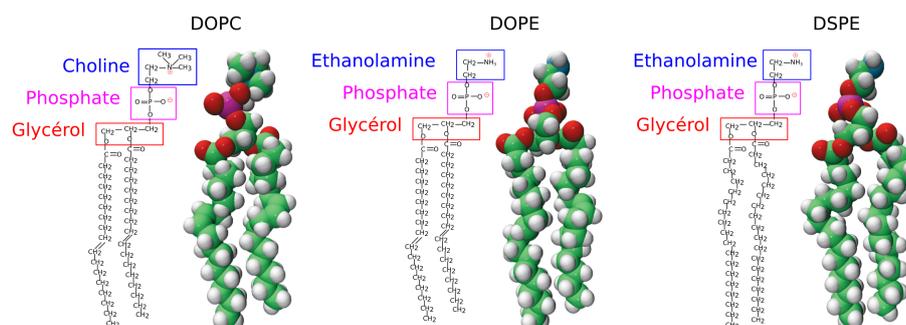


FIGURE 1.13 – Représentations schématiques de trois phospholipides : la phosphatidylcholine DOPC et les phosphatidylethanolamines DOPE et DSPE (Avanti Polar Lipids).

La nature amphiphile des phospholipides provoque leur auto-assemblage dans l'eau. Ainsi, en fonction de leur structure et leur concentration, les lipides peuvent former soit des micelles, dans le cas de phospholipides de forme conique (figure 1.14 A), soit des liposomes, pour des phospholipides de forme cylindrique (figure 1.14 B). Ces molécules amphiphiles s'organisent de façon à masquer leur partie hydrophobe à l'intérieur de la structure, tout en exposant les têtes hydrophiles au contact de l'eau (figure 1.14). Ces deux agencements (liposomes et micelles) correspondent aux conformations les plus favorables en termes d'énergie. Lorsque la bicouche d'un liposome subit une lésion, l'eau pénètre à l'intérieur de celui-ci et crée une conformation énergétiquement défavorable. Les phospholipides ont alors tendance à réarranger la bicouche afin de refermer le pore. Des liposomes peuvent fusionner et former une vésicule de plus grand diamètre. Quand le diamètre est supérieur à quelques micromètres, on parle de vésicules géantes lipidiques (GUV "Giant Unilamellar Vesicles"). Quelles que soient leurs tailles, les vésicules lipidiques ont une forme sphérique en solution, tout à

fait similaire à la morphologie globulaire des cellules vivantes en suspension.

En plus d'avoir un rôle de compartimentation, les membranes biologiques sont également impliquées dans les processus de trafic et de régulation de l'activité de différentes protéines. L'une des caractéristiques essentielles de la membrane plasmique est sa fluidité. Afin de caractériser la fluidité et la perméabilité de la membrane plasmique, de nombreuses techniques ont été développées dans le but de mesurer le mouvement de certains composants de la membrane comme les phospholipides ou des protéines. Citons à titre d'exemple la FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), la FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) et le SMT (Single Molecule Tracking). Le défi de ces mesures est d'arriver à observer localement sur la membrane des événements se produisant à une courte échelle de temps, typiquement entre 0.1 et 100 ms. Par exemple, il est possible de suivre la diffusion des protéines individuelles dans la membrane, en les marquant à l'aide d'une sonde fluorescente [55, 56]. Les études sur les cellules vivantes et les bicouches lipidiques ont montré, que la diffusion des lipides est un phénomène rapide de l'ordre de 1-10 ms, caractérisé par un coefficient de diffusion, typique de $\sim 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [57, 58, 59]. Les phospholipides peuvent également diffuser transversalement, d'un feuillet à l'autre de la membrane. Ce phénomène est connu sous le nom de "*flip-flop*" et est lui aussi relativement rapide, typiquement de l'ordre de 10-20 ms (mesuré dans les vésicules géantes [60]). Pour accélérer le processus au sein des membranes cellulaires, certaines enzymes telles que les flipases sont chargées d'induire un "*flip-flop*" actif.

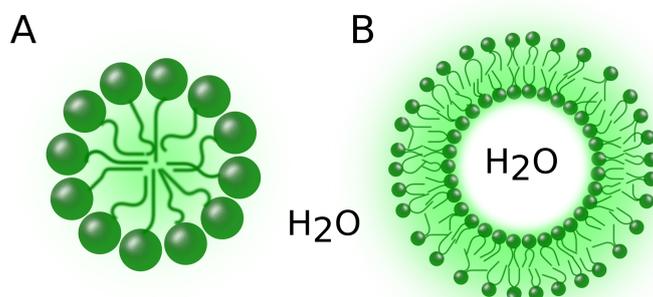


FIGURE 1.14 – Auto-assemblage de phospholipides dans l'eau (la forme du phospholipide détermine la façon dont ils s'organisent) : soit une organisation en micelles avec les queues à l'intérieur entourées par les têtes (A) ; soit une organisation sous forme de liposome, c'est-à-dire une vésicule dont la paroi est constituée d'une bicouche lipidique, les queues étant prises en sandwich entre les têtes hydrophiles (B).

La fluidité de la membrane dépend de sa composition et de la température. Cette dépendance a été démontrée dans des modèles de monocouches et de bicouches lipidiques supportées [52, 61]. Les membranes synthétiques fabriquées à partir d'un seul type de phospholipide passent successivement d'une phase cristalline à une phase gel, et d'une phase gel à une phase fluide lorsqu'on augmente

la température. La température de transition gel-fluide, notée T_m est typiquement comprise entre -50 et 100°C. Les phospholipides dont les chaînes d'acides gras sont insaturées, sont plus difficiles à "gélifier" car la température T_m est plus basse, typiquement entre -50°C et 20°C. Par exemple, le DOPC et le DOPE, qui possèdent une double liaison en configuration cis sur chacune des chaînes hydrocarbonées, ont respectivement une température de transition de -17°C et -16°C. A contrario le DSPE, à chaînes carbonées saturées, a une température de transition $T_m=74^\circ\text{C}$ (Avanti Polar Lipids).

Le premier modèle d'organisation de la membrane plasmique est la "*mosaïque fluide*" proposé par Singer et Nicholson en 1972 [62]. Cette mosaïque est composée de protéines insérées à l'intérieur d'une structure fluide qui n'est autre que la bicouche phospholipidique (figure 1.15). Les études des protéines extraites des membranes de cellules vivantes ont permis de répertorier et de définir les différents types de protéines membranaires [62]. Par la suite, ce modèle a également permis de mettre en évidence les interactions entre les protéines et leur environnement lipidique comme les liaisons électrostatiques, hydrophobes, hydrogène ou de van der Waals.

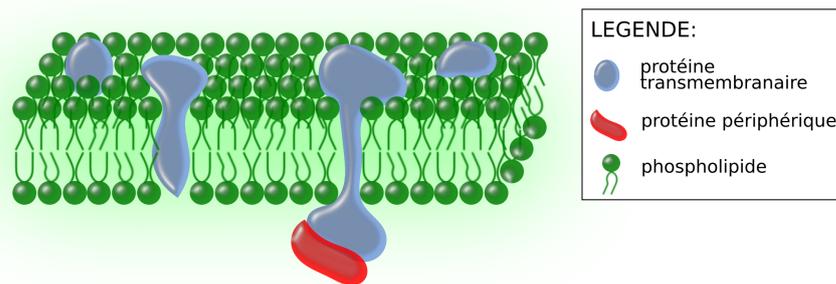


FIGURE 1.15 – Représentation d'un fragment de la membrane plasmique.

On sait maintenant que ce modèle qui décrit la membrane comme une mosaïque fluide est incomplet. En particulier il ne tient pas compte de la grande hétérogénéité en termes de composition lipidique, protéique et en termes d'interactions lipide-lipide, lipide-protéine et protéine-protéine. Par exemple, ce modèle n'est pas suffisant pour expliquer le phénomène de trafic asymétrique des lipides et des protéines membranaires dans les cellules épithéliales polarisées. Pour cela, il apparaît nécessaire d'émettre l'hypothèse de l'existence de domaines dans la membrane qui diffèreraient en termes de composition et phase du reste de la bicouche [63]. Ces domaines phospholipidiques sont moins stables que le reste de la membrane et ont une durée de vie limitée dans le temps. Au cours des années 90, un débat est apparu sur la possibilité que les molécules lipidiques puissent s'associer transitoirement en domaines spécialisés appelés radeaux lipidiques ("*rafts*"). Ces radeaux lipidiques seraient riches en sphingolipides et cholestérol. Les sphingolipides possèdent des chaînes plus longues que celles des phospholipides. Ainsi, les parties membranaires associées aux radeaux lipidiques seraient plus épaisses afin de favoriser l'ancrage des protéines. Ces radeaux pourraient

donc être détectés par les protéines cytoplasmiques. Les études d'extraction de ces microdomaines insolubles à l'aide de détergents ont montré que plusieurs protéines sont capables de se lier aux "rafts". Par exemple, l'ancrage des protéines de signalisation telles que les kinases pourrait signifier que les "rafts" fonctionnent comme les plateformes de signalisation qui constituent un environnement favorable au fonctionnement de ces protéines [64].

B La charge effective d'une membrane

La membrane plasmique présente une grande asymétrie en termes de charges entre ses deux feuillets. En règle générale, les phospholipides membranaires possèdent une charge nette de 0 ou -1. Or, la composition lipidique des deux feuillets est différente. Par exemple, la plupart des phosphatidylcholines sont situées sur le feuillet externe. En revanche les phosphatidylserines et phosphatidylethanolamines composent majoritairement le feuillet interne. L'électronégativité des phosphatidylserines provoque une asymétrie de charges entre les deux feuillets. De nombreuses protéines se lient aux sites où la phosphatidylserine est concentrée. De la même manière que les "rafts", cette asymétrie a une fonction importante dans les voies de signalisation cellulaire. Dans le cas de l'apoptose, la signalisation extracellulaire met en jeu les phosphatidylserines. Elles se localisent sur le feuillet externe, permettant ainsi la prise en charge par les macrophages [65, 66].

Le rôle de la charge et du potentiel électrostatique de la membrane a été très souvent négligé jusque dans les années 80 avec l'application de la théorie de Gouy-Chapman décrivant l'attraction électrostatique des contre-ions à la surface de la membrane [67, 68]. Cette théorie, permettant de définir le potentiel électrostatique au niveau d'une surface, est appliquée au cas de la membrane plasmique. A l'heure actuelle, il est connu que ce potentiel est responsable de divers processus biologiques comme l'organisation structurale des protéines membranaires, l'ancrage de celles-ci, l'influence de la conductance des canaux ioniques, ou encore la propagation des stimuli dans les neurones [69].

La charge effective d'une surface peut être exprimée en termes de *potentiel zeta*, noté ζ . Ce paramètre représente le niveau du potentiel électrostatique ψ qu'une molécule ou surface acquiert dès qu'elle est en solution. Dans une solution, les charges fixes de la surface provoquent l'apparition d'une région de charges opposées afin de maintenir l'électroneutralité de l'interface. Cette région est connue sous le nom de *double couche électrique* car elle se compose d'une part de charges fixes et d'autre part de charges mobiles (figure 1.16 A). Plusieurs modèles décrivent ce phénomène [70]. La double couche électrique a été initialement présentée comme étant une simple répartition des charges au voisinage d'une surface, schématisée par le modèle de Helmholtz. Des ions de charge opposée à celle de l'interface (contre-ions) sont attirés par cette dernière. Les contre-ions se positionnent alors à proximité de l'interface en formant une couche immobile appelée "couche d'Helmholtz". Ce modèle, trop simpliste pour être appliqué aux membranes plasmiques, ne prend pas en compte les fluctuations thermiques du système. Un deuxième modèle, élaboré par Gouy et Chapman, est plus

proche de la réalité expérimentale [67]. Il décrit l'existence d'une couche diffuse de contre-ions. Le potentiel électrostatique décroît alors avec la distance. Le modèle le plus répandu actuellement est celui de Gouy-Chapman-Stern (figure 1.16 A) : il combine les deux modèles précédents ; Stern y introduit une couche supplémentaire, située entre les plans interne et externe de la couche d'Helmholtz, rebaptisée "couche de Stern". Cette subdivision fait intervenir une première composante du plan interne d'Helmholtz où les contre-ions sont non hydratés et adsorbés à la surface. La seconde composante, délimitée par le plan externe de la couche d'Helmholtz, est alors la couche de Stern. Elle se compose de contre-ions partiellement ou totalement hydratés. La dernière couche du modèle est la couche diffuse de Gouy-Chapman, avec des co-ions et contre-ions mobiles. L'existence d'une double couche provoque un double comportement du potentiel électrostatique : il décroît d'abord de manière linéaire à travers la couche d'Helmholtz et la couche de Stern puis exponentiellement dans la couche diffuse (figure 1.16 B). Afin de caractériser la charge effective d'un substrat, on introduit alors un plan fictif, séparant les ions immobiles des ions mobiles (en parle de plan de cisaillement). Le potentiel électrostatique associé à ce plan est appelé le potentiel ζ . Le potentiel ζ dépend du pH de la solution et de sa force ionique. Sa valeur absolue augmente lorsque le nombre d'ions dans la solution diminue. La littérature propose également des modèles plus complexes à trois ou quatre couches [71]. Néanmoins, le modèle à deux couches suffit pour estimer la charge effective d'une membrane plasmique.

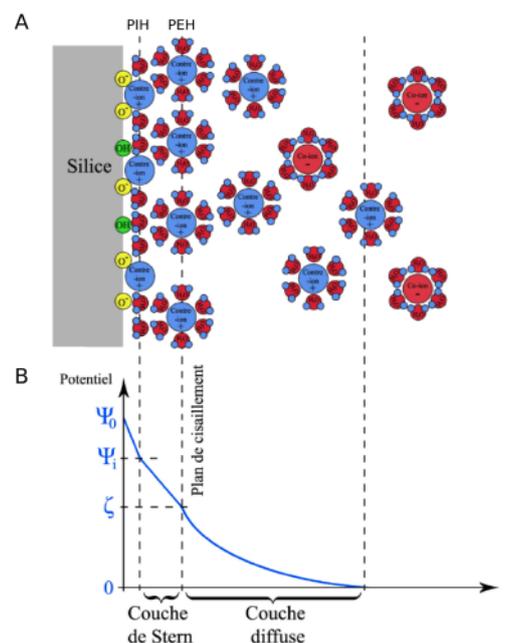


FIGURE 1.16 – Modèle d'une double couche électrique (A) Représentation de la double couche selon le modèle de Gouy-Chapman-Stern. PIH et PEH signifient le plan interne et le plan externe d'Helmholtz respectivement. (B) Evolution du potentiel électrostatique de la surface avec la distance. Le potentiel ψ_0 caractérise la couche d'Helmholtz, ψ_i la couche de Stern. ζ est le potentiel associé au plan de cisaillement entre la couche de Stern et la couche diffuse [70].

En biologie cellulaire, le concept du potentiel ζ est utilisé pour étudier différentes caractéristiques cellulaires telles que la viabilité, l'adhésion, la prolifération ou l'agglutination [72, 73, 74]. La charge effective de la membrane plasmique est un paramètre biophysique important qui dépend principalement de sa composition. Par exemple, Bondar et collaborateurs ont observé une nette différence du potentiel ζ entre les cellules adhérentes MCF7 ou HeLa (~ -20 mV) et les érythrocytes (~ -32 mV) [72]. Le décalage vers des valeurs plus négatives peut être interprété par la présence de molécules d'acide sialique à la surface des érythrocytes. Les phospholipides chargés négativement sont vraisemblablement à l'origine de la charge effective de la membrane plasmique. Cependant, la valeur du potentiel ζ d'une vésicule composée uniquement de phosphatidylcholine est beaucoup plus négative (~ -62 mV) que celle d'une membrane cellulaire [72]. Différentes protéines membranaires ou de polysaccharides doivent aussi contribuer au potentiel ζ d'une cellule. L'équipe de Bondar a également étudié l'évolution du potentiel ζ de cellules lors du phénomène d'apoptose. La valeur du potentiel ζ diminue alors d'environ 4 mV. Cette tendance peut être expliquée par l'adressage au niveau de la membrane de la phosphatidylserine qui est un des plus précoces marqueurs apoptotiques [66].

Le potentiel ζ est aussi un paramètre clé dans l'étude de la réponse cellulaire à différents traitements. Notamment dans le domaine de la conception de nouvelles pharmaceutiques, où il est important de savoir si une molécule est bien absorbée à la surface de la membrane, pour ensuite être internalisée. Par exemple, l'interaction cellulaire avec des nanoparticules suscite beaucoup d'intérêt dans le domaine du traitement du cancer. Il est alors possible d'évaluer le potentiel ζ lorsqu'on met en présence des nanoparticules avec des cellules épithéliales saines MCF10A et cancéreuses MCF7 [75]. Il a été démontré, que le potentiel ζ des cellules saines a été beaucoup plus négatif (~ -30 mV) que celui de cellules cancéreuses (~ -20 mV). Ceci est dû à la différence de composition de la membrane plasmique entre des conditions physiologiques et pathologiques [76].

C Les membranes biomimétiques

Les dernières découvertes en matière de microdomaines membranaires nécessitent d'être approfondies, notamment par des études de diffusion (FCS, FRAP, SMT) qui permettent de sonder la microfluidité et l'organisation locale de la membrane [58, 77]. Toutefois, ces études locales sur la membrane des cellules vivantes ne sont pas toujours aisées. Ainsi, différents modèles simplifiés, mimant le comportement et l'organisation de la membrane plasmique, ont été développés. Parmi eux, on peut citer les vésicules géantes lipidiques, les bicouches lipidiques supportées, les microémulsions ou les cristaux liquides lamellaires. Les vésicules géantes sont assurément les plus intéressantes pour mimer l'adhésion cellulaire ou le déplacement de cellules sur des surfaces. Néanmoins les bicouches lipidiques supportées sont éminemment importantes, en particulier parce qu'elles sont compatibles avec de nombreuses techniques de mesure à proximité d'une interface comme l'interférométrie, l'ellipsométrie, la spectroscopie ou la microscopie à fluorescence [78, 79]. Les bicouches lipidiques

offrent la possibilité de recréer des membranes en contrôlant leur composition (figure 1.17). Elles fournissent l'environnement naturel pour immobiliser les protéines tout en préservant leur structure tertiaire et en définissant leur orientation. Les bicouches lipidiques peuvent être séparées de la surface par un film nanométrique d'eau ou par une couche de polymère qui maintient les propriétés thermodynamiques et structurales de la membrane [80].

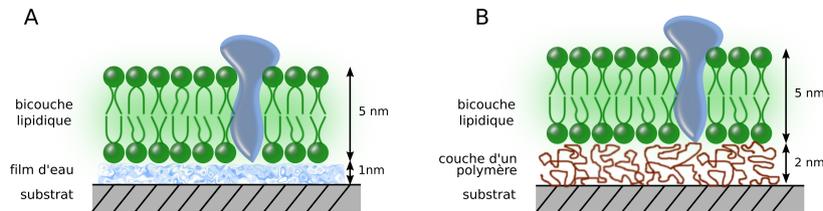


FIGURE 1.17 – Bicouche lipidique supportée : (A) soit une bicouche lipidique supportée séparée du substrat par un film nanométrique d'eau, (B) soit une bicouche lipidique supportée séparée par une fine couche d'un polymère.

La vésicule géante est la modèle biomimétique le plus intéressant pour l'étude de l'adhésion. Elle peut être également utilisée pour mimer une large variété de phénomènes cellulaires, tels que l'endocytose, la cicatrisation et le bourgeonnement. Les vésicules géantes sont créées par autoassemblage de phospholipides en bicouche. Les extrémités de la bicouche sont scellées afin d'acquérir une forme énergétiquement favorable : une sphère (figure 1.18 A). On forme tout d'abord des petites vésicules (liposomes) qui fusionnent ensuite entre elles pour donner naissance à de plus grosses vésicules (figure 1.18 B). Le diamètre des vésicules géantes est assez variable. Il est typiquement supérieur à 10 μm et peut atteindre $\sim 200 \mu\text{m}$. Les vésicules géantes sont parfaitement visibles en lumière blanche et peuvent être triées selon leur taille. La courbure de leur membrane ressemble à celle des cellules. Elles présentent également une tension de surface non négligeable grâce aux forces de van der Waals qui maintiennent les deux feuillets lipidiques. Il a été notamment montré qu'il est possible d'augmenter la surface occupée par la membrane d'une vésicule en y injectant d'importants volumes d'eau [81].

Il existe multiples méthodes de préparation des vésicules géantes : la réhydratation des lipides, la dialyse et la technique de gel-dégel. Or, ces pratiques présentent le risque de fabriquer des vésicules multilamellaires, de forme allongée ou agrégée. L'extrusion est une autre technique, à bas coût, qui permet une formation rapide des vésicules. Le fonctionnement d'un dispositif d'extrusion (par exemple d'un "Mini-extruder" Avanti Polar Lipids) consiste à compresser une suspension lipidique en la faisant passer par des pores d'un diamètre de l'ordre de 2 μm . L'utilisation des filtres d'un diamètre $< 2 \mu\text{m}$ est censée assurer la formation des liposomes unilamellaires. En pratique, il est extrêmement difficile d'obtenir un mélange homogène. Ainsi, l'électroformation est la technique de synthèse la plus populaire à l'heure actuelle : elle permet d'obtenir des vésicules sphériques,

unilamellaires et une population homogène en taille. Dans mon étude j'ai appliqué cette technique de synthèse (travaux d'Angelova et Dimitrov [82]). Il s'agit de déposer un film lipidique sur deux plaques de verre recouvertes d'une fine couche d'un matériau conducteur. Les plaques sont montées en vis-à-vis de manière à former un condensateur dans un système hermétique rempli d'eau. Ensuite, un courant alternatif est appliqué. Les molécules d'eau excitées par le champ provoquent le mouvement des lipides, tout en facilitant leur autoassemblage en bicouches lipidiques. Cette technique est avantageuse en raison de son faible coût.

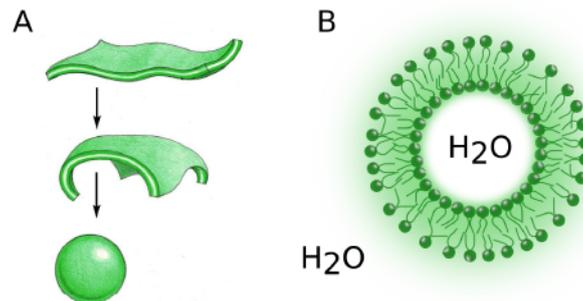


FIGURE 1.18 – Vésicule lipidique. (A) Processus de formation d'une vésicule à partir d'une bicouche lipidique [6]. (B) Compartimentation d'une vésicule lipidique plongée dans une solution aqueuse.

1.3 Adhésion en absence de la matrice extracellulaire

Comme je l'ai précédemment expliqué, le processus d'adhésion est dirigé par une reconnaissance spécifique cellule-substrat, via différentes voies de signalisation qui font intervenir des protéines membranaires et celles de la MEC. Cependant, d'autres paramètres liés au substrat comme sa charge effective, son niveau d'hydrophobicité ou son degré d'hydratation, peuvent jouer un rôle sur le mécanisme d'adhésion. Contrôler l'adhésion peut s'avérer très intéressant dans de nombreux domaines, par exemple afin d'étudier la morphogenèse, l'angiogenèse, le vieillissement cellulaire, la progression tumorale ou encore pour développer des biomatériaux dédiés à la réparation tissulaire. Dans ce dernier domaine, la conception de nouveaux polymères repose sur la biocompatibilité cellule-substrat, pour que les matériaux puissent être intégrés dans l'organisme [83, 84]. D'un autre côté, il est également très intéressant de comprendre globalement les interactions entre la cellule et son environnement sur des surfaces de natures différentes.

In vivo, l'interface cellule-substrat contient une multitude d'ions et de macromolécules chargées. Ainsi, plusieurs études ont consisté à évaluer le comportement migratoire et la morphologie d'adhésion cellulaire sur les surfaces chargées [85, 86, 87, 88]. Shelton et collaborateurs ont étudié, par exemple, la morphologie des ostéoblastes sur des billes de polystyrène chargées positivement ou négativement [85]. Ils ont observé que les ostéoblastes sont capables de migrer sur ces deux caté-

gories de surface, mais en adoptant deux types distincts de morphologie. Sur les surfaces chargées positivement, les cellules ont une forme très aplatie, la membrane ventrale étant très proche du substrat. En revanche, les cellules qui migrent sur les surfaces chargées négativement adoptent des formes non polarisées, présentant de multiples filopodes qui leur permettent d'adhérer à la surface. La membrane ventrale est située à une distance plus importante de la surface et développe seulement quelques points de contact proches, similaires aux plaques d'adhésion focales. Ils ont également montré que l'espace entre la membrane et le substrat dépend de la densité de charges sur l'interface. La présence de sérum de veau foetal (SVF) dans le milieu de culture *in vitro* peut également influencer l'adhésion et la morphologie cellulaire en écrantant les charges présentes sur la surface. Wachem et collaborateurs ont étudié l'étalement des cellules sur les surfaces chargées en présence et l'absence de SVF [86]. Leurs résultats sont comparables à ceux de Shelton et al [85]. Deux heures après l'ensemencement, la majorité des cellules endothéliales ont adhéré sur un polymère chargé positivement. Il semblerait que l'adhésion sur ce dernier nécessite une forte interaction électrostatique entre la membrane chargée négativement et la surface chargée positivement. En effet, les cellules ne desadhèrent qu'en présence d'une forte concentration de protéases (enzymes qui brisent les liaisons peptidiques entre les protéines). En revanche, le polymère chargé négativement inhibe l'adhésion de cellules endothéliales. L'ajout de SVF sur cette surface chargée négativement permet aux cellules d'adhérer de nouveau sur la surface.

Le comportement cellulaire peut aussi être analysé sur des surfaces recouvertes de protéines telles que l'albumine (chargée négativement à pH physiologique) ou alors la poly-L-lysine (chargée positivement). Ce type d'expérience permet d'évaluer l'impact du SVF. L'albumine est fortement adsorbée sur les surfaces hydrophobes. Cependant, sur des surfaces moins hydrophobes, d'autres protéines comme celles du SVF peuvent également s'adsorber sur la surface. L'équipe de Dewez a observé l'étalement de cellules épithéliales sur l'albumine et a constaté que l'albumine pré-adsorbée sur les surfaces hydrophobes inhibe l'adhésion cellulaire [88]. A l'opposé, l'adsorption de polycations à la surface, comme la poly-L-lysine, induit l'adhésion systématique des cellules. Ainsi, on peut estimer que le comportement cellulaire sur la poly-L-lysine est gouverné par l'attraction électrostatique entre une surface chargée positivement et la membrane plasmique chargée négativement. Depuis de nombreuses années, le comportement cellulaire sur l'albumine et la poly-L-lysine est appliqué dans des tests d'adhésion. Ces exemples prouvent que le comportement d'adhésion dépend fortement du potentiel électrostatique de la surface. L'ancrage spécifique de la membrane via les points focaux semble intervenir à un stade ultérieur.

1.4 Etudes qualitatives de l'adhésion et la migration

Depuis les travaux pionniers de Robert Hooke sur les cellules en 1665 [89], des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension de l'adhésion. Il a fallu attendre plus de trois siècles avant que les mécanismes de l'adhésion soient décrits par Taylor, en 1961 [7]. Depuis, de nombreuses

méthodes qualitatives et quantitatives de mesure de ce processus ont été développées. Aujourd'hui, il est envisageable d'adapter quasiment n'importe quelle technique de microscopie optique pour étudier l'adhésion cellulaire. Ainsi, elle peut être mesurée de différentes manières, par exemple en analysant la morphologie cellulaire, le pourcentage de cellules attachées sur le substrat, les distances séparant la membrane cellulaire du substrat, ou bien encore les forces d'interaction cellule-substrat. Certaines de ces techniques sont plus utilisées que d'autres, principalement pour des raisons de coût et de rapidité de mesure ou de facilité d'installation. Cependant, les statistiques réalisées avec certains moteurs de recherche comme PubMed révèlent qu'au cours des dix dernières années la partie consacrée aux études quantitatives de l'adhésion (recherche par mots clés "quantitative adhesion") ne représente que 4% de la totalité des études effectuées dans ce domaine (mot clé "adhesion"). Ceci signifie qu'une grande majorité des études est toujours consacrée à l'analyse qualitative de ce processus.

1.4.1 Techniques utilisant la microscopie optique

La première méthode proposée pour étudier l'adhésion reposait sur l'analyse des caractéristiques morphologiques de la cellule par microscopie à contraste de phase. Elle permettait d'observer la forme globale de la cellule, la taille présumée de la zone d'adhésion et la taille des prolongements membranaires. Cette technique d'analyse, plutôt qualitative, a permis d'étudier pour la première fois les changements morphologiques de la cellule au cours de son étalement à une surface [7] (figure 1.19).

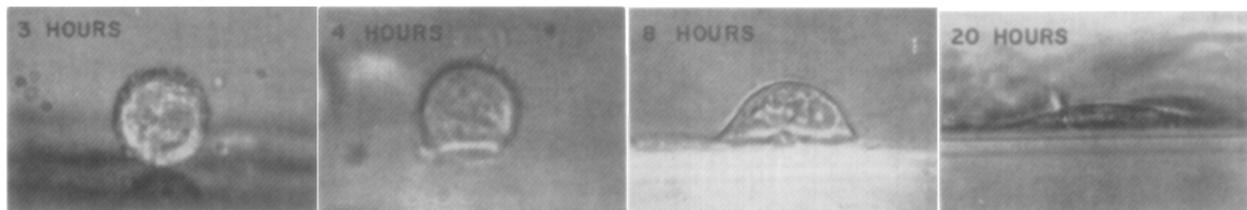


FIGURE 1.19 – Adhésion de fibroblastes humains sur verre, réalisée par Taylor en 1961 [7]. Les cellules ont été observées dans un milieu de culture en absence de SVF par microscopie à contraste de phase. Les quatre images représentent les quatre phases d'adhésion respectives : l'attachement de la cellule au substrat, la croissance de filopodes, le déploiement du cytoplasme et l'aplatissement de la cellule (voir paragraphe 1.1).

Actuellement, on étudie les changements morphologiques des cellules ou leur migration par la vidéomicroscopie. Pour observer aisément les contours des cellules, on utilise alors des outils de microscopie optique : la microscopie à contraste de phase ou la microscopie DIC, comme dans la figure 1.2. Ces outils offrent la possibilité d'observer simultanément une grande population de cellules (quelques dizaines). On réalise alors des études de type "time-lapse", c'est-à-dire à différentes échelles

du temps. Cette technique permet d'extraire des informations sur l'organisation d'une population cellulaire, son évolution au cours du temps, ou bien encore de différencier les phénotypes présents dans une population cellulaire [90], [37].

La vidéomicroscopie à contraste de phase permet d'observer des cultures cellulaires dans les modèles bidimensionnels (2D) et tridimensionnels (3D), qui reproduisent au mieux les conditions *in vivo*. Ces études 3D suscitent de plus en plus d'intérêt dans la communauté car elles reconstituent les vraies conditions physiologiques observées au sein d'un tissu. Les cellules immergées dans une matrice 3D semblent montrer un comportement d'adhésion différent de celles sur système 2D. Cependant, des études récentes, caractérisant l'adhésion cellulaire en 3D, ont mis en évidence des résultats contradictoires, résumés dans l'article de revue d'Harunaga [91]. La première grande problématique posée est l'existence même de points d'adhésion focaux dans les matrices 3D [92]. Une explication intéressante sur ce point a été proposée par Fraley et collaborateurs [93]. Ils suggèrent que la présence ou l'absence de points d'adhésion focaux peut être liée aux différences de tension et d'élasticité au sein de la matrice 3D. Il a été démontré que plus la distance entre la cellule et le support augmente, plus les cellules ont tendance à perdre leurs connexions avec la MEC. Dans une autre étude, lorsque les cellules sont déposées à la surface d'une matrice 3D (au lieu d'être immergées à l'intérieur de la matrice), rien ne semble empêcher la formation de contacts focaux. Les cellules adoptent le même comportement que celui prédit par les études 2D [94]. Il existe plusieurs exemples dans la littérature où les études 3D ne sont pas particulièrement différentes de celles en 2D.

Parmi les techniques de microscopie optique à contraste interférentiel, comme le DIC, la microscopie par réflexion à contraste interférentiel (RICM pour Reflection Interference Contrast Microscopy) est particulièrement bien adaptée à l'observation des cellules adhérentes (figure 1.20 B) [95]. Cette technique a été développée par Sackmann [96] comme une amélioration de la microscopie par réflexion interférentielle (IRM, pour Interference Reflection Microscopy). Il s'agit d'enregistrer les interférences produites par les réflexions multiples entre les deux interfaces verre/eau et eau/membrane plasmique. Le contraste d'une image RICM est alors principalement lié à la distance qui sépare la membrane de la surface (notée $h(x)$ sur la figure 1.20 A). Cette technique est très répandue pour observer l'étalement et l'adhésion d'objets biomimétiques, comme les vésicules lipidiques. Dans ce cas, il est possible de déterminer, avec une résolution nanométrique, la distance $h(x)$. En revanche, il est plus compliqué de calculer $h(x)$ en présence de cellules vivantes [95]. En effet, pour calculer $h(x)$, il faut connaître très précisément l'indice de réfraction du cytoplasme au voisinage de la membrane. Or, les différents éléments constituant le milieu intracellulaire ont des indices de réfraction très variables rendant très hétérogène l'indice du cytoplasme. Néanmoins, la mesure de $h(x)$ peut être réalisée en utilisant une illumination à deux longueurs d'ondes [97]. Le grand avantage de cette technique est son caractère non invasif pour les cellules car le RICM ne nécessite aucun marquage fluorescent de la cellule.

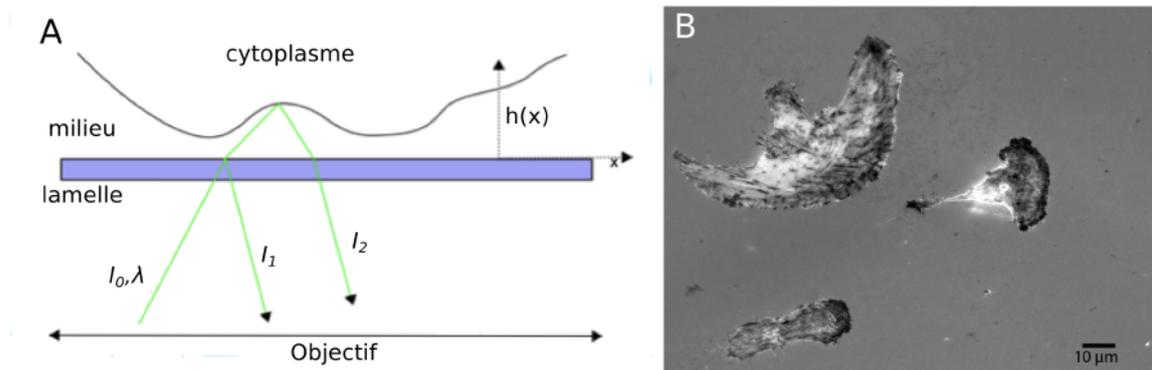


FIGURE 1.20 – (A) Schéma expliquant le principe d'une formation de l'image RICM. Les rayons incidents sont réfléchis à l'interface verre/eau et eau/membrane provoquant l'apparition des interférences à la surface. $h(x)$ représente la distance de séparation entre la membrane et le substrat. (B) Cellules MDA MB 231 dans leur milieu de culture à 37°C sur un substrat en verre recouvert de collagène de type I, observées en microscopie RICM. Plus le signal est sombre, plus la membrane est proche de la surface.

La microscopie à fluorescence peut être également utilisée pour étudier l'adhésion. Pour cela, la membrane plasmique doit être marquée à l'aide d'une sonde fluorescente. La microscopie confocale, par exemple, est utilisée pour localiser ou colocaliser les différentes protéines mises en jeu dans l'adhésion. Elle permet donc d'étudier l'organisation des filaments d'actine tout en les colocalisant simultanément avec les intégrines [98]. Or, le processus d'adhésion ne peut être observé efficacement que sur la partie ventrale de la cellule. Ainsi seuls les phénomènes se produisant au niveau de l'interface cellule-substrat (autrement dit ceux impliqués dans l'adhésion) seront observables comme le montre la figure 1.21 C. Pour cela, la microscopie TIRF, pour "Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy" est la méthode la plus couramment utilisée. Elle permet de détecter le signal de fluorescence émis par les molécules se trouvant à proximité de l'interface. Lorsque le faisceau laser d'excitation est totalement réfléchi, une onde évanescente est créée au niveau de l'interface. Cette onde évanescente se caractérise par une faible profondeur de pénétration dans le milieu, typiquement sur quelques centaines de nanomètres. L'application du TIRF dans l'étude de l'adhésion reste la plupart du temps une approche purement qualitative [3, 99, 100]. Néanmoins, en enregistrant une série de clichés à différents angles d'incidence, tous supérieurs à l'angle critique, il devient possible de quantifier l'adhésion, comme proposé par Lanni et collaborateurs [101]. Cette technique porte le nom de VA-TIRF, pour variable angle TIRF. Plus tard, l'équipe de Truskey [102] a amélioré la technique VA-TIRF dans le but d'observer les stades précoces d'attachement des cellules endothéliales sur des supports en verre.

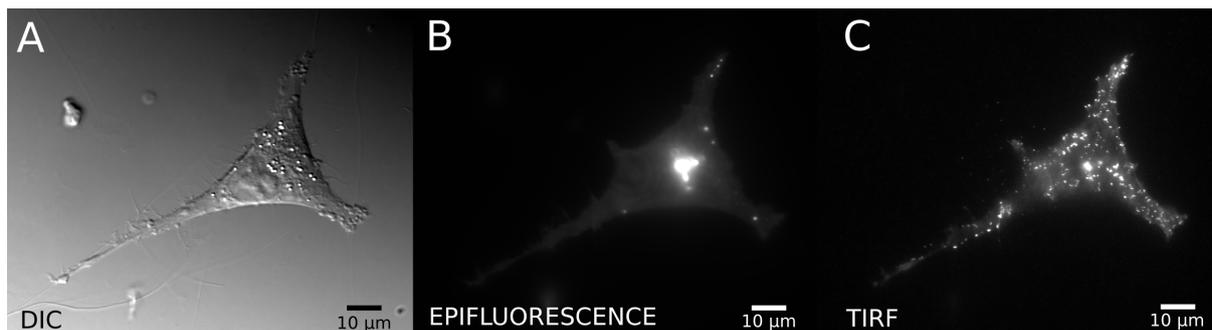


FIGURE 1.21 – Adhésion d’une cellule MDA MB 231. Il s’agit de trois images de la même cellule au cours de migration sur une couche de collagène de type I d’une épaisseur ~ 40 nm, à 37°C et observée à l’aide d’un objectif de grandissement 60x ($\text{ON}=1.45$), pour l’excitation laser à 488 nm. La cellule a été marquée avec de la DiO (A) : image DIC, (B) : image en épi-illumination, (C) : image en TIRF.

Les techniques de fluorescence apparaissent comme très intéressantes, car elles peuvent apporter des informations complémentaires à l’étude de la morphologie en contraste de phase. La localisation et la dynamique des protéines d’intérêt est également possible grâce à des techniques à haute résolution comme la photo-activated localization microscopy (PALM) ou microscopie par localisation photoactivée [28, 103] (figure 1.22 A). Elle a permis notamment la reconstruction de l’organisation du complexe d’adhésion focale (figure 1.6). Il existe d’autres techniques de microscopie de fluorescence à haute résolution permettant de réaliser l’imagerie des cellules vivantes comme la microscopie NEF (pour Non radiative Excitation Fluorescence) [104, 105] (figure 1.22 B) ou encore la microscopie STED (Stimulated-Emission-Depletion) (figure 1.22 C) [106]. La première repose sur un transfert d’énergie non radiatif entre une molécule donneur d’énergie et un accepteur. Afin de visualiser le processus d’adhésion, il est possible d’exciter un donneur déposé sur la surface, comme des boîtes quantiques, qui excitera par transfert d’énergie les sondes fluorescentes incorporées dans la membrane plasmique. On peut de ce fait observer uniquement les points de contact entre la cellule et le substrat [105] et leur évolution dans le temps (figure 1.22 B). Grâce au STED, il est possible d’étudier la diffusion des lipides dans la membrane ou la formation des nanodomains [106]. Cette technique, longtemps mal adaptée à l’étude des cellules vivantes [107], a été améliorée pour analyser ces dernières grâce au raccourcissement du temps d’exposition des fluorophores et surtout en limitant la puissance d’excitation laser.

La morphologie cellulaire peut être également étudiée par la microscopie électronique à balayage (MEB). Les différentes étapes du processus d’adhésion peuvent alors être observées plus en détails et apporter les informations complémentaires au schéma général comme le diamètre des filopodes (entre 80 et 160 nm) et leur nombre (jusqu’à 135 par cellule) [108] (figure 1.23). La seule contrainte de cette technique est son application sur les cellules fixées, c’est-à-dire mortes.

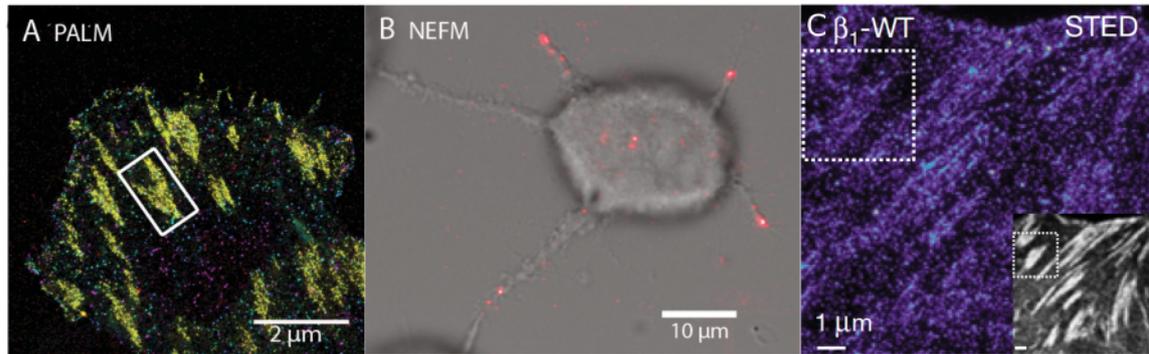


FIGURE 1.22 – Microscopie à haute résolution. (A) Marquage fluorescent de intégrines α_v d'une cellule U2OS, visualisée à l'aide du PALM [28]. (B) Localisation des zones de contact avec la surface dans le cas d'une cellule MCF7 observée par la microscopie NEFM [105]. (C) L'imagerie des intégrines β_1 visualisées via la microscopie STED [103].

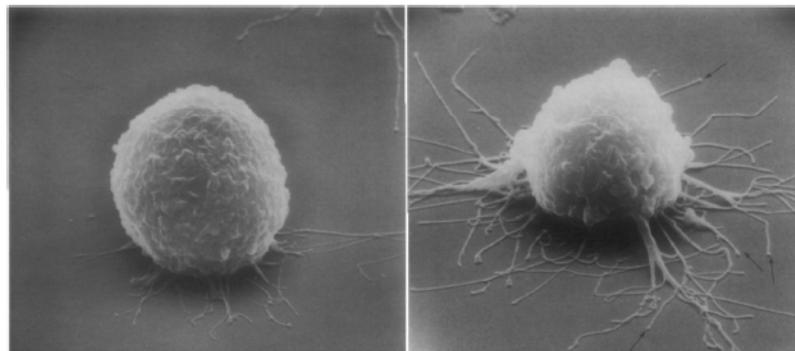


FIGURE 1.23 – Extension des filopodes dans les cellules WI-38 observées en microscopie électronique à balayage. Ces images montrent l'apparition de filopodes sur une surface de verre [108].

1.4.2 Mesure de la force d'adhésion

Parmi toutes les méthodes de mesure de l'adhésion, la plus répandue à l'heure actuelle est le test de rinçage ("washing assay"). Les cellules en suspension sont déposées sur le substrat d'intérêt qui recouvre le fond d'une plaque multipuits. Le temps d'incubation peut varier de 15 minutes à quelques heures. Ensuite, le substrat est rincé avec un tampon physiologique afin d'enlever toutes les cellules non adhérentes. L'adhésion est alors estimée par une mesure d'absorbance après une coloration des cellules (cristal violet). Le résultat de l'expérience est donné sous la forme d'un pourcentage de cellules adhérentes par rapport au nombre total de cellules. Pour vérifier la spécificité du comportement, les cellules sont également étudiées sur des substrats pré-incubés avec de l'albumine [109] ou de la poly-L-lysine. Le taux d'adhésion sur l'albumine doit être proche de 0 et celui sur la poly-L-lysine doit tendre vers 100%. L'adhésion cellulaire peut alors être analysée après exposition à un

médicament [5] ou encore sur des substrats recouverts de protéines de la MEC [110]. Les avantages de cette technique sont nombreux : rapidité, faible coût, analyse à l'échelle d'une grande quantité de cellules.

Une autre voie pour étudier l'adhésion cellulaire amène à mesurer, à l'échelle de la cellule unique, les forces exercées par la cellule sur le substrat, ou bien à exercer une force sur la cellule. Ces analyses sont regroupées sous l'acronyme SCFS, pour "Single Cell Force Spectroscopy". On peut citer à titre d'exemple celles utilisant la microfluidique, des micropipettes, des pinces optiques, la microscopie à force atomique (AFM), ou bien des substrats structurés. Dans tous les cas, ces méthodes utilisent la microscopie optique pour visualiser l'état d'adhésion de la cellule lors de la mesure de la force.

Une méthode fréquemment utilisée pour tester l'adhésion cellulaire est la technique dite des chambres à flux, comme celles développées en microfluidique (figure 1.24). La microfluidique peut être appliquée pour observer les comportements contigus de l'adhésion comme le roulement des cellules ou leur arrêt, le renforcement de l'adhésion, etc. [29, 111]. La microfluidique est également largement utilisée pour mimer ces phénomènes cellulaires à l'aide des systèmes biomimétiques (GUV) [112]. Pour observer la migration des cellules, la microfluidique est souvent couplée à la vidéomicroscopie. L'équipe de Lu a étudié à l'aide de systèmes microfluidiques (figure 1.24) la dynamique de détachement cellulaire en appliquant différentes forces de cisaillement [113]. Grâce aux petites dimensions du système, il est possible d'obtenir des forces de cisaillement très importantes tout en préservant le flux laminaire. Le comportement adhésif des cellules, par exemple sur la fibronectine, a été suivi au cours du temps. A la fin de l'expérience, le détachement cellulaire est mesuré en déterminant le ratio de cellules adhérentes par rapport au nombre total de cellules avant l'application du flux. Cette technique est très intéressante pour mimer les conditions *in vivo* sous flux, comme par exemple l'adhésion des cellules dans les vaisseaux sanguins [114].

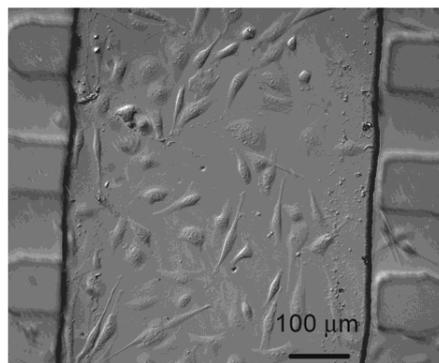


FIGURE 1.24 – Adhésion de fibroblastes sur un substrat de fibronectine analysée grâce à l'application d'un flux laminaire au sein d'un canal microfluidique [113].

La technique la plus ancienne utilise les micropipettes pour déformer la membrane. La micropi-

pette en contact avec la cellule permet d'étendre ou de comprimer la cellule. Un substrat fonctionnalisé, la plupart du temps une simple bille, est appliqué à la cellule afin de créer une interaction membrane-substrat (figure 1.25). Les forces appliquées à la membrane induisent des petits déplacements de la bille, proportionnels à la force. La plus petite intensité en terme de force pouvant être détectée par le système développé par Evans [115] est de l'ordre de 10^{-2} pN, ce qui correspond à un déplacement de la bille de seulement quelques nanomètres. La plus grande force mesurée à l'aide de ce système est de ≈ 1 nN, typiquement égale à la force d'une liaison covalente. En modulant la tension membranaire, il est également possible de mesurer les forces d'attraction ou de répulsion, ou encore les forces d'adhésion spécifiques, par exemple en fonctionnalisant la bille avec un ligand de la MEC.

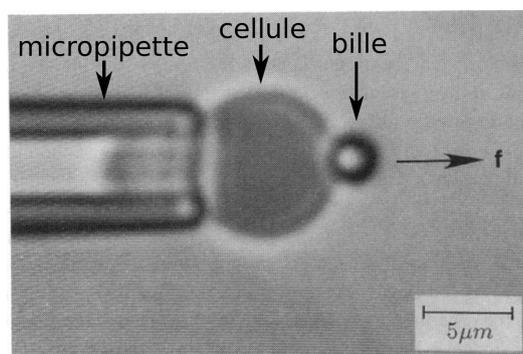


FIGURE 1.25 – Mesure de la force de liaison cellule-ligand grâce à une micropipette. Les forces appliquées à la membrane via la micropipette provoquent des petits déplacements de la bille [115].

La microscopie à force atomique (AFM) permet d'élargir à une échelle plus large la mesure des forces d'adhésion, typiquement de 10pN à 1μN. Les avantages de l'AFM ont été récemment résumés par Taubenberger [116]. Dans une première configuration, les cellules accrochées au cantilever sont rapprochées progressivement vers une surface recouverte de composants de la MEC. Dans une deuxième configuration les cellules sont déposées sur un substrat et la pointe AFM est fonctionnalisée avec des protéines de la MEC. Le principe de la mesure est simple : la cellule est mise en contact avec les composants de la MEC pendant un temps défini puis la pointe est rétractée. Il est ainsi possible de mesurer la force d'adhésion membrane-matrice à partir des courbes d'approche/retrait de la pointe AFM. L'AFM-SCFS permet d'examiner les types d'interaction cellule-matrice. La sensibilité du système permet la caractérisation des liaisons ligand-récepteur entre les protéines de la MEC et les récepteurs membranaires. On peut citer les exemples de l'interaction fibronectine-intégrine [117] (20 pN et 70 pN respectivement lors d'un détachement lent et rapide) ou de l'interaction collagène-intégrine [31] (de l'ordre de 47 pN), mesurées à l'échelle d'une liaison unique. La formation de plaques d'adhésion focales est à l'origine de force beaucoup plus importante, typiquement de l'ordre de quelques dizaines de nN. Cette technique combinée à la microscopie optique permet également d'observer la taille de la zone d'adhésion ou la répartition des points d'adhésion. A l'aide

de cette technique, on peut donc quantifier l'adhésion et comprendre comment la composition et la topographie de la surface affectent l'adhésion des cellules. L'inconvénient de l'AFM réside dans le fait que l'adhésion ne peut être mesurée qu'à l'échelle de quelques minutes. Au delà, les forces d'adhésion deviennent trop importantes et le détachement provoque la destruction de la cellule.

Une méthode plus polyvalente dans le domaine des SCFS est la technique des pinces optiques. Cette dernière utilise un ou plusieurs faisceaux laser pour immobiliser et déplacer des particules diélectriques, d'une taille de $0,1 \mu\text{m}$ à plusieurs microns, voire des cellules vivantes ou des vésicules. Les forces externes appliquées latéralement sur la particule peuvent être évaluées grâce à la mesure de la déflexion angulaire du faisceau laser qui permet de piéger la particule [118]. Cette déflexion laser se mesure à l'aide d'un photodétecteur et est convertie en valeur de force. Le déplacement de la particule est directement proportionnel à la force appliquée. A l'aide de pinces optiques, Litvinov a développé un système pour déterminer la force de liaison entre un ligand (le fibrinogène) et son récepteur (l'intégrine) d'abord dans un modèle de protéines purifiées puis à la surface d'une cellule vivante [119]. Pour mesurer cette force, une petite bille de latex fonctionnalisée en surface avec du fibrinogène, a été piégée par les pinces optiques. La bille a été rapprochée et éloignée d'un support recouvert d'intégrines, par la pince optique (figure 1.26). Grâce à cette méthode, il a pu démontrer que les intégrines des plaquettes possèdent un seul état d'activation et que leur stimulation augmente la probabilité de la liaison ligand-récepteur, sans affecter la force d'interaction.

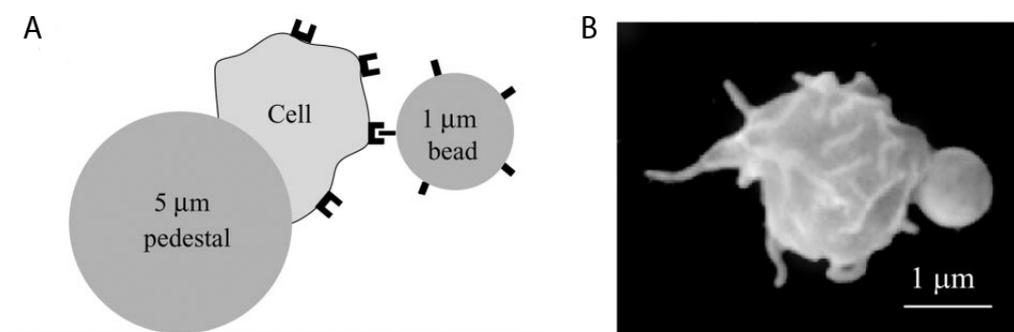


FIGURE 1.26 – Mesure d'une force d'interaction ligand-récepteur (intégrine à la surface de la membrane plasmique et le fibrinogène sur une bille) à l'aide de pinces optiques. (A) Schéma d'interaction entre l'intégrine à la surface de la membrane plasmique et le fibrinogène fonctionnalisé sur une bille de latex. (B) Image représentant cette interaction en microscopie MEB, issue de la référence [119].

Les techniques d'AFM et de pinces optiques, malgré leurs différences méthodologiques, partagent quelques points communs : l'environnement de travail doit être extrêmement stable pour ne pas influencer les mesures ; les variations de température faussent les données (de plusieurs centaines de nanomètres) ; les vibrations mécaniques et les bruits acoustiques ou électriques affectent la mesure. Ainsi, ces manipulations nécessitent une stabilisation de la température et une isolation acoustique.

La mesure des forces peut être également réalisée à l'aide de surfaces élastiques microstructu-

rées (micropattern) [120, 121, 122]. En effet, la distribution des forces et la géométrie de la MEC affectent l'organisation et le comportement cellulaire. Afin de contrôler certains paramètres du microenvironnement, comme sa rigidité et sa topographie, Tseng et collaborateurs ont développé différents environnements de type "micropattern" [122]. Ces systèmes ont le pouvoir d'orienter les forces d'adhésion exercées par les cellules sur son environnement. Ainsi, ces micropatterns peuvent être utilisés pour mesurer les forces de traction induites par les contractions du cytosquelette. Cette méthode permet par exemple d'évaluer des caractéristiques adhésives des cellules tumorales.

Chapitre 2

Fluorescence et réflexion totale interne

La microscopie de fluorescence repose sur l'utilisation de substances fluorescentes (typiquement des molécules organiques) pour observer et étudier la matière. La fluorescence est un phénomène d'émission de lumière très rapide, isotrope (i.e. sans direction privilégiée), que certaines substances (molécules, cristaux) acquièrent lorsqu'elles sont soumises à l'action d'un rayonnement lumineux. La longueur d'onde d'émission est caractéristique de la substance et elle est différente de celle de la radiation d'excitation.

2.1 Fluorescence

2.1.1 Etats électroniques d'une molécule fluorescente

Les molécules qui ont la capacité d'émettre de la lumière, suite à une excitation lumineuse, sont appelées des fluorophores. Cette appellation est généralement attribuée aux molécules organiques, alors que le terme luminophore est plutôt réservé aux cristaux, comme les boîtes quantiques. Les propriétés d'absorption et d'émission d'un fluorophore dépendent de ses électrons π . Une description des niveaux énergétiques d'une molécule fluorescente est donnée sur la figure 2.1. Ce modèle simplifié, imaginé par Alexander Jablonski en 1933 [123], se compose de trois niveaux d'énergie électronique. S_0 désigne l'état fondamental et S_1 et T_1 les états excités. S_0 et S_1 sont appelés des états "singulets" et T_1 un état "triplet". Ces appellations sont issues de la physique quantique et représentent la multiplicité de spin $M_s=2s+1$ avec s la résultante des spins électroniques ($s=\sum s_i$, $s_i=\pm\frac{1}{2}$). Considérant le cas simple d'une molécule à deux électrons π , comme illustré sur la figure 2.1, lorsque les électrons sont de spins opposés ($\uparrow\downarrow$), l'état est singulet ($s=0$, $M_s=1$). Lorsque les spins sont parallèles ($\uparrow\uparrow$), on parle d'état triplet ($s=1$, $M_s=3$).

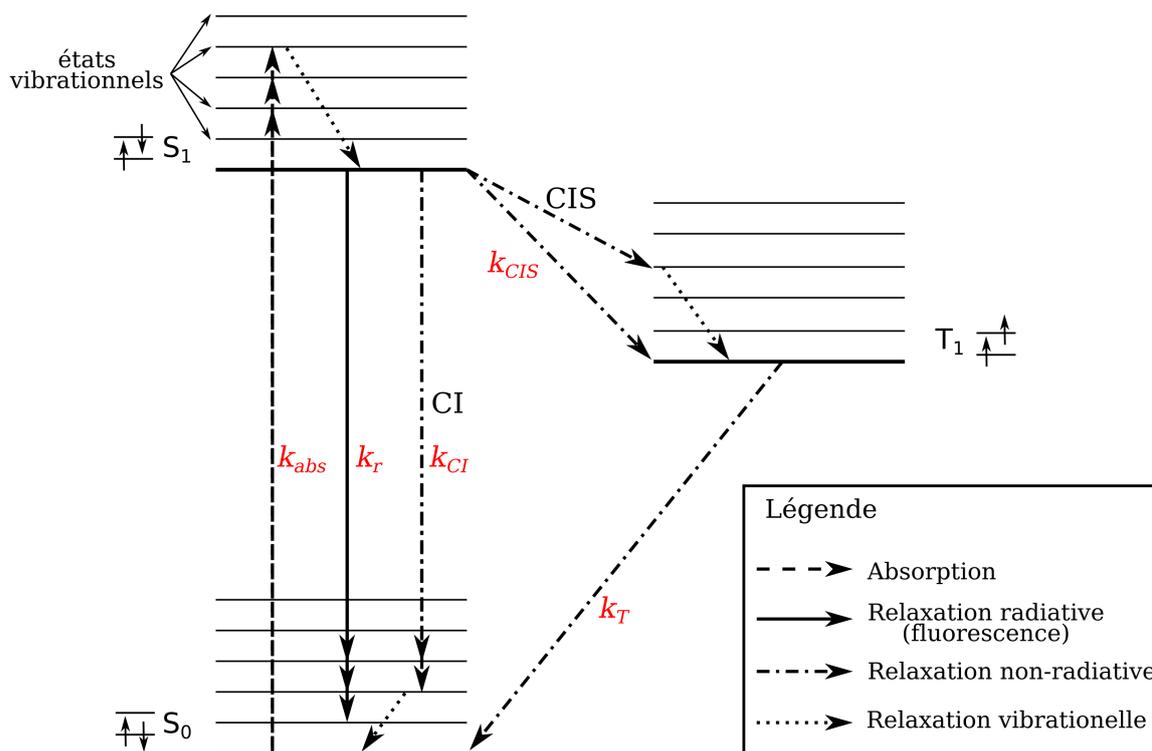


FIGURE 2.1 – Diagramme de Jablonski d'un système à trois états électroniques : S_0 , S_1 et T_1 . La lettre S représente les états singulets et la lettre T l'état triplet. Les indices 0 et 1 désignent respectivement l'état fondamental et l'état excité. Chaque état électronique possède des sous-niveaux d'énergie vibrationnelle (représentés par des traits horizontaux). CI et CSI signifient respectivement conversion interne et couplage intersystème.

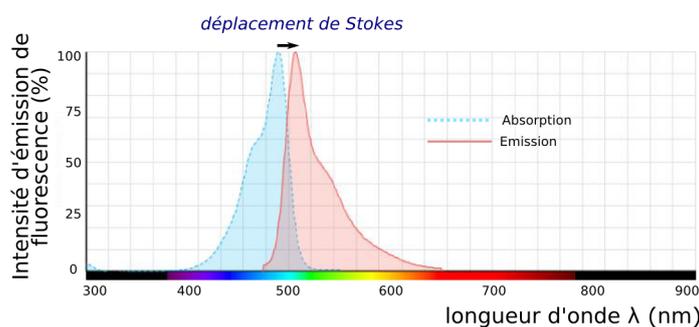


FIGURE 2.2 – Exemple d'illustration du déplacement de Stokes pour le spectre d'émission de fluorescence de la DiO au sein d'une bicouche lipidique. Les maximums d'absorption (tracé bleu) et de l'émission (tracé rouge) sont respectivement situés à 484 et 501 nm. Le déplacement de Stokes est indiqué par la flèche horizontale et mesure ~ 15 nm. L'image est extraite du site de Molecular Probes.

Le cycle d'absorption-émission peut alors être décrit sur ce diagramme (figure 2.1) par l'absorption de photons suivant la transition $S_0 \rightarrow S_1$, suivie de l'émission spontanée de photons par désexcitation vers l'état fondamental S_0 . Au cours de ce cycle, une petite partie de l'énergie est inévitablement perdue via des relaxations vibrationnelles (figure 2.1, lignes horizontales). Ainsi, l'énergie du photon émis est toujours plus faible que l'énergie du photon absorbé. Ceci engendre un déplacement vers le rouge du spectre d'émission, c'est-à-dire vers des longueurs d'onde supérieures à celles du spectre d'absorption (figure 2.2). On parle de déplacement de Stokes ("*Stokes shift*") [124].

2.1.2 Dynamique intramoléculaire

Les probabilités de transition entre les différents états électroniques sont notées k et exprimées en s^{-1} . La probabilité qu'un photon soit absorbé suivant la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est défini comme :

$$k_{\text{abs}} = \sigma_{\text{abs}}(\lambda) \frac{I(\lambda)}{\frac{hc}{\lambda}} \quad (2.1)$$

$\sigma_{\text{abs}}(\lambda)$ est la section efficace d'absorption (en cm^2) à la longueur d'onde λ , I l'intensité de l'excitation lumineuse (en W/cm^2) et $\frac{hc}{\lambda}$ représente l'énergie (en J) du photon absorbé. Dans l'approximation dipolaire électrique, on peut considérer les molécules comme des petits dipôles ponctuels. Dans ces conditions, la section efficace d'absorption est :

$$\sigma_{\text{abs}} \propto |\langle \phi_{S_0} | \vec{\mu}_{01} \cdot \vec{E} | \phi_{S_1} \rangle|^2 \quad (2.2)$$

où $\vec{\mu}_{01}$ est le moment dipolaire de la transition $S_0 \rightarrow S_1$ et \vec{E} le champ électrique de l'onde excitatrice. Il apparaît donc important de contrôler la polarisation de l'excitation lumineuse afin d'optimiser l'absorption. Ce point est particulièrement important lorsqu'on utilise des molécules fluorescentes pour marquer la membrane plasmique des cellules (voir paragraphe 2.1.3).

Lorsque la molécule a absorbé un photon, il existe plusieurs voies de relaxation vers l'état fondamental. Une seule est radiative. Cette dernière correspond au processus de fluorescence. La probabilité associée à cette relaxation radiative de S_1 vers S_0 est notée k_r et vaut typiquement 10^8 - $10^9 s^{-1}$. Cependant, les molécules peuvent revenir à l'état fondamental par d'autres voies de relaxation non radiative. Il peut s'agir d'une recombinaison directe de S_1 vers S_0 par conversion interne (CI) ou alors de S_1 vers T_1 par un couplage intersystème (CIS). La conversion interne est souvent associée à des changements de conformation de la molécule et k_{CI} vaut typiquement 10^7 - $10^{10} s^{-1}$. Dans le cas du CIS, les molécules se relaxent vers S_0 via l'état triplet T_1 . Cette transition $S_1 \rightarrow T_1 \rightarrow S_0$ est qualifiée d'interdite car elle correspond à un changement d'état de spin. La probabilité de cette transition est donc faible. Elle est de l'ordre de $k_{CIS} \sim 10^5$ - $10^6 s^{-1}$. La transition $T_1 \rightarrow S_0$ est généralement non radiative et sa probabilité vaut typiquement $k_T \sim 10^5$ - $10^6 s^{-1}$. En

conséquence, lorsque les molécules passent dans l'état triplet, elles vont se trouver "piégées" un long moment dans cet état. L'inconvénient est que les molécules dans cet état T_1 peuvent facilement réagir avec l'oxygène ambiant et ainsi subir des réactions photochimiques irréversibles à l'origine du phénomène de photoblanchiment. Le rendement quantique donne la probabilité d'émission d'un photon de fluorescence par rapport à tous les processus de relaxation (radiatif et non radiatif) depuis S_1 . Le rendement quantique est noté ϕ et vaut :

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2.3)$$

où k_{nr} représente la probabilité associée à l'ensemble des processus de relaxation non radiatifs depuis S_1 :

$$k_{nr} = k_{CI} + k_{CIS} \quad (2.4)$$

Evidemment, on privilégiera en microscopie de fluorescence des fluorophores à rendement quantique le plus grand possible, idéalement proche de 1, comme la rhodamine 6G ($\phi=0.95$). On peut définir une section efficace de fluorescence σ_{fluo} comme le produit de la section efficace d'absorption par le rendement quantique :

$$\sigma_{\text{fluo}} = \phi \sigma_{\text{abs}} \quad (2.5)$$

Après avoir absorbé un photon, la molécule restera dans son état excité S_1 un laps de temps très court, appelé la durée de vie τ . τ vaut typiquement quelques nanosecondes et est donné par :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} = \frac{1}{k_r + k_{CI} + k_{CIS}} \quad (2.6)$$

La durée de vie est fortement dépendante de l'environnement immédiat de la molécule. La microscopie résolue en temps comme le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) étudie les interactions moléculaires entre les fluorophores et leur environnement à travers la mesure de τ [125]. Le signal de fluorescence émis par une molécule individuelle peut donc s'écrire (en nombre des coups par seconde) :

$$f_s = \eta_d \sigma_{\text{abs}} \phi \frac{I}{\frac{hc}{\lambda}} = \eta_d \sigma_{\text{fluo}} \frac{I}{\frac{hc}{\lambda}} \quad (2.7)$$

η_d représente l'efficacité de détection de toute la chaîne optique. Ce terme tient compte des pertes au niveau de la traversée des différents composants optiques comme l'objectif, la lentille de tube, les filtres dichroïques, etc. η_d tient compte également de l'efficacité quantique de détection de la caméra utilisée pour imager l'échantillon. L'émission de fluorescence étant isotrope, il faut aussi comptabiliser dans η_d la proportion de signal collecté au regard du signal total émis par une molécule (ce point sera détaillé dans le paragraphe 2.2).

En résumé, les caractéristiques essentielles d'un fluorophore sont sa section efficace d'absorption qui vaut typiquement $\sim 10^{-16} \text{ cm}^2$, son rendement quantique ϕ , et sa durée de vie τ qui est de l'ordre de la ns.

2.1.3 Sondes membranaires

Les marqueurs fluorescents employés en biologie cellulaire peuvent être divisés en deux groupes : la fluorescence est intrinsèque ou extrinsèque. De nombreuses molécules présentes naturellement dans les cellules sont dotées d'une fluorescence intrinsèque, on parle aussi d'autofluorescence. Il s'agit principalement des coenzymes nicotinamides (NAD^+ , NADP^+) et la flavine (FAD), qui interagissent avec des protéines membranaires ou intracellulaires. Afin de contrôler le marquage au mieux et d'obtenir une fluorescence homogène de la membrane, une autre alternative s'offre à nous en ajoutant des molécules de synthèse dont les caractéristiques d'émission de fluorescence sont bien meilleures que les molécules autofluorescentes : σ_{abs} élevée, $\phi \gtrsim 0.5$ et grande photostabilité (la photostabilité correspond au nombre de cycles absorption-émission que peut subir une molécule fluorescente avant d'être photo-dégradée). Ces molécules de synthèse possèdent souvent des cycles aromatiques avec les doubles liaisons conjuguées ce qui permet une délocalisation facile des électrons π .

Les molécules fluorescentes utilisées pour marquer la membrane plasmique sont typiquement des molécules amphiphiles, tout comme les phospholipides. Ces sondes sont synthétisées pour mimer la structure des phospholipides afin de pouvoir s'insérer spontanément dans les bicouches lipidiques. Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé fréquemment la DiO (3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanine Perchlorate) et la DiA ((4-(4-(Dihexadecylamino)styryl)-N-Methylpyridinium Iodide) (Molecular Probes, D275 et D3883 respectivement). Le groupement à l'origine de la fluorescence de ces sondes appartient à la famille des carbocyanines. La structure générale de ces deux molécules est présentée dans la figure 2.3 A_1 et A_2 . Dans le cas de la DiO, le fluorophore est composé d'une paire de cycles aromatiques liés par une courte chaîne de trois carbones. La longueur de cette chaîne et la présence d'oxygène sur les cycles déterminent les propriétés d'absorption et d'émission de cette molécule. Afin qu'elle puisse s'insérer dans la membrane, deux longues chaînes carbonées sont greffées aux groupements amines du fluorophore (figure 2.3 A_1). Ainsi, la partie aromatique de la molécule reste en contact avec l'eau, pendant que les chaînes carbonées hydrophobes s'insèrent dans la bicouche lipidique, comme illustré dans la figure 2.3 B_1 . La deuxième sonde (DiA) possède également deux cycles aromatiques, reliés par deux carbones. De façon similaire à la DiO, une longue chaîne d'acides gras est attachée au cycle par une fonction amine (figure 2.3 A_2). La présence d'une seule chaîne carbonée fait que la DiA s'organise différemment dans la membrane, figure 2.3 B_2 . La DiA et la DiO sont fréquemment utilisées dans les études de fluidité membranaire [57, 58, 126]. Ces études indiquent que ces molécules diffusent relativement rapidement dans la bicouche avec un coefficient de diffusion de l'ordre de $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Elles permettent un marquage spécifique de la membrane plasmique car elles possèdent une plus grande affinité pour la membrane plasmique que pour les autres membranes des compartiments internes. Certains protocoles de marquage permettent d'obtenir une fluorescence très homogène de toute la surface de la membrane, évitant l'internalisation de la sonde et la perturbation des conditions physiologiques des cellules. Ces deux molécules fluorescentes sont peu solubles dans l'eau. Les maxima d'absorption et l'émission de la DiO mesurés dans une bicouche lipidique sont 484 et 501 nm respectivement (figure 2.3 C_1). Les pics d'absorption et l'émission de

la DiA mesurés dans les mêmes conditions sont autour de 460 et 580 nm (figure 2.3 C₂). Le spectre d'émission de la DiA est très large ce qui permet sa détection sur une large gamme spectrale. Ces deux molécules possèdent un bon rendement quantique et leur durée de vie dans des membranes est de l'ordre ~ 1 ns. De plus, elles sont peu sensibles au photoblanchiment.

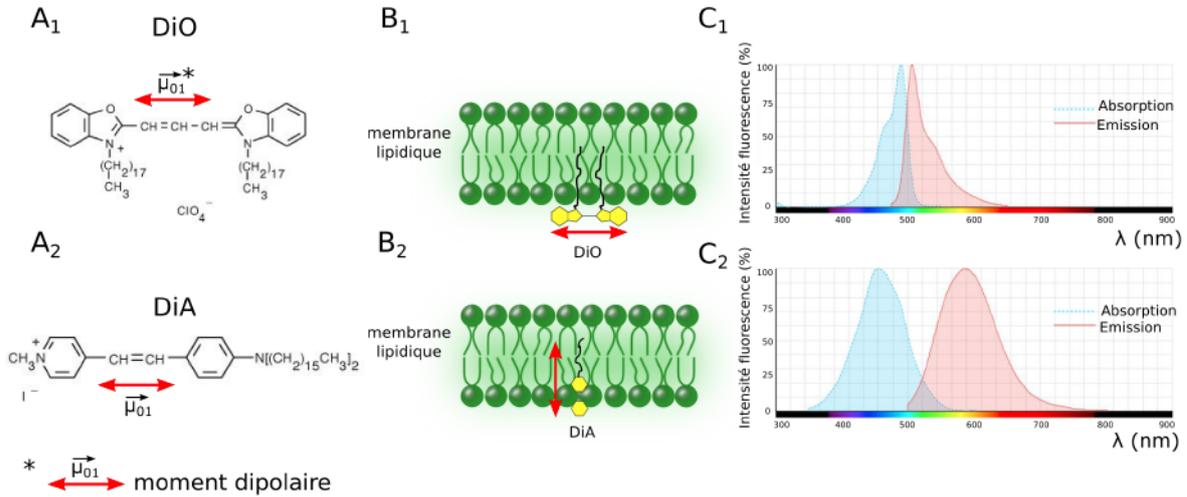


FIGURE 2.3 – Marqueurs fluorescents membranaires : (A) représentation des structures chimiques de sondes DiO (A₁) et DiA (A₂). (B) Positionnement des sondes au sein d'une bicouche phospholipidique. (C) Spectre d'absorption (en bleu) et d'émission (en rouge) de la DiO et la DiA. Dans le cas de la DiO, les maximums d'absorption et d'émission sont respectivement situés à 484 et 501 nm ; dans le cas de la DiA ils sont de 460 et 580 nm. Les images A₁, A₂ et C₁, C₂ sont extraites du site de Molecular Probes.

La façon dont les molécules telles la DiA et la DiO vont s'insérer dans la membrane va influencer notablement la probabilité d'absorption k_{abs} et, par conséquent, agir sur le signal de fluorescence (voir l'équation 2.2). En effet, σ_{abs} d'un fluorophore dépend du produit scalaire $\vec{\mu}_{01} \cdot \vec{E}$. Le signal de fluorescence enregistré pour la DiO et la DiA va donc varier avec la polarisation de l'excitation laser. L'orientation du moment $\vec{\mu}_{01}$ pour ces deux molécules est donnée dans la figure 2.3. Dans le cas de la DiO, ce moment dipolaire de transition est parallèle au plan de la membrane (figure 2.3 B₁) [127, 128]. Dans le cas de la DiA, il est perpendiculaire au plan de la membrane (figure 2.3 B₂) [128]. L'émission d'un fluorophore est optimale lorsque la polarisation de la lumière excitatrice (i.e. \vec{E}) est parallèle au dipôle de transition $\vec{\mu}_{01}$. Ceci a été vérifié expérimentalement grâce à des mesures d'intensité de fluorescence en utilisant ces deux sondes et en changeant l'état de polarisation du faisceau laser d'excitation. Ainsi, il apparaît sur la figure 2.4 que la fluorescence de la DiO est maximale lorsque \vec{E} est parallèle à la surface (en polarisation s, transverse électrique, figure 2.4 C₁), alors que pour la DiA c'est l'inverse. En effet, pour cette dernière, la fluorescence est maximale lorsque \vec{E} est perpendiculaire à l'interface (en polarisation p, transverse magnétique, figure 2.4 C₂). Le rapport du signal de fluorescence moyen en polarisation s ($\langle f_s \rangle$) par rapport à celui en polarisation

$p \langle f_p \rangle$ vaut $\langle f_s \rangle / \langle f_p \rangle = 0.7$ pour la DiA et 1.3 pour la DiO. Ce résultat est tout à fait attendu compte tenu de l'orientation du dipôle de transition $\vec{\mu}_{01}$. Le signal de fluorescence pour chaque condition de la figure 2.4 après la soustraction du bruit de fond, ainsi que le signal moyen $\langle f \rangle$, sont résumés dans le tableau 2.1.

TABLEAU 2.1 – Tableau récapitulatif du signal d'émission des sondes en polarisation "s" et "p". N représente nombre des cellules.

sonde	$\langle f_{pol_s} \rangle / \langle f_{pol_p} \rangle$	σ	N
DiO	1.3	0.1	4
DiA	0.7	0.1	3

Un changement du pH peut avoir pour conséquence la protonation ou la déprotonation des groupes fonctionnels présents sur des nombreux fluorophores, provoquant ainsi des modifications du rendement quantique, de la section efficace d'absorption et des profils des spectres d'absorption et/ou d'émission. Par exemple, le maximum d'absorption de la fluorescéine est décalé d'une cinquantaine de nanomètres selon la charge de la molécule en solution (à pH ~ 2 sous la forme de cations et à pH ~ 6 sous la forme de di-anion) [129]. Les fluorophores destinés à l'imagerie des systèmes vivants sont conçus pour fonctionner à pH physiologique ($\sim 7-7.5$). Dans le cas de la DiO, son cycle aromatique oxazole (figure 2.3 A_1) est protoné à des pH > 1 (pKa ~ 0.8), ce qui empêche toute modification de ses propriétés. De plus, lorsqu'on ajoute dans la solution des molécules ou des ions capables de former des complexes avec le fluorophore, ceci peut provoquer une inhibition du processus de fluorescence. Ces molécules ou ions jouent alors le rôle de "quencher" (atténuateurs) de la fluorescence. Par exemple, il est possible de diminuer le rendement quantique et la durée de vie de la fluorescéine par adjonction dans le milieu d'un "quencher" tel que l'oxygène [130]. De façon analogue, l'augmentation de la concentration d'un fluorophore ne permet pas d'augmenter indéfiniment le signal fluorescent à cause des interactions mutuelles entre les molécules fluorescentes (on parle de "self-quenching").

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé d'autres marqueurs membranaires, comme des fluorophores conjugués avec des phospholipides. J'ai employé ce type de marqueur pour les mesures d'adhésion de vésicules géantes fluorescentes. Le fluorophore ATTO 488 (ATTO-TEC, AD 488-161) a été greffé au niveau de la tête polaire du phospholipide DOPE, figure 2.5 A. Le maximum d'absorption de l'ATTO 488, greffé à son phospholipide est situé à 507 nm. Le maximum d'émission est à 534 nm (figure 2.5 B). La charge de l'ATTO 488 à pH physiologique est de -1 (figure 2.5 A) ce qui veut dire que la membrane d'une vésicule marquée avec de l'ATTO 488, à pH légèrement acide, aura une charge effective négative.

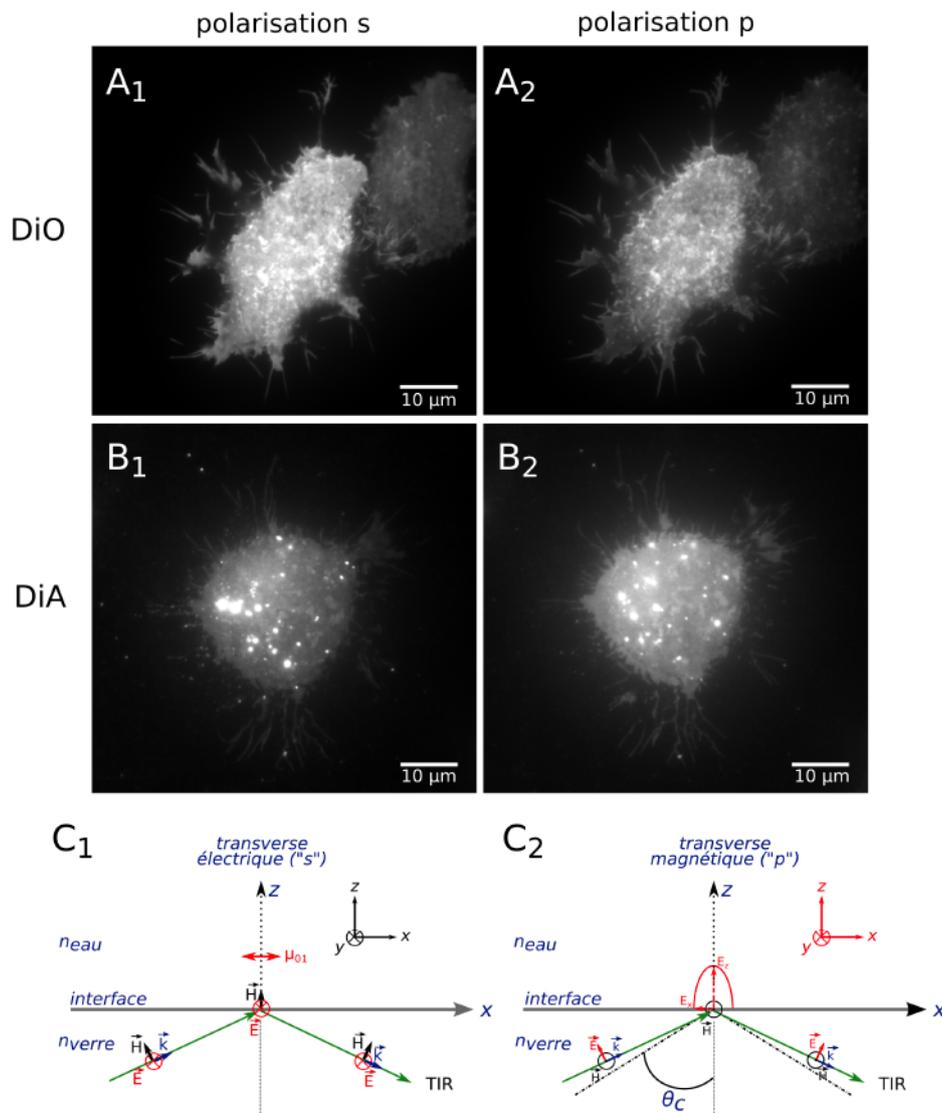


FIGURE 2.4 – Intensité de fluorescence en fonction de l'état de la polarisation du faisceau laser d'excitation en mode TIRF (i.e. réflexion totale interne). La polarisation s (A_1 et B_1) correspond à \vec{E} parallèle à l'interface et p (A_2 et B_2) lorsque \vec{E} est perpendiculaire à l'interface. Il s'agit de cellules MCF7 en adhésion sur une lamelle de verre à 37°C. Elles ont été marquées avec les deux sondes membranaires la DiO (A_1 et A_2) et la DiA (B_1 et B_2). La fluorescence a été collectée à l'aide d'un objectif x60 (ON=1.45) avec une excitation laser à $\lambda=488$ nm ($t_{\text{acquis}}=50$ ms et $P_{\text{laser}}=5$ W/cm²).

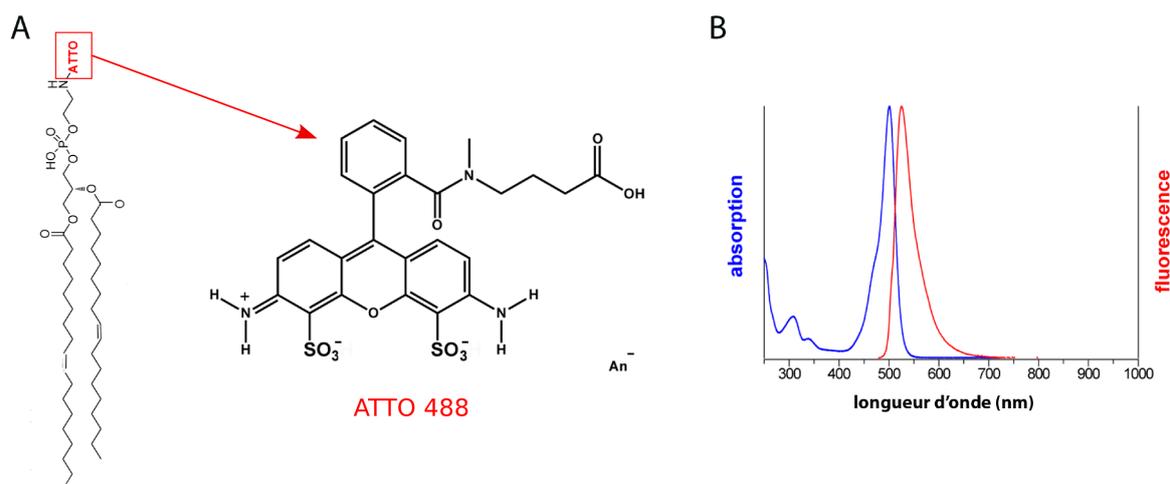


FIGURE 2.5 – (A) Structure de l'ATTO 488 conjuguée au phospholipide DOPE. (B) Spectre d'absorption et fluorescence de la molécule DOPE-ATTO 488 dans l'éthanol. Le maximum d'absorption est à 507 nm et le maximum d'émission à 534 nm. Les images sont extraites du site d'ATTO-TEC.

2.1.4 Nanocristaux semi-conducteurs (Quantum dots)

Les luminophores inorganiques, comme les nanocristaux semi-conducteurs, présentent une alternative intéressante pour les expériences qui nécessitent des temps d'exposition longs. En effet ces derniers sont beaucoup plus photostables que les sondes organiques. Les boîtes quantiques, appelées également *Quantum Dots* (QDots), sont des cristaux de forme sphérique et de dimensions nanométriques ($\sim 5-10$ nm). Ils sont très souvent composés de deux parties : un cœur constitué d'un premier matériau semi-conducteur, protégé par une fine coquille d'un second matériau semi-conducteur. En plus de leur grande résistance au photoblanchiment, ils possèdent un très large spectre d'absorption, permettant l'excitation à différentes longueurs d'ondes. Le spectre d'émission est quant à lui très étroit (figure 2.6). Ces sondes posent cependant certains problèmes pour les applications dans les systèmes vivants : leur toxicité par exemple limite leur utilisation dans les cellules vivantes [131]. Ce problème peut être contourné en fonctionnalisant la surface des Quantum Dots avec des ligands. Cependant, cela augmente considérablement leur taille jusqu'à ~ 20 nm, compromettant ainsi certaines applications. Malgré tout, ils s'adaptent très bien à d'autres applications biologiques, notamment en microscopie NEFM, où ils forment une surface biocompatible [105]. Ainsi, nous avons exploité le potentiel des boîtes quantiques, immobilisées dans une couche de PMMA (polyméthacrylate de méthyle), lors de l'étape de calibration de notre montage expérimental. Les étapes de fonctionnalisation des surfaces avec les Quantum Dots "Fort Orange" et la calibration du montage seront détaillées dans le prochain chapitre. Les boîtes quantiques que j'ai utilisées se composent d'un cœur de cadmium-sélénium (CdSe) et d'une coquille de zinc-soufre (ZnS) (Evident Technologies). Cette structure cœur-coquille est présentée sur la figure 2.6 A. Elles ont un diamètre total d'environ 9

nm, si l'on tient compte de la couche de ligands de surface destinée à empêcher l'aggrégation des nanocristaux en solution. Leur maximum d'émission dans le PMMA est situé vers 600 nm, avec une largeur à mi-hauteur inférieure à 30 nm (figure 2.6 B). Enfin, leur rendement quantique est très proche de 1 dans le PMMA [132].

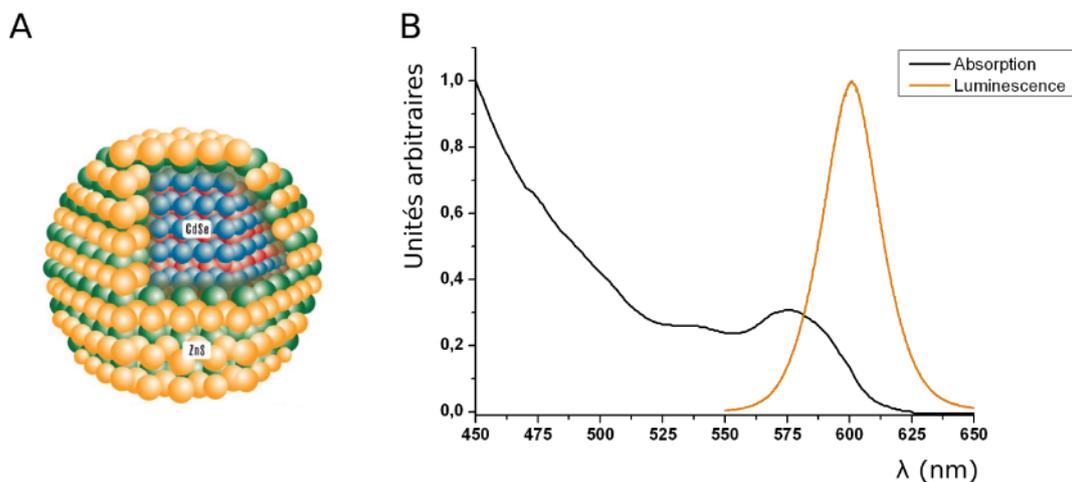


FIGURE 2.6 – Boîte quantique "Fort Orange" (Evident Technologies). (A) Schéma de la structure cœur-coquille d'un nanocristal composée d'un cœur en CdSe et d'une coquille en ZnS. (B) Spectres d'absorption et d'émission des boîtes quantiques "Fort Orange". Le spectre d'absorption a été enregistré dans le toluène et le spectre d'émission a été mesuré sur une couche des QDots en PMMA.

2.2 Propriétés de l'émission d'une molécule à proximité d'une interface

L'objectif de ma thèse a été de mettre en place un outil de microscopie optique permettant de mesurer la distance qui sépare la membrane plasmique de la surface. Or, comme je vais le montrer dans ce paragraphe, le signal de fluorescence émis par une molécule est fortement modifié si la distance z qui la sépare de la surface est $\lesssim \lambda$. Il est possible d'évaluer les modifications induites par la distance z , en calculant la puissance rayonnée par une molécule fluorescente, autrement dit la distribution angulaire de la lumière émise par la molécule. On parle également de diagramme de rayonnement. Pour ce faire, je me suis inspirée des travaux de W. Lukosz qui datent de la fin des années 70 [133, 134, 135].

Les molécules fluorescentes contenues dans la membrane plasmique peuvent être approximées par un ensemble de dipôles oscillants. On peut alors considérer deux cas : les dipôles sont orientés perpendiculairement à la membrane et donc à l'interface (comme dans le cas de la DiA) ou paral-

lèlement à l'interface (comme pour la DiO). L'interface en question sépare les deux milieux : l'eau d'indice $n_1=1.33$ et le verre d'indice $n_2=1.53$ ($n = n_2/n_1 > 1$). Les dipôles D (i.e. les molécules fluorescentes) sont situés dans le milieu 1 (i.e. dans l'eau) comme schématisé sur la figure 2.7. Un dipôle oscillant situé à une certaine distance z de l'interface émet une onde électromagnétique dont les caractéristiques dépendent principalement de l'orientation de ce dernier. Pour calculer la puissance rayonnée dans les deux milieux d'indice n_1 et n_2 , il est indispensable de tenir compte de la transmission et de la réflexion de l'onde émise par le dipôle au niveau de l'interface verre/eau. Dans le milieu 2 (verre), la puissance rayonnée correspond au produit de puissance émise dans l'eau par le coefficient de transmission (onde I_t sur la figure 2.7). Dans le milieu 1 (eau), cette puissance rayonnée correspond aux interférences entre l'onde (I) émise par le dipôle et celle réfléchie sur l'interface (I_r sur la figure 2.7).

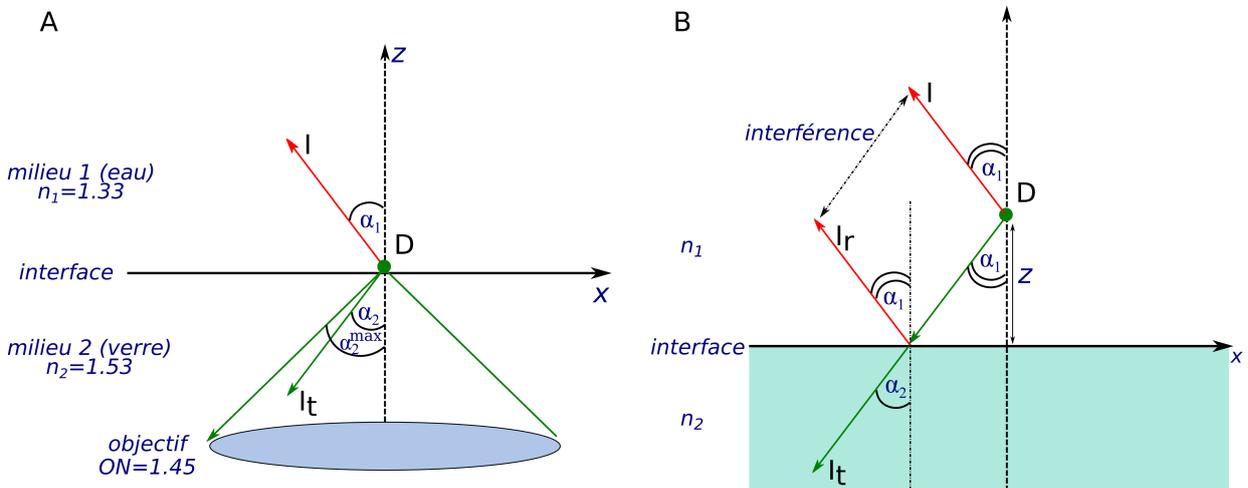


FIGURE 2.7 – (A) Représentation 2D des données du problème pour un dipôle D situé dans le milieu d'indice n_1 . Le signal est collecté par un objectif d'ouverture numérique ON situé dans le milieu d'indice n_2 . α_1 est l'angle d'incidence sur l'interface dans le milieu n_1 et α_2 est un angle d'incidence dans le milieu n_2 . α_2^{max} correspond à l'angle maximal obtenu avec l'objectif d'ON=1.45. (B) Zoom sur le dipôle D. I , I_r et I_t sont respectivement les rayons émis par le dipôle dans le milieu 1, réfléchis sur l'interface dans le milieu 1 et transmis dans le milieu 2.

2.2.1 Cas d'un ensemble de dipôles, perpendiculaires à l'interface

On considère ici un ensemble de dipôles, tous identiques, situés à une distance z de l'interface et tous perpendiculaires à cette dernière (figure 2.8 A). Concernant la transmission de l'onde dans le milieu 2, l'expression de la puissance rayonnée $P_{\perp}(\alpha_2)$ est donnée par deux équations, l'une valable pour $0 \leq \alpha_2 \leq \alpha_{2c}$ et l'autre pour $\alpha_{2c} \leq \alpha_2 \leq \frac{\pi}{2}$; α_{2c} est l'angle critique qui vaut $\alpha_{2c} = \text{Arcsin} \frac{1}{n}$ avec

$n = \frac{n_2}{n_1}$:

$$P_{\perp}(\alpha_2) = \frac{3}{8\pi} n^5 \frac{\sin^2 2\alpha_2}{(n\sqrt{1 - n^2 \sin^2 \alpha_2} + \cos \alpha_2)^2} \text{ pour } 0 \leq \alpha_2 \leq \alpha_{2c} \quad (2.8)$$

après l'angle critique α_{2c} , on entre dans le domaine "évanescents" et $P_{\perp}(\alpha_2)$ vaut :

$$P_{\perp}(\alpha_2, z) = \frac{3}{8\pi} n^5 \frac{\sin^2 2\alpha_2}{\sin^2 \alpha_2 (n^4 - 1) + 1 - n^2} e^{-\frac{4\pi}{\lambda} (\sqrt{n^2 \sin^2 \alpha_2 - 1}) z} \text{ pour } \alpha_{2c} \leq \alpha_2 \leq \frac{\pi}{2} \quad (2.9)$$

Le facteur $3/8\pi$ dans les deux équations est un facteur de normalisation. Ces équations permettent de calculer la puissance rayonnée par cet ensemble de dipôles perpendiculaires, quelle que soit la distance z , tant que $z \lesssim \lambda$.

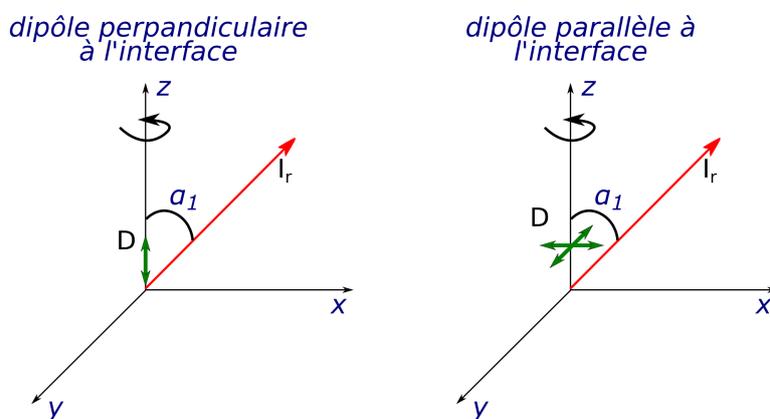


FIGURE 2.8 – Illustration du positionnement d'un dipôle par rapport à l'interface : (A) un dipôle perpendiculaire et (B) des dipôles parallèles à l'interface, orientés selon l'axe x ou y.

Dans le milieu 1, la puissance rayonnée par les dipôles résulte des interférences de deux ondes (I et I_r). La puissance $P_{\perp}(\alpha_1)$ est là encore donnée par deux équations, la première pour $0 \leq \alpha_1 \leq \alpha_{1B}$ et la deuxième pour $\alpha_1 \geq \alpha_{1B}$; α_{1B} étant l'angle de Brewster ($\alpha_{1B} = \text{Arctg} n = \text{Arctg} \frac{n_2}{n_1}$) :

$$P_{\perp}(\alpha_1, z) = \frac{3}{8\pi} \sin^2 \alpha_1 \left[1 + (r_p)^2 + 2r_p \cos \left(\frac{4\pi}{\lambda} z \cos \alpha_1 \right) \right] \text{ pour } 0 \leq \alpha_1 \leq \alpha_{1B} \quad (2.10)$$

avec le coefficient r_p qui vaut :

$$r_p = \frac{n \cos \alpha_1 - \cos \alpha_2}{n \cos \alpha_1 + \cos \alpha_2} > 0 \quad (2.11)$$

$$P_{\perp}(\alpha_1, z) = \frac{3}{8\pi} \sin^2 \alpha_1 \left[1 + (r'_p)^2 - 2r'_p \cos \left(\frac{4\pi}{\lambda} z \cos \alpha_1 \right) \right] \text{ pour } \alpha_{1B} \leq \alpha_1 \leq \frac{\pi}{2} \quad (2.12)$$

avec le coefficient r'_p qui vaut :

$$r'_p = \frac{\cos \alpha_2 - n \cos \alpha_1}{n \cos \alpha_1 + \cos \alpha_2} > 0 \quad (2.13)$$

L'angle de Brewster est celui pour lequel l'onde réfléchie est nulle, c'est à dire $r_p=0$ et $r'_p=0$.

2.2.2 Cas d'un ensemble de dipôles orientés aléatoirement, parallèlement à l'interface

De la même façon, nous pouvons calculer la puissance rayonnée par un ensemble de dipôles, tous parallèles à l'interface, mais orientés aléatoirement suivant (x,y). Tous ces dipôles sont donc compris dans un même plan situé à une distance z de l'interface. L'expression de la puissance rayonnée $P_{\parallel}(\alpha_2)$ dans le milieu 2 se décompose en deux équations :

pour $0 \leq \alpha_2 \leq \alpha_{2c}$:

$$P_{\parallel}(\alpha_2) = \frac{3}{4\pi} n^3 \cos^2 \alpha_2 \left[\frac{1 - n^2 \sin^2 \alpha_2}{(n\sqrt{1 - n^2 \sin^2 \alpha_2} + \cos \alpha_2)^2} + \frac{1}{(\sqrt{1 - n^2 \sin^2 \alpha_2} + n \cos \alpha_2)^2} \right] \quad (2.14)$$

et pour $\alpha_{2c} \leq \alpha_2 \leq \frac{\pi}{2}$:

$$P_{\parallel}(\alpha_2, z) = \frac{3}{4\pi} \frac{n^3}{n^2 - 1} \cos^2 \alpha_2 e^{-\frac{4\pi}{\lambda} z \sqrt{n^2 \sin^2 \alpha_2 - 1}} \left[1 + \frac{n^2 \sin^2 \alpha_2 - 1}{(n^2 + 1) \sin^2 \alpha_2 - 1} \right] \quad (2.15)$$

Dans le milieu 1, l'expression de $P_{\parallel}(\alpha_1)$ est donnée par :

pour $0 \leq \alpha_1 \leq \alpha_{1B}$:

$$P_{\parallel}(\alpha_1, z) = \frac{3}{16\pi} \left[1 + (r'_s)^2 - 2(r'_s) \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} \cos \alpha_1 z\right) \right] + \cos^2 \alpha_1 \left[1 + (r_p)^2 - 2r_p \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} \cos \alpha_1 z\right) \right] \quad (2.16)$$

avec les coefficients de réflexion r'_s et r_p qui valent :

$$r'_s = \frac{n \cos \alpha_2 - \cos \alpha_1}{\cos \alpha_1 + n \cos \alpha_2} > 0 \quad (2.17)$$

et

$$r_p = \frac{n \cos \alpha_1 - \cos \alpha_2}{n \cos \alpha_1 + \cos \alpha_2} > 0 \quad (2.18)$$

et pour $\alpha_{1B} \leq \alpha_1 \leq \frac{\pi}{2}$:

$$P_{\parallel}(\alpha_1, z) = \frac{3}{16\pi} \left[1 + (r'_s)^2 - 2(r'_s) \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} \cos \alpha_1 z\right) \right] + \cos^2 \alpha_1 \left[1 + (r'_p)^2 + 2r'_p \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} \cos \alpha_1 z\right) \right] \quad (2.19)$$

avec le coefficient de réflexion r'_p qui vaut :

$$r'_p = \frac{\cos \alpha_2 - n \cos \alpha_1}{n \cos \alpha_1 + \cos \alpha_2} > 0 \quad (2.20)$$

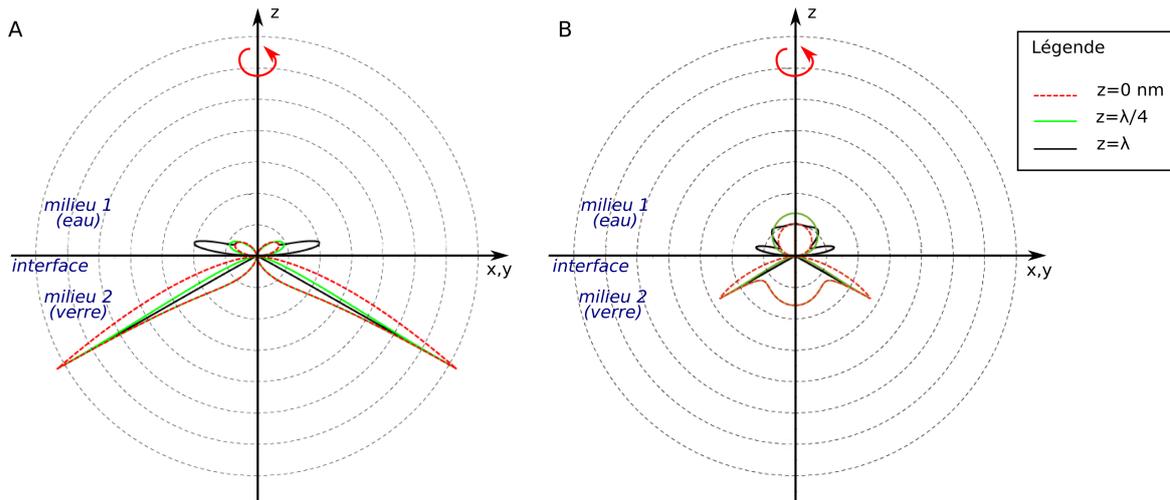


FIGURE 2.9 – Diagrammes de rayonnement pour un ensemble de dipôles perpendiculaires (A) et un ensemble de dipôles orientés aléatoirement, parallèlement (B) à l’interface. Trois tracés sont superposés sur chaque diagramme : $z=0$ (pointillé rouge), $z=\lambda/4$ (courbe verte) et $z=\lambda$ (courbe noire).

2.2.3 Diagrammes de rayonnement

Les équations qui donnent P_{\perp} et P_{\parallel} permettent de tracer les diagrammes de rayonnement pour deux ensembles de molécules. La figure 2.9 présente les diagrammes de rayonnement en coordonnées polaires pour un ensemble de dipôles perpendiculaires (figure 2.9 A), modélisé à partir des équations 2.14-2.17, et un ensemble de dipôles orientés aléatoirement, parallèlement à l’interface (figure 2.9 B), modélisé à partir des équations 2.18-2.21. Trois situations sont représentées sur chaque diagramme : pour $z=0$, $z=\lambda/4$ et $z=\lambda$. Les deux diagrammes présentés sur la figure 2.9 sont invariants par rotation autour de l’axe 0-z. Les diagrammes de rayonnement des dipôles perpendiculaires et parallèles sont complètement différents et varient notablement avec la distance z qui sépare les dipôles de l’interface. On remarque que l’émission des dipôles est majoritaire dans le milieu 2 (verre). De plus, les dipôles localisés très proche de l’interface ($z \approx 0$) émettent quasiment la totalité de la puissance dans le milieu d’indice élevé (c’est à dire le substrat en verre). Cet effet est fortement accentué par la contribution de l’onde évanescente (quand $\alpha_2 > \alpha_{2c}$). Lorsqu’on s’éloigne de l’interface ($z > \lambda$), cette contribution, due aux ondes évanescentes, diminue rapidement en faveur de l’émission dans le milieu 1 (eau).

2.2.4 Signal collecté par l’objectif

L’objectif qui collecte le signal de fluorescence est placé du côté du milieu d’indice n_2 . Il s’agit d’un objectif à immersion à huile. La figure 2.9 montre qu’il est important de disposer d’un objectif de grande ON, afin de collecter un maximum de puissance dans le milieu 2. Notamment dans le cas d’un dipôle perpendiculaire, où l’émission est concentrée dans la direction de l’angle critique

qu'un objectif de faible ouverture numérique ($ON < 1$) ne permettrait pas de collecter. On peut définir une efficacité de collection ε liée à l'ouverture numérique de l'objectif. ε correspond alors à la probabilité de détecter un photon dans l'angle solide défini par l'ouverture numérique de l'objectif ($\alpha_2^{max} = \arcsin \frac{ON}{n_2}$). ε est donné par :

$$\varepsilon(z) = \frac{2\pi \int_0^{\alpha_2^{max}} P(\alpha_2, z) \sin \alpha_2 d\alpha_2}{2\pi \int_0^{\frac{\pi}{2}} P(\alpha_2, z) \sin \alpha_2 d\alpha_2 + 2\pi \int_0^{\frac{\pi}{2}} P(\alpha_1, z) \sin \alpha_1 d\alpha_1} \quad (2.21)$$

$\varepsilon(z)$ est donc compris entre 0 et 1. La figure 2.10 donne l'évolution de ε en fonction de z pour différents objectifs à immersion et pour les deux orientations de dipôles. Il en résulte que plus l'ouverture numérique est importante, plus on collecte de signal. Et ε varie fortement plus on se rapproche de l'interface, typiquement lorsque $z < \lambda$. A l'opposé ε ne varie quasiment plus lorsque $z > \lambda$.

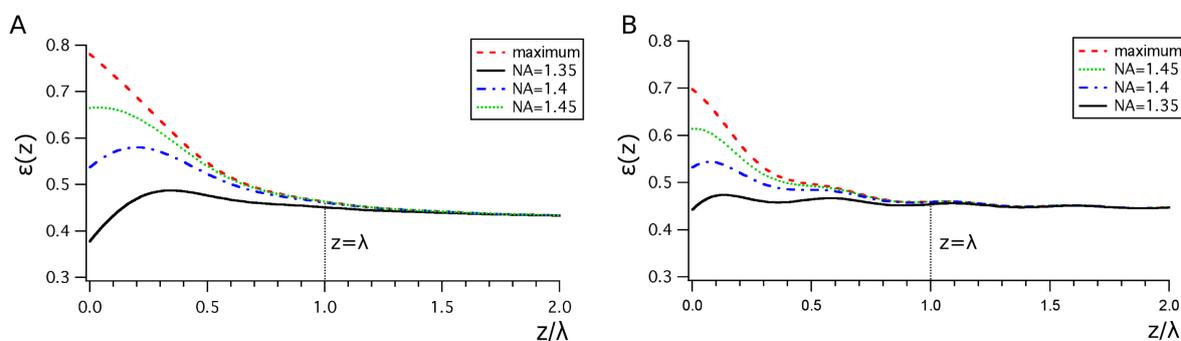


FIGURE 2.10 – Evolution de ε en fonction de z pour un ensemble de dipôles perpendiculaires (A) et parallèles (B) à l'interface. Ces courbes ont été calculées pour des objectifs à immersion d'ouverture numérique 1.35, 1.4, 1.45 et d'une ouverture maximale de 2π stéradian (i.e. $\alpha_2^{max} = \pi/2$)

2.3 Epifluorescence

Il existe deux configurations d'éclairage et de collection possibles en microscopie optique : la diascopie et l'épiscopie. La diascopie consiste à utiliser un condenseur pour éclairer l'échantillon et un objectif pour collecter le signal transmis par l'échantillon. C'est la configuration la plus répandue en biologie. Il s'agit par exemple de microscopie à contraste de phase ou DIC, etc. L'épiscopie, quant à elle utilise l'objectif à la fois pour collecter le signal et illuminer l'échantillon (dans ces conditions on collecte le signal rétrodiffusé par l'échantillon). La mise en œuvre d'un montage par épiscopie est toujours plus commode qu'en diascopie, pour la simple raison qu'elle ne nécessite pas de superposer le faisceau d'éclairage sur la voie de collection. En effet, l'objectif joue aussi le rôle de condenseur en épiscopie. De plus, comme je viens de le montrer dans le paragraphe précédent, les molécules émettent préférentiellement du côté du substrat en verre lorsqu'elles sont proches

de l'interface. On détectera alors plus de signal de fluorescence en collectant le signal du côté du verre. L'épiscopie apparaît donc comme la configuration idéale pour la fluorescence. Les progrès récents dans le développement des nouvelles technologies (caméras, filtres interférentiels) et des composants optiques (objectifs) permettent de rendre l'épi-fluorescence de plus en plus performante et de l'adapter aisément à de nouvelles applications. Son avantage majeur en biologie et biochimie est lié à la sensibilité de détection, ce qui constitue un point essentiel en microscopie et spectroscopie de molécule unique, par exemple.

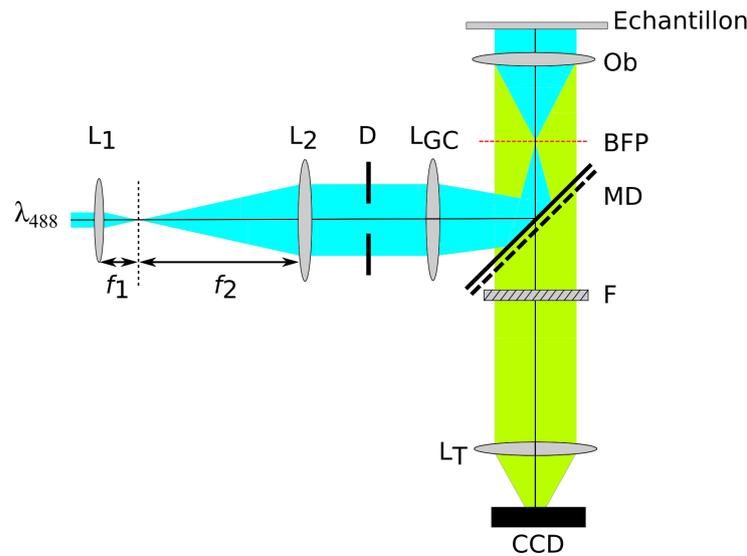


FIGURE 2.11 – Structure de base d'un montage en épi-fluorescence. Le chemin d'excitation est indiqué en bleu ; le signal de fluorescence est en vert. Les lentilles L_1 et L_2 de focale respective f_1 et f_2 composent un "beam expander". La taille du faisceau est ajustée à l'aide d'un diaphragme D. L_{GC} est la lentille qui permet d'avoir un éclairage grand champ sur l'échantillon. Elle fait converger le faisceau laser sur le plan focal arrière de l'objectif (BFP). Le miroir dichroïque MD renvoie le faisceau laser sur l'échantillon en direction de l'objectif Ob. Un filtre passe haut (F) est placé sur la voie de collection et finalement la lentille de tube L_T permet d'imager l'échantillon sur une caméra CCD.

Le challenge, lors du développement d'un microscope en épi-fluorescence, repose sur la mise en place d'un système optique permettant d'obtenir un très bon rapport signal sur bruit. Pour cela, le signal d'excitation laser rétrodiffusé par l'échantillon doit être parfaitement éliminé sur la voie de collection, sinon le signal de fluorescence sera indétectable. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser une bonne lame dichroïque et un bon filtre de collection (type passe-haut). La structure de base des dispositifs que j'ai assemblée au cours de mes travaux de thèse est représentée sur la figure 2.11. Dans le but d'élargir le champ d'observation, la taille du spot laser est étendue à travers un dispositif optique appelé "beam expander" (figure 2.11 : $L_1 - L_2$). Ce dernier se compose de deux lentilles qui collimatent et étendent le diamètre du faisceau laser. Un diaphragme D est placé après

la lentille L_2 . Il sert à ajuster la taille de la zone d'excitation sur l'échantillon. Il joue donc le rôle d'un diaphragme de champ. La lumière incidente est ensuite spectralement affinée à l'aide d'un miroir dichroïque (figure 2.11 MD) qui dirige le faisceau d'excitation vers l'objectif. Le faisceau d'excitation est focalisé sur le plan focal arrière de l'objectif (BFP) à l'aide de la lentille L_{GC} . Les rayons lumineux émergent alors à la sortie de l'objectif, tous parallèles entre eux. Il est à noter que le BFP se situe en général au niveau de la pupille arrière de l'objectif du microscope. La lumière émise par l'échantillon est collectée par le même objectif. Une dernière sélection de la longueur d'onde se fait via un filtre d'émission de type passe-haut (figure 2.11 F). Il sélectionne le signal de fluorescence et bloque le signal à la longueur d'onde d'excitation laser. Les microscopes sont souvent équipés d'une roue de différents cubes qui permet de changer de jeu de filtres et d'observer différents marqueurs dans le même échantillon. Enfin, une image de la fluorescence de l'échantillon est formée à l'aide de la lentille de tube (L_T) sur une caméra de type CCD (figure 2.11 CCD).

2.4 Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

2.4.1 Principe de la microscopie TIRF

L'étude du phénomène d'adhésion repose sur l'observation de la membrane en contact avec la surface. Pour cela, la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) est parfaitement adaptée. Elle est par ailleurs compatible avec de nombreuses techniques de microscopie, comme le contraste de phase, le DIC et d'autres outils plus sophistiqués comme le PALM, le STED le NEFM [136]. Les montages expérimentaux TIRF sont réalisables aussi bien sur un microscope droit, qu'inversé. Une vue d'ensemble des différents dispositifs TIRF sera présentée à la fin de ce chapitre (paragraphe 2.4.3).

La microscopie TIRF repose sur l'utilisation d'une onde évanescente pour exciter l'échantillon. Cette onde évanescente est créée au niveau de l'interface entre le milieu le plus réfringent et le moins réfringent (par exemple l'interface verre/eau), si l'angle incident θ du faisceau laser incident est supérieur à l'angle critique θ_c ($\theta > \theta_c$). On observe alors un phénomène de réflexion totale dans le verre (figure 2.12). "L'intensité"¹ de l'onde évanescente dans l'eau décroît exponentiellement sur une distance typique de quelques centaines de nanomètres, figure 2.12.

1. La notion d'intensité dans le cas d'une onde évanescente est un abus de langage. Cette "intensité" est définie comme $I = |E|^2$ puisque seul le champ \vec{E} va influencer la probabilité d'absorption k_{abs} des fluorophores.

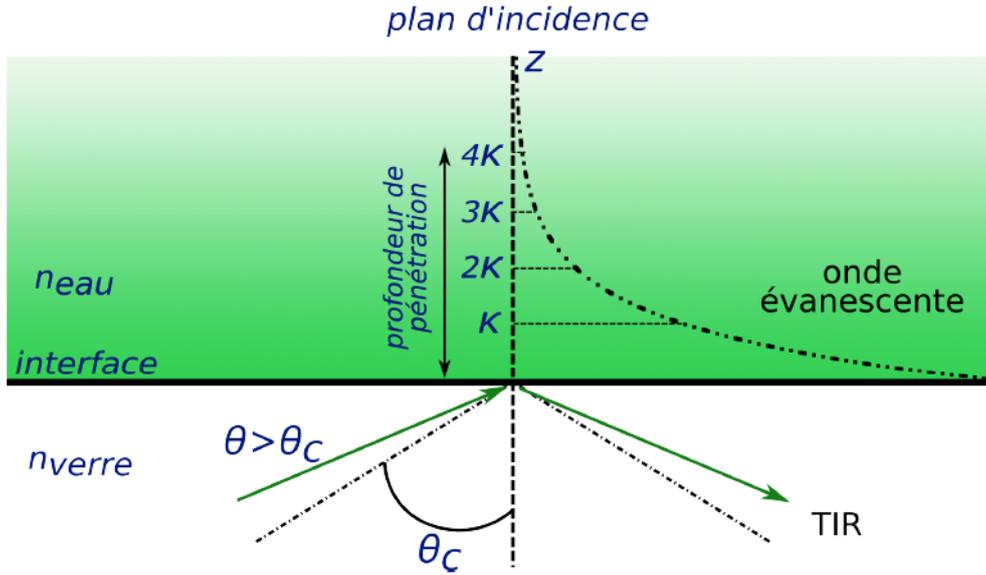


FIGURE 2.12 – Réflexion totale interne : une onde évanescente est générée si $\theta > \theta_c$. La profondeur d'atténuation κ est donnée par l'équation 2.23. La profondeur de pénétration vaut $\approx 4\kappa$.

2.4.2 Approche théorique

Dans ce paragraphe je vais décrire les grandeurs caractéristiques de l'onde évanescente. Considérons le cas d'une seule interface : verre/eau avec $n' = \frac{n_{\text{eau}}}{n_{\text{verre}}}$ et un faisceau laser se propageant dans le verre, dirigé vers l'interface (figure 2.12). L'onde évanescente est alors générée pour les angles θ supérieurs à l'angle critique θ_c tel que :

$$\theta_c = \arcsin(n') \quad (2.22)$$

Sachant que $n_{\text{verre}}=1.53$ et $n_{\text{eau}}=1.33$ à 488 nm, alors $\theta_c \sim 60.4^\circ$ pour l'interface verre/eau. Pour des angles inférieurs à l'angle critique θ_c , la lumière est réfractée selon les lois de Snell-Descartes. En d'autres mots, une partie de la lumière est réfléchi et l'autre partie transmise. "L'intensité" de l'onde évanescente décroît exponentiellement avec la distance z (figure 2.12). Si l'interface est en $z=0$, alors :

$$I(z) = I(z=0) e^{-z/\kappa} \quad (2.23)$$

La distance d'atténuation de l'onde évanescente, ou profondeur d'atténuation, est notée κ . Elle varie avec l'angle d'incidence θ , excepté pour θ_c où elle vaut ∞ . Pour $\theta > \theta_c$, κ est donnée par :

$$\kappa(\theta) = \frac{\lambda}{4\pi} \frac{1}{\sqrt{n_{\text{verre}}^2 \sin^2 \theta - n_{\text{eau}}^2}} \quad (2.24)$$

"L'intensité" $I(z)$ ne devient négligeable que pour une profondeur de pénétration à $z \gtrsim 4\kappa$ ($\frac{I(z=4\kappa)}{I(z=0)}=0.018$). Sachant que κ est typiquement de l'ordre de 100 nm dans le visible, la portée maximale de l'onde évanescente sera d'environ 400-500 nm au delà de l'interface. Une autre caractéristique notable de l'onde évanescente est qu'elle se propage sur une faible distance le long de l'interface, provoquant un petit décalage latéral du faisceau réfléchi par rapport au faisceau incident. On parle du décalage de Goos-Hänchen [137]. Ce décalage n'est pas évident à observer expérimentalement car il est typiquement de l'ordre de la longueur d'onde.

"L'intensité" $I(z=0)$ dépend de l'angle d'incidence θ et de l'état de polarisation du faisceau. On peut distinguer deux cas extrêmes de polarisation : la polarisation "s" ou TE (transverse électrique) et la polarisation "p" ou TM (transverse magnétique). En supposant que notre interface est dans le plan (x,y), l'axe optique est alors l'axe z, comme sur la figure 2.13. En polarisation "s" le champ électrique \vec{E} est orienté parallèlement à l'interface (suivant y sur la figure 2.13 A, \otimes), quel que soit l'angle d'incidence. Ainsi, toutes les molécules ayant le dipôle de transition orienté suivant y seront efficacement excitées par le faisceau laser. L'expression de la variation relative de $I(z=0)$ en polarisation "s" est donnée par [138, 3] :

$$\frac{I_s(z=0, \theta < \theta_c)}{I_s(z=0, \theta = 0)} = \gamma_s(\theta < \theta_c) = (1 + n')^2 \frac{\cos^2 \theta}{(\cos \theta + \sqrt{n'^2 - \sin^2 \theta})^2} \quad (2.25)$$

$$\frac{I_s(z=0, \theta \geq \theta_c)}{I_s(z=0, \theta = 0)} = \gamma_s(\theta \geq \theta_c) = (1 + n')^2 \frac{\cos^2 \theta}{1 - n'^2} \quad (2.26)$$

Le cas de la polarisation "p" est légèrement plus complexe. Le champ électrique \vec{E} du faisceau incident possède à la fois des composantes parallèles (selon l'axe x) et perpendiculaires (selon l'axe z) à l'interface (figure 2.13 B). Par conséquent, la polarisation de l'onde évanescente est elliptique dans le plan de propagation (x,z). Dans cette configuration, les fluorophores qui ont leur dipôle orienté perpendiculairement par rapport à l'interface seront préférentiellement excités². L'expression de "l'intensité" en $z=0$ en polarisation "p" est [3, 138, 139] :

$$\frac{I_p(z=0, \theta < \theta_c)}{I_p(z=0, \theta = 0)} = \gamma_p(\theta < \theta_c) = n'^2(1 + n')^2 \frac{\cos^2 \theta}{(\sqrt{n'^2 - \sin^2 \theta} + n'^2 \cos \theta)^2} \quad (2.27)$$

$$\frac{I_p(z=0, \theta \geq \theta_c)}{I_p(z=0, \theta = 0)} = \gamma_p(\theta \geq \theta_c) = (1 + n')^2 \frac{\cos^2 \theta (2 \sin^2 \theta - n'^2)}{n'^4 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta - n'^2} \quad (2.28)$$

2. Pour l'interface verre/eau : $\frac{|E_z|^2}{|E_x|^2}=12.5$ pour $\theta=65^\circ$, $\frac{|E_z|^2}{|E_x|^2}=6.9$ pour $\theta=70^\circ$ et $\frac{|E_z|^2}{|E_x|^2}=5.7$ pour $\theta=75^\circ$

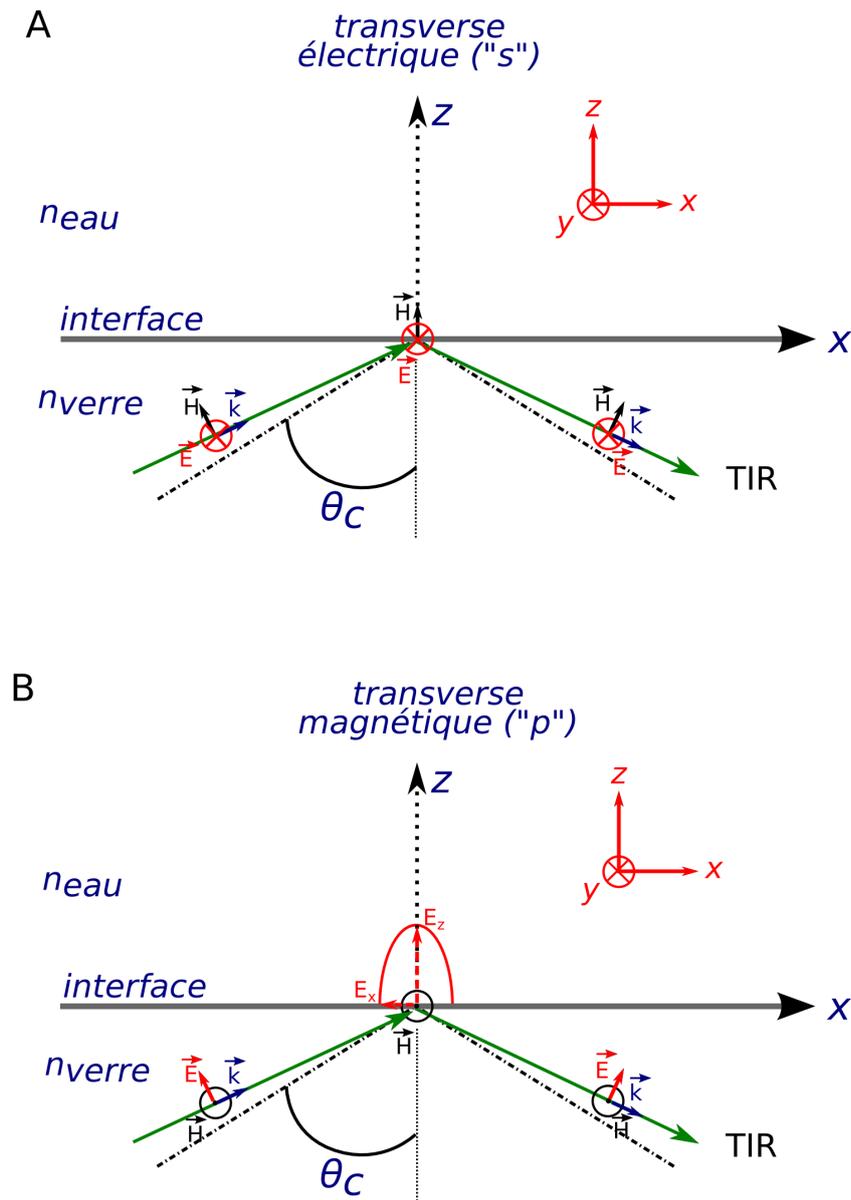


FIGURE 2.13 – Etats de la polarisation d'une onde évanescente. (A) En polarisation "s", le champ électrique \vec{E} est toujours parallèle à la surface (suivant $y \otimes$). (B) En polarisation "p", le champ électrique \vec{E} de l'onde évanescente a deux composantes, l'une perpendiculaire (suivant z) l'autre parallèle (suivant x) à la surface.

La figure 2.14 donne l'évolution théorique de "l'intensité" d'excitation sur l'interface en fonction de θ . Afin de bien comparer les deux états de polarisation, $I(z=0)$ a été normalisée par sa valeur à $\theta=0^\circ$. On observe très clairement une différence entre les deux courbes au niveau de l'angle critique θ_c . "L'intensité" de l'onde sur l'interface présente un maximum pour $\theta=\theta_c$ avec $\gamma_s \sim 3.49$ et $\gamma_p \sim 4.62$, respectivement en polarisation "s" et "p" (pour l'interface verre/eau).

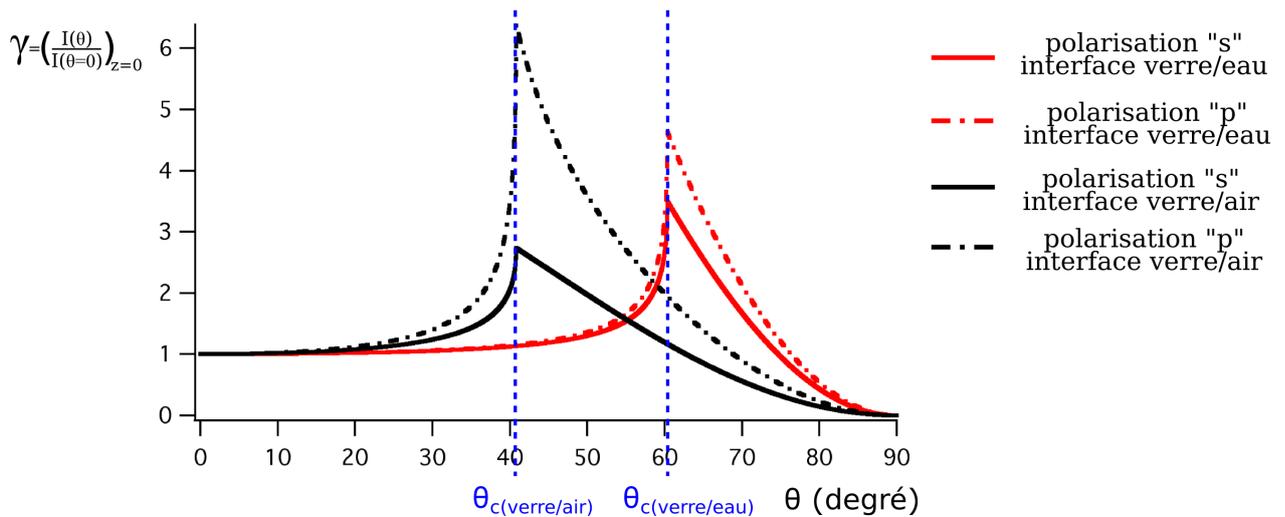


FIGURE 2.14 – Evolution de "l'intensité" d'excitation relative γ en $z=0$ en fonction de l'angle d'incidence pour l'interface verre/eau. En polarisation "s", la première partie de la courbe avant θ_c est modélisée par l'équation 2.25 et la seconde, après θ_c , est modélisée par l'équation 2.26. Concernant la polarisation "p" ce sont les équations 2.27 et 2.28 qui la modélisent. Les indices de réfraction n_{verre} , n_{eau} et n_{air} valent respectivement 1.53, 1.33 et 1. θ_c pour l'interface verre/air vaut 40.8° et pour l'interface verre/eau 60.6° .

2.4.3 Exemples de montages TIRF

La réflexion totale a été exploitée pour la première fois en microscopie en 1903 par A. Cotton et H. Mouton [140] pour observer des particules colloïdales. Ce premier système n'utilisait pas encore la fluorescence. Seule la lumière diffusée par les colloïdes était détectée. Leur montage optique était rudimentaire mais néanmoins efficace (figure 2.15). Un faisceau convergent était dirigé sur l'une des faces d'entrée d'un rhomboïdre de Fresnel. Dans un tel système, la réflexion totale a lieu à l'intérieur du rhomboïdre, particulièrement sur la face AB où l'échantillon est déposé. Le signal est alors collecté par le haut à l'aide d'un objectif de microscope (par diascopie). Seuls les éléments hétérogènes du milieu diffusent la lumière. On observe alors des petites taches lumineuses sur un fond noir (c'est à dire en champ sombre). A l'aide de cette technique, Cotton et Mouton ont observé des mycoplasmes (type de bactéries sans paroi d'une taille $\sim 1 \mu\text{m}$) se déplaçant en décrivant ce qui semblait être un mouvement Brownien. Cette approche sera reprise par E. J. Ambrose en 1956 pour l'étude de l'adhésion de cellules [141] : il a utilisé un simple prisme à réflexion totale à la place du rhomboïdre. Déjà à l'époque, les scientifiques avaient remarqué l'importance des points focaux dans l'adhésion des cellules sur une surface. Au début des années 80, D. Axelrod contribue fortement à populariser cette technique pour les applications en biologie, en proposant cette fois d'observer un signal de fluorescence au lieu de regarder la diffusion [138]. Depuis, une grande variété de montages

optiques a été proposée.

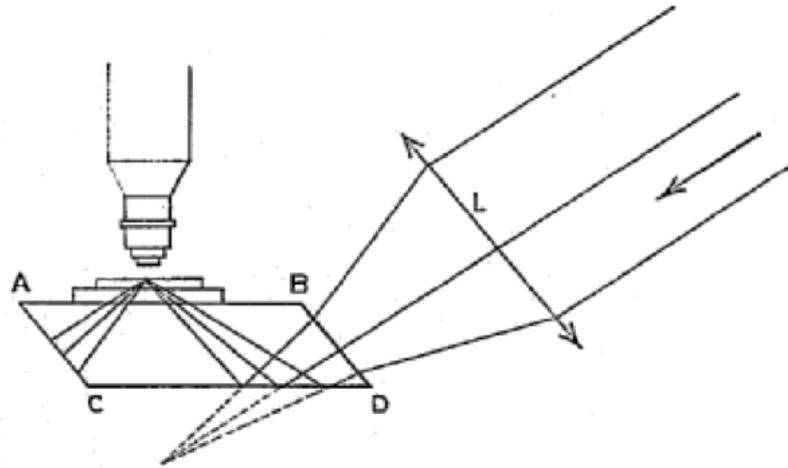


FIGURE 2.15 – Principe du microscope à réflexion totale proposé par Cotton et Mouton [140]. ABCD représente le prisme rhomboédrique Fresnel et L une lentille convergente.

Le dispositif le plus populaire utilise un prisme à réflexion totale afin de créer une l'onde évanescente sur l'interface (figure 2.16). Ce prisme s'adapte autant sur un microscope droit, qu'inversé. Le faisceau d'excitation est focalisé sur l'interface à l'aide d'une lentille. Le rôle du prisme est d'assurer que l'angle d'incidence du faisceau sur l'échantillon est tel que $\theta > \theta_c$; quelle que soit la forme du prisme : triangulaire, cylindrique, cubique. Cependant, les prismes représentés sur la figure 2.16 permettent de combiner le TIRF avec d'autres modes d'illumination comme le contraste de phase. L'échantillon se compose de deux lamelles et le prisme est collé sur l'une d'elles. Les cellules adhèrent sur la lamelle du haut. Dans ces deux exemples, l'objectif permet de collecter le signal de fluorescence par diascopie. Une configuration avec un prisme monté sur un microscope droit est présenté dans la figure 2.16 B. Il s'agit d'un prisme particulier puisqu'il possède une forme trapézoïdale. Ainsi, le faisceau incident entre par la périphérie du prisme. Il est dirigé vers la face supérieure afin d'arriver sur l'interface avec un angle $\theta > \theta_c$. L'angle d'incidence est alors complètement défini par la géométrie du prisme. Le prisme est en contact avec la partie inférieure de l'échantillon. Cette méthode est particulièrement bien adaptée pour observer l'adhésion des cellules dans de simples boîtes de culture. Tous ces montages qui utilisent des prismes présentent un inconvénient majeur : le signal de fluorescence qui résulte de l'excitation par l'onde évanescente doit traverser la cellule et le reste de l'échantillon avant d'être collecté par l'objectif. Il en résulte que les photons de fluorescence sont fortement diffusés par différents compartiments de la cellule et le reste de l'échantillon. La qualité de l'image de fluorescence est alors notablement détériorée, affectant entre autres la limite de résolution du microscope.

Dans le but de s'affranchir du problème précédemment cité, les dispositifs modernes n'utilisent pas de prisme : on parle du montage "*prismless*" (figure 2.17) [138]. Il s'agit cette fois de dispositif en

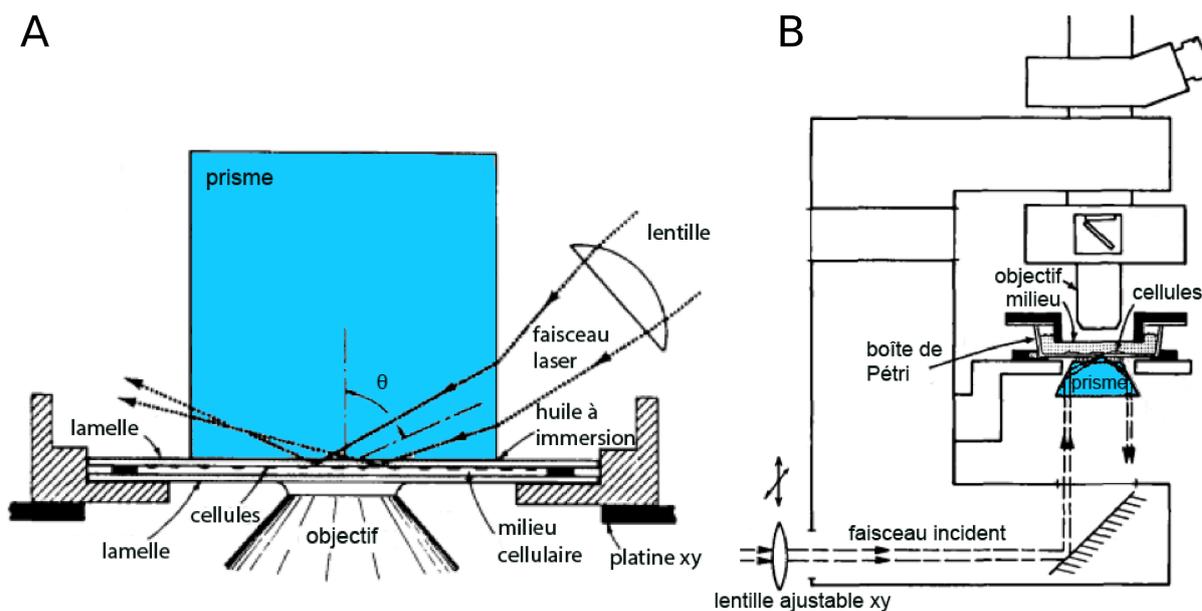


FIGURE 2.16 – (A) Montage expérimental TIRF avec un prisme cubique dans un microscope inversé (B) et un prisme trapézoïdal dans un microscope droit. Le prisme permet de diriger le faisceau sur l'interface avec un angle $\theta > \theta_c$ [138].

épiscopie (on parle d'épi-fluorescence) : l'excitation et la collection se font à travers le même objectif. Cette méthodologie nécessite cependant l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique (typiquement $ON > 1.4$). Le faisceau incident est focalisé sur le plan arrière de l'objectif (*back focal plane*, BFP) puis déplacé vers la périphérie de l'objectif pour augmenter l'angle d'incidence θ sur l'échantillon (figure 2.17). L'angle d'incidence maximum est directement défini par l'ouverture numérique de l'objectif $\theta_{max} = \text{Arcsin}\left(\frac{ON}{n_{huile}}\right)$. Par exemple pour $ON = 1.45$, $\theta_{max} \simeq 71,4^\circ$ (sachant que $\theta_c \simeq 60,4^\circ$ pour l'interface verre/eau).

2.5 Mesures de la distance membrane-substrat par TIR

Depuis les années 80, la microscopie TIRF s'est largement répandue dans les domaines de la biologie, de la biophysique et de la biochimie. Elle est devenue une méthodologie couramment utilisée dans le but de réduire l'épaisseur de la zone d'illumination à quelques centaines de nm. Par exemple, elle a été utilisée dans le cadre de l'étude des phénomènes d'endocytose ou d'exocytose [142], du trafic cellulaire [143], de la cinétique d'absorption des protéines [144] ou encore pour topographier des contacts cellulaires [102, 2]. Le TIRF est souvent employé pour améliorer le rapport signal sur bruit, par exemple dans le cas de l'imagerie de molécules uniques [145]. Les montages expérimentaux TIRF peuvent être assemblés de toute pièce. Des systèmes adaptables sur des microscopes droits ou

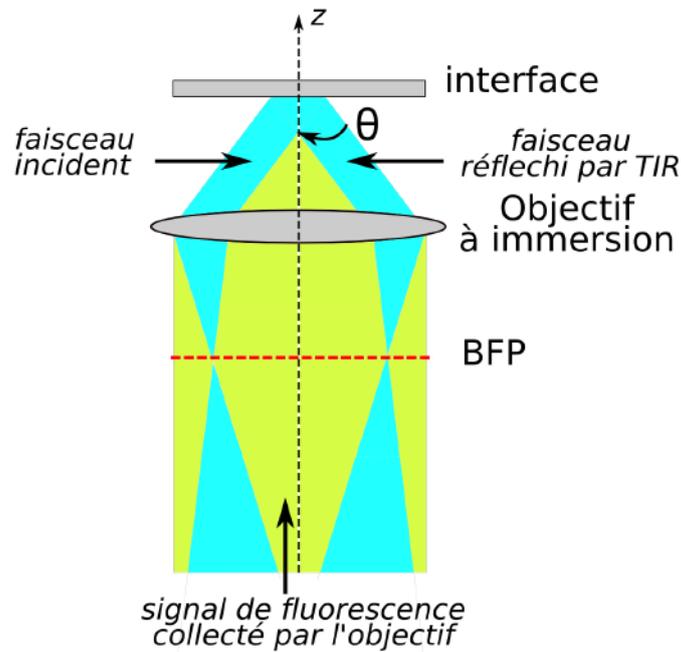


FIGURE 2.17 – Montage "prismless" dans un microscope inversé. Le faisceau est focalisé sur le plan arrière de l'objectif (BFP) à la périphérie de la pupille d'entrée de l'objectif.

inversés sont également commercialisés : Olympus, Leica ou encore Zeiss proposent des microscopes dédiés au TIRF, souvent équipés de plusieurs sources laser. Ils sont très simples d'utilisation car l'inclinaison de l'angle d'incidence est automatisée. Ces solutions commerciales utilisent typiquement un ou deux miroirs galvanométriques pour modifier l'angle d'incidence. Elles donnent accès au régime évanescent mais, très souvent, il n'y a aucun contrôle précis de l'angle d'incidence. Ainsi, beaucoup d'études TIRF restent purement qualitatives car il n'est pas possible de connaître avec précision $\kappa(\theta)$ et $I(z=0, \theta)$. Cependant, de multiples travaux démontrent astucieusement qu'il est possible d'utiliser les propriétés des ondes évanescentes pour mesurer des distances axiales par exemple entre l'interface et la membrane cellulaire. Les premières expériences de ce type ont été publiées en 1985 par F. Lanni et collaborateurs [101]. Ils ont examiné l'organisation spatiale des différents composants cellulaires. Leur technique a permis de confirmer l'existence des contacts focaux et d'estimer la distance membrane-substrat à ~ 50 nm pour ce qu'ils appellent des "contacts proches" et ~ 10 nm pour les "contacts focaux". Quelques années plus tard, G. A. Truskey et collaborateurs se sont inspirés de ces travaux et ont confirmé ces résultats [102]. F. Lanni utilisait un seul angle d'incidence pour calculer la distance cellule/substrat. G. A. Truskey, M. Reichert et J. S. Burmeister ont amélioré la technique de quantification, en développant le TIRF à angle variable (Variable Angle-Total Internal Reflection Fluorescence, VA-TIRF). Cette méthodologie permet de contrôler la profondeur d'atténuation κ de l'onde évanescente, en ajustant l'angle d'incidence θ [146]. Un goniomètre sur lequel est monté une fibre optique permet de contrôler l'angle d'incidence

(figure 2.18). Ainsi on accède à des profondeurs d'atténuation κ (de l'ordre de 100 nm), ce qui permet de cartographier toutes les distances membrane-surface (même lorsque la membrane est très éloignée de la surface). Plus récemment, les études de K. Stock et collaborateurs ont montré qu'il est possible de cartographier par VA-TIRF, la totalité de la membrane en ce qui concerne la partie ventrale de la cellule [147]. Ils ont établi que la grande majorité de la membrane plasmique se trouve typiquement entre 100 et 300 nm du substrat. Les récentes innovations en microscopie optique permettent également de combiner TIRFM avec d'autres techniques de microscopie comme l'AFM [148], le PALM [149], STED [150], FRET [151], etc.

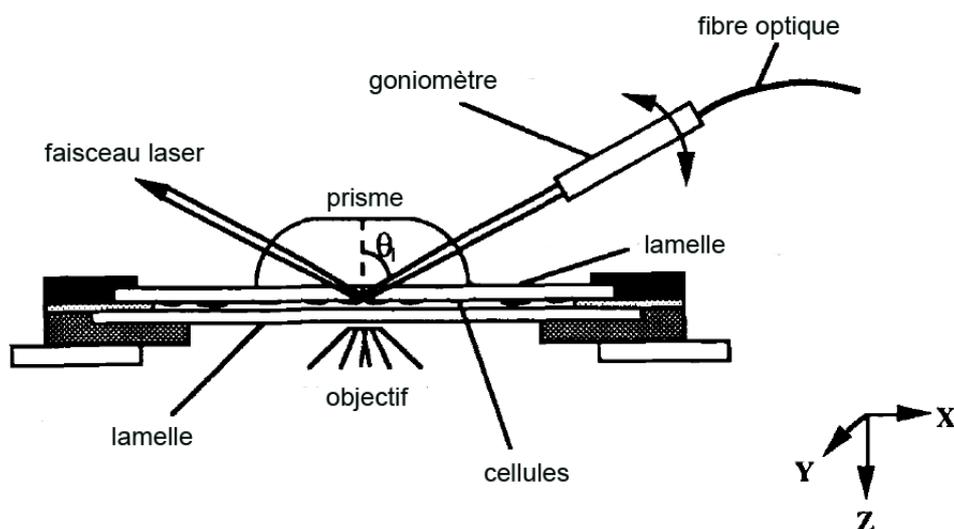


FIGURE 2.18 – Premier montage expérimental de VA-TIRF. Le faisceau d'incidence provenant de la fibre optique est dirigé sur l'échantillon à l'aide d'un goniomètre afin de faire varier l'angle d'incidence. Le faisceau traverse un prisme hémicylindrique avant d'arriver sur l'échantillon. Le signal de fluorescence est collecté en diascopie [146].

Le VA-TIRF n'est pas l'unique méthode de mesure des distances en régime évanescent. A. Hasanzadeh et collaborateurs ont développé une technique dédiée à la mesure de distance membrane-surface qui repose sur la perturbation des ondes évanescentes créées à l'aide d'un guide d'onde, appelé WEFF (Waveguide Evanescent Field Fluorescence) [152]. Le champ évanescent présent à la surface du guide d'onde permet d'exciter des molécules fluorescentes présentes au voisinage de cette surface. L'intensité de fluorescence peut être alors interprétée en termes de distances par rapport à la surface. Un exemple de montage expérimental en microscopie WEFF est présenté sur la figure 2.19. L'avantage de cette technique est son grand pouvoir de résolution de l'ordre de ~ 5 nm [153]. Son principal inconvénient est que le temps d'acquisition pour obtenir une image est de l'ordre de plusieurs dizaines de secondes.

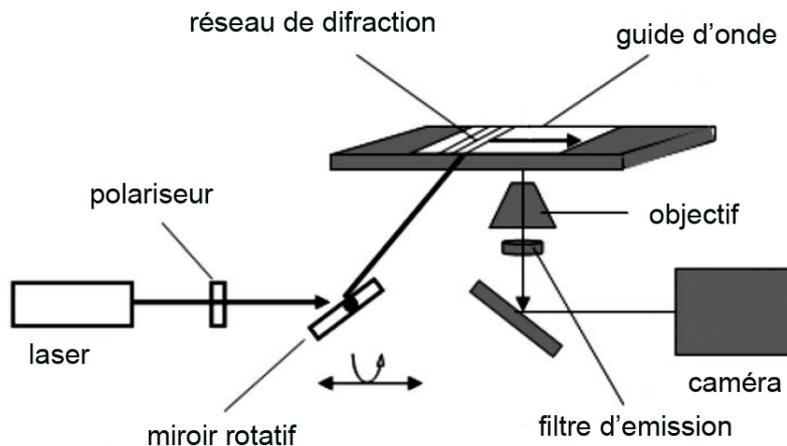


FIGURE 2.19 – Montage expérimental d'un microscope de fluorescence à guide d'onde [153].

Le TIRF n'est pas la seule méthode possible pour mesurer des distances axiales. Une technique d'imagerie, utilisant la plasmonique combinée au FLIM (Fluorescence-lifetime imaging microscopy) [154] permet elle aussi de mesurer les distances membrane/substrat. Le substrat se présente alors sous la forme de surfaces nanostructurées permettant le contrôle de la résonance plasmon. Cette résonance est à l'origine de l'apparition d'une onde électromagnétique à une longueur d'onde spécifique, déterminée par la taille et la forme des nanoparticules. Une calibration à l'aide de billes fluorescentes permet notamment de remonter à la distance axiale grâce aux valeurs de l'intensité de fluorescence et de durée de vie (plus la molécule est proche de l'interface, plus sa durée de vie se raccourcit). Cette technique permet d'obtenir une résolution de l'ordre de 10 nm. Une autre étude mettant en jeu la plasmonique repose sur le transfert d'énergie non radiatif entre une surface métallique et les molécules fluorescentes [155]. Le mécanisme du MIET (metal-induced energy transfer) est analogue à celui du FRET : l'énergie du fluorophore dans son état excité, est transférée aux plasmons de la couche métallique. Ici, les plasmons accélèrent la relaxation radiative des molécules fluorescentes, raccourcissant ainsi leur durée de vie. En sachant que le taux de transfert dépend de la distance molécule-surface métallique, la durée de vie peut être directement convertie en distance axiale. Le MIET a été utilisé pour cartographier les distances membrane-substrat et permet d'élargir la gamme des distances à $\sim 100\text{-}200$ nm par rapport au FRET, qui lui est limité par une distance typique de ~ 10 nm.

Chapitre 3

Dispositif expérimental TIRFM dédié à la mesure des distances membrane-substrat

3.1 Introduction

Les techniques qui permettent d'étudier l'adhésion et la migration cellulaire sont plus ou moins faciles à mettre en œuvre. Certaines d'entre elles sont très contraignantes en termes de coût d'installation ou de traitement des données. Les montages TIRF "*prismless*" présentent l'avantage de s'affranchir des défauts inhérents à l'utilisation d'un prisme. Ce dernier induit en effet une déformation notable (élongation) de la zone d'éclairage, due aux aberrations introduites par la réfraction des rayons sur la face d'entrée du prisme. L'utilisation de prismes cylindriques diminue légèrement ces aberrations mais ne permet pas de s'affranchir complètement du phénomène. Dans le cadre de mon travail de thèse, le challenge a été de trouver une solution optimale du point de vue instrumental et de l'analyse des résultats. Nous avons souhaité développer un montage expérimental avec des composants optiques relativement simples, rendant la technique adaptable à la majeure partie des dispositifs commerciaux et qui, une fois installés, permettent une prise en main rapide par n'importe quel utilisateur. Je vais présenter dans ce chapitre la version finale du dispositif expérimental. Il est l'aboutissement de deux années de développement. Il intègre entre autres une platine de rotation de grande précision ($\approx 10^{-4}^\circ$) afin de contrôler précisément l'angle d'incidence du faisceau sur l'interface et des composants optiques de grande dimension, permettant d'augmenter au maximum la surface d'irradiation de l'échantillon.

Pour mesurer par microscopie TIRF les distances membrane/substrat, il est indispensable de connaître très précisément l'angle d'incidence θ du faisceau laser sur l'interface. La longueur d'atténuation de l'onde évanescente étant directement reliée à θ (équation 2.24). Il est alors possible

d'ajuster finement κ en faisant varier θ . A ce titre, nous avons mis en place un protocole de calibration de l'angle d'incidence θ qui sera détaillé dans ce chapitre. Dans notre montage, l'angle d'incidence est contrôlé à l'aide d'une platine de rotation dotée d'une grande précision angulaire. J'ai successivement utilisé deux platines motorisées : la première était d'une précision d'environ 0.01° , sans mesure absolue de la position et la seconde d'une précision de $2 \times 10^{-4}^\circ$ qui intègre un système de mesure optique de la position angulaire. En outre, afin d'éviter la translation de la zone d'éclairage lorsqu'on augmente l'angle d'incidence, l'ensemble (lentille L_{GC} et objectif, figure 2.11) forme un système afocal. Dans notre montage, le point pivot du miroir M_R est parfaitement imagé sur l'échantillon (figure 3.1 A). La figure 3.1 B montre en effet que si le point pivot du miroir M_R n'est pas placé au foyer objet de L_{GC} on observera alors une translation importante (dans la direction d'inclinaison du faisceau laser) de la zone d'irradiation laser sur l'échantillon. Notre montage est donc équipé de différents moyens de translation afin d'ajuster la position de M_R par rapport à L_{GC} , et la position de L_{GC} par rapport au microscope.

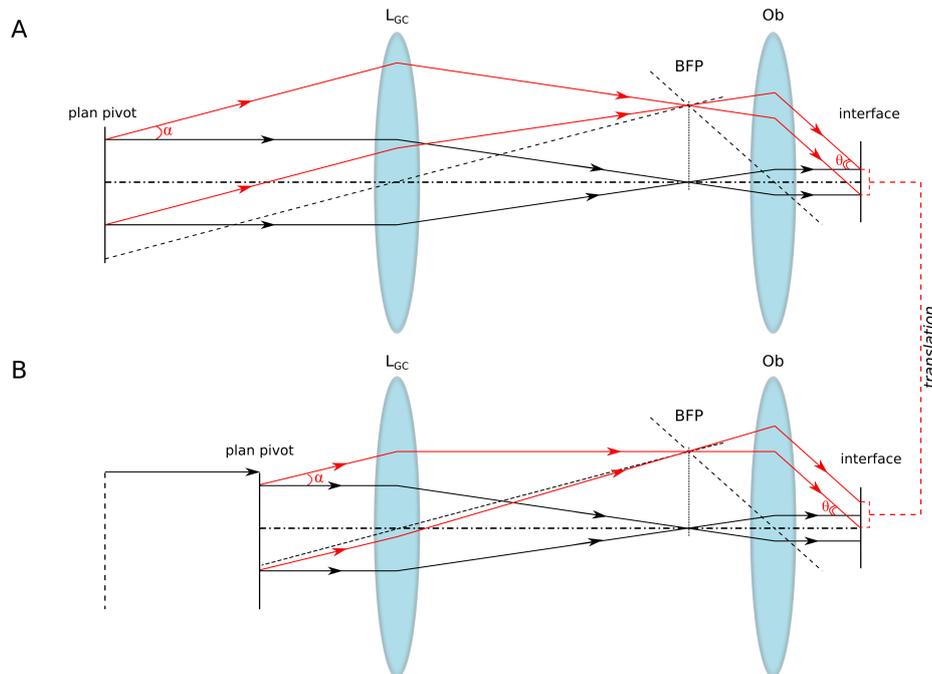


FIGURE 3.1 – Système imageur afocal composé de la lentille L_{GC} et de l'objectif. (A) Lorsque le point pivot du miroir M_R est positionné à la distance focale de la lentille L_{GC} , le plan objet (ou plan pivot) et le plan image sont conjugués. (B) L'effet de la translation de la zone d'irradiation laser sur l'échantillon lorsque le miroir M_R n'est pas positionné à la distance focale de L_{GC} .

Ainsi, dans ce chapitre, je présenterai comment adapter un microscope inversé pour faire de la microscopie TIRF. Je détaillerai les éléments du montage expérimental et la stratégie de la calibration de l'angle d'incidence (étape majeure avant toute étude quantitative).

3.2 Montage expérimental

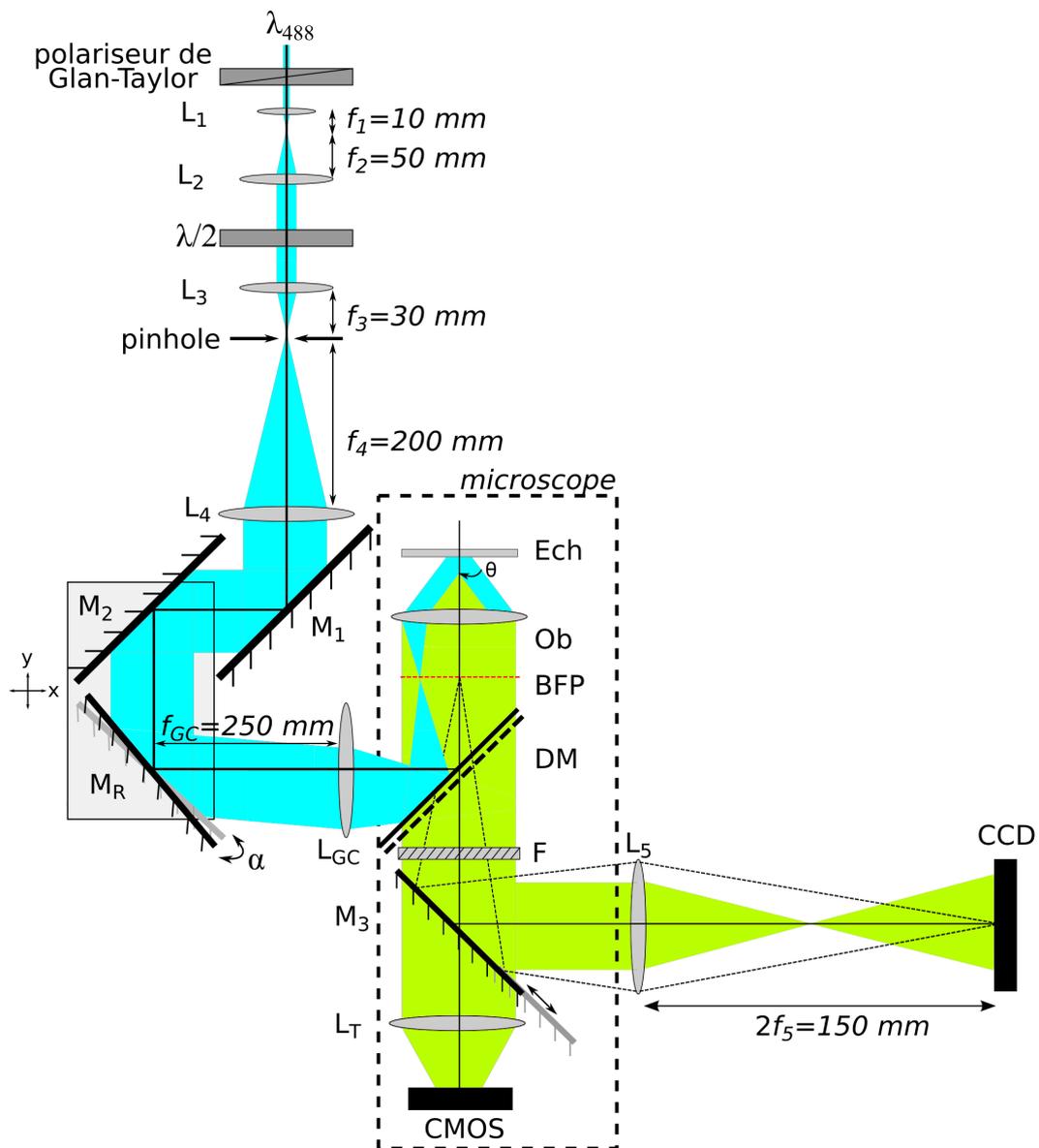


FIGURE 3.2 – Dispositif expérimental. Le système est monté sur une base d'un microscope inversé Olympus IX71. Les lentilles L_1 et L_2 de focale respective f_1 et f_2 composent le premier "beam expander". Les lentilles L_3 et L_4 (de focale f_3 et f_4) constituent le deuxième "beam expander". Les miroirs M_1 et M_2 orientent le faisceau incident sur le miroir rotatif M_R . L_{GC} est la lentille qui permet d'avoir un éclairage grand champ sur l'échantillon (Ech) (sa focale est f_{GC}). Elle fait converger le faisceau laser sur le plan focal arrière de l'objectif (BFP). La dichroïque DM renvoie le faisceau laser sur l'échantillon en direction de l'objectif Ob. Un filtre passe haut (F) est placé sur la voie de collection et un miroir mobile M_3 permet d'envoyer le signal de l'échantillon sur une caméra CCD via une lentille L_5 (de focale f_5) afin d'imager le BFP. L'échantillon est imagé sur une caméra sensible CMOS à l'aide de la lentille de tube L_T .

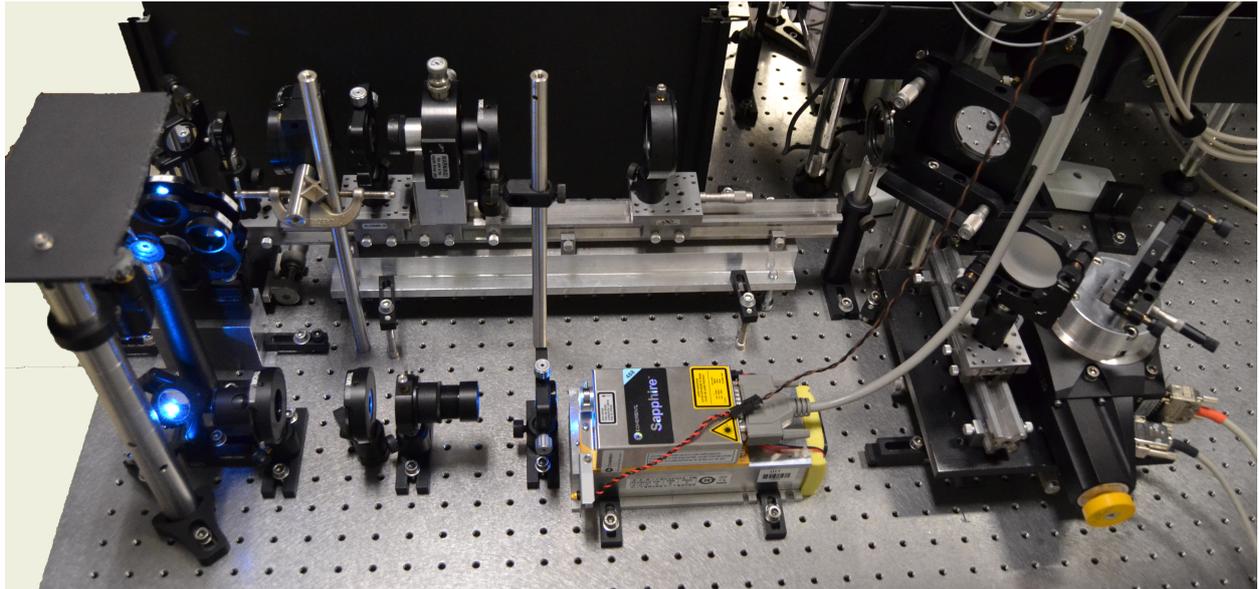


FIGURE 3.3 – Photo du dispositif expérimental.

Les dispositifs TIRF utilisés au cours de cette thèse ont été développés sur la base d'un microscope inversé Olympus (IX71). Les figures 3.2 et 3.3 donnent une représentation du dernier montage expérimental que j'ai réalisé. Les composants optiques nécessaires pour faire varier l'angle d'incidence sont placés à l'extérieur du microscope : la structure de base du microscope est dispensée de modification. L'excitation de l'échantillon est effectuée à l'aide d'une source laser émettant à 488 nm (Sapphire 488, Coherent), d'une puissance maximale de 225 mW.

3.2.1 Mesure du waist du faisceau laser

Afin de filtrer de façon optimale le faisceau laser dans un trou de filtrage, la largeur du faisceau laser à la sortie de la source a été mesurée par la "méthode du couteau", illustrée sur la figure 3.4 A (le waist donné par le constructeur n'est qu'une valeur approximative, valable pour différents lasers et à différentes longueurs d'onde). Cette technique consiste à mesurer la variation de l'intensité lumineuse lorsqu'on masque progressivement le faisceau laser à l'aide d'un "couteau". Pour cela, j'ai utilisé une lame de rasoir, montée sur une platine de translation micrométrique. La lame est déplacée latéralement (déplacement x) par rapport à l'axe de propagation du laser (z) (figure 3.4 A). Au fur et à mesure du déplacement du bord de la lame de rasoir, le faisceau est de plus en plus masqué. On enregistre l'évolution de la puissance transmise P à l'aide d'un puissance-mètre en fonction de x , figure 3.4 B. Le profil gaussien du faisceau laser peut alors être obtenu en dérivant $P(x)$ (courbe rouge). $P'(x)$ représente une coupe radiale du profil latéral du faisceau laser. Son expression est donnée par :

$$P'(x) = P_0 e^{-2\frac{(x-x_0)^2}{w(z)^2}} \quad (3.1)$$

avec

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \frac{\lambda^2 z^2}{\pi^2 w_0^2}} \quad (3.2)$$

où x_0 est la position du maximum de $P'(x)$, $w(z)$ est la largeur du faisceau, mesurée à la sortie laser et w_0 la valeur du waist (c'est-à-dire le minimum de $w(z)$). λ est la longueur d'onde du faisceau laser. Un faisceau laser diverge naturellement au cours de sa propagation et sa dimension latérale est donné par $w(z)$. Un ajustement numérique de la dérivée $P'(x)$ à l'aide de l'équation 3.1 permet d'obtenir $w(z)$ (figure 3.4 B). A la sortie du laser Sapphire 488, $w(z)$ vaut $464 \pm 10 \mu\text{m}$.

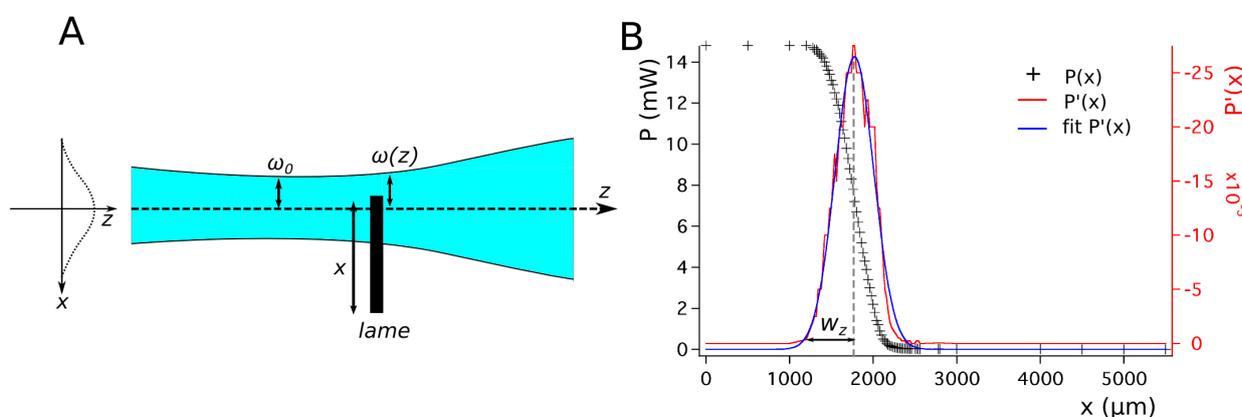


FIGURE 3.4 – (A) Méthode du couteau pour la mesure de $w(z)$. (B) Exemple d'évolution de la puissance laser mesurée P (points noirs) en fonction du déplacement x de la lame opaque. Sa dérivée $P'(x)$ (courbe rouge) et son fit gaussien (courbe bleue).

3.2.2 Voie d'excitation

A Agrandissement de la taille du faisceau laser

Le montage de la figure 3.2 intègre deux "*beam expander*". Il s'agit d'un système optique afocal, composé de deux lentilles, qui sert à étendre la taille d'un faisceau lumineux collimaté. Le premier "*beam expander*" se constitue des lentilles L_1 et L_2 , le second des lentilles L_3 et L_4 (figure 3.2). Il était important dans notre montage d'étendre le plus possible la taille du faisceau afin d'agrandir au maximum le champ d'observation sur l'échantillon. Après la lentille L_4 , le diamètre du faisceau est d'environ 25 mm. De nombreux fournisseurs de composants optiques proposent des "*beam expanders*" déjà fabriqués. Cependant, ces derniers ne permettent pas d'ajuster le faisceau à la taille désirée ou de travailler dans une gamme spectrale souhaitée. La construction d'un "*beam expander*" plus simple, fonctionnant pour une longueur d'onde, repose sur l'utilisation d'un jeu de deux

lentilles convergentes : le foyer image de la première lentille L_E coïncide avec le foyer objet de la deuxième lentille L_S (figure 3.5). Un faisceau parallèle passe à travers la première lentille d'entrée, puis converge au foyer de cette dernière. Le système étant afocal, le faisceau est ensuite collimaté par la lentille de sortie. Pour créer un tel dispositif, il faut respecter quelques règles élémentaires d'optique géométrique. La lentille d'entrée doit avoir un diamètre supérieur à la taille du faisceau incident. Le diamètre de la lentille de sortie doit être supérieur à la taille du faisceau émergent. Le grandissement transversal de ce tandem est donné par le rapport des distances focales $|G_t| = \frac{f_S}{f_E}$. En d'autres termes, le diamètre D_S du faisceau qui émerge du "beam expander" est donné par $D_S = |G_t| \cdot D_E$, si D_E est le diamètre du faisceau incident.

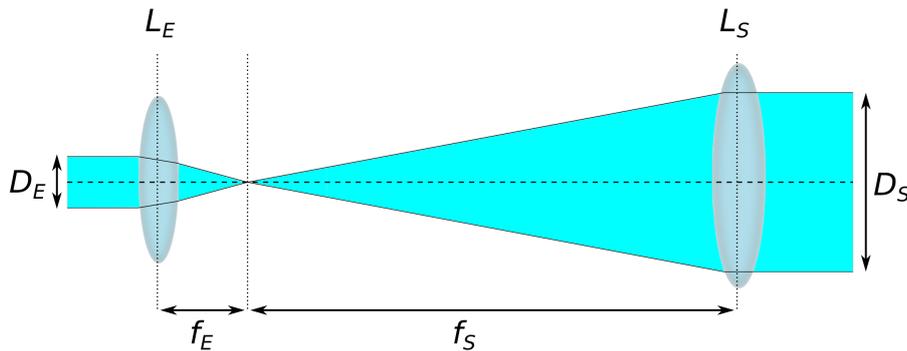


FIGURE 3.5 – Exemple de "beam expander" composé de deux lentilles convergentes, L_E (la lentille d'entrée) et L_S (la lentille de sortie) chacune caractérisée par leurs distances focales respectivement f_E et f_S .

Le challenge de ce développement instrumental consistait à agrandir le petit diamètre du faisceau laser (~ 1 mm) de sorte qu'il mesure environ 25 mm avant la lentille L_{GC} . Afin d'éliminer les défauts du faisceau laser, ce dernier a été filtré spatialement au niveau du deuxième "beam expander" à l'aide d'un "pinhole" (figure 3.2). Ce "pinhole" d'une petite ouverture de quelques microns, est installé au foyer des deux lentilles. Afin de filtrer correctement le faisceau, j'ai utilisé un pinhole d'un diamètre de 10 μm . Cette étape de filtrage est essentielle pour obtenir un faisceau d'éclairage homogène et parfaitement circulaire sur l'échantillon.

B Contrôle de la polarisation du faisceau laser

Un autre paramètre doit être parfaitement contrôlé en TIRF : la polarisation du faisceau laser. En effet, "l'intensité" d'excitation en $z=0$ en TIRF dépend fortement de l'état de polarisation (paragraphe 2.4.2). Afin de basculer d'une configuration d'excitation de polarisation s en polarisation p (figure 2.13) et vice versa, nous avons choisi de placer une lame $\lambda/2$ sur le trajet du faisceau laser (figure 3.2). Néanmoins, le laser Sapphir n'étant pas parfaitement polarisé linéairement, nous avons

placé un polariseur de qualité avant la lame $\lambda/2$. Un prisme de Glan-Taylor a donc été positionné à la sortie du laser.

C Contrôle de la puissance d'excitation (roue de densités neutres)

Afin de faire varier la puissance d'excitation laser sur l'échantillon (la puissance de sortie du laser étant fixée à sa valeur maximale pour éviter des fluctuations d'intensité), nous avons placé deux roues de densités sur le trajet optique. Il s'agit de deux supports permettant de fixer chacun 6 filtres neutres atténuateurs. Ces roues nous permettent de sélectionner une valeur de densité comprise entre 0.1 et 3. Ainsi, "l'intensité" d'excitation à l'interface peut être adaptée sans trop irradier l'échantillon.

D Platine de rotation pour faire varier l'angle d'incidence θ

Le miroir M_R est monté sur une platine de rotation motorisée (PRS-110, PI Micos). C'est un élément capital de notre dispositif. La rotation du miroir permet de basculer rapidement (typiquement en 100 ms) entre les deux modes d'illumination : épi-fluorescence et TIRF. La platine est dotée d'un encodeur angulaire qui permet de se positionner très précisément à 2×10^{-4} degrés près. L'angle d'inclinaison du faisceau laser, après réflexion sur le miroir M_R , est noté α . Les miroirs M_2 et le M_R sont installés sur une grande platine de translation 2D (x,y) afin que l'on puisse ajuster finement la position du point pivot de M_R par rapport à la lentille L_{GC} . Le dernier élément externe au microscope est la lentille de tube L_{GC} . Cette lentille permet de faire converger les rayons sur le plan arrière de l'objectif afin de créer un éclairage grand champ. La distance focale de la lentille L_{GC} qui équipe notre dispositif est de 250 mm.

E Miroir dichroïque

Le faisceau entrant dans le microscope est renvoyé vers l'objectif à l'aide d'un miroir dichroïque (Di01-R488, Semrock) positionné à 45° . Cet élément réfléchit parfaitement à la longueur d'onde d'excitation laser (488 nm) et fonctionne comme un filtre passe-haut en transmission, permettant une première sélection du signal de fluorescence. Le miroir Semrock que j'ai utilisé transmet entre 504 et 900 nm (dans cette fenêtre la transmission est supérieure à 95%). Ainsi, le miroir dichroïque est parfaitement adapté à la détection de molécules comme la DiO, la DiA et l'ATTO-488.

F Objectif TIRF

Le faisceau réfléchi par le miroir dichroïque converge sur le plan focal arrière de l'objectif et émerge collimaté de ce dernier (figure 3.2). Il s'agit d'un objectif à immersion dédié au TIRF (Olympus, PlanApoN 60x TIRFM, ON=1.45). Cet objectif de grande ouverture numérique est

indispensable pour d'une part créer l'onde évanescente et d'autre part collecter efficacement le signal de fluorescence. Comme nous l'avons vu précédemment, il est nécessaire d'utiliser un objectif de grande ouverture numérique pour optimiser la collection du signal émis par les fluorophores situés à proximité d'une interface. L'angle maximal de collection et d'excitation est directement donné par l'ON et vaut environ 72° . L'angle critique pour l'interface verre/eau étant d'environ 61° , il est donc envisageable de travailler dans un régime purement évanescent avec cet objectif. Il existe un lien direct entre la position du spot laser dans le plan focal arrière de l'objectif (BFP) et l'angle d'incidence θ . Lorsque le spot est au centre de la pupille d'entrée de l'objectif, l'angle d'incidence $\theta=0$. Lorsqu'on déplace ce spot vers la périphérie de la pupille d'entrée, θ augmente. Ainsi il existe une position radiale particulière qui correspond à l'angle critique θ_c à partir de laquelle on crée des ondes évanescentes sur l'interface. Cette position est proche du bord de la pupille d'entrée de l'objectif. Il est intéressant de souligner que le BFP de cet objectif est situé à proximité de la pupille d'entrée de ce dernier. Cet objectif est également équipé d'une bague de correction qui permet d'ajuster l'épaisseur de la lamelle de verre ($170\ \mu\text{m}$) pour une température ambiante ($\sim 21^\circ\text{C}$) et pour 37°C . Pour que la mise au point puisse être réalisée précisément sur l'échantillon, un système piezoélectrique (E-665 XR, PI) permet de déplacer axialement la position de l'objectif, avec une résolution nanométrique.

3.2.3 Voie de détection

Après excitation de l'échantillon, le signal de fluorescence est collecté par le même objectif. Il traverse le miroir dichroïque et un filtre d'émission passe haut, qui sélectionne les longueurs d'onde entre 505 et 900 nm avec un très bon taux de réjection de la raie laser (BLP01-488R, Semrock). La voie de collection est ensuite séparée en deux. Il est possible d'adresser le signal, via le déplacement d'un miroir mobile (figure 3.2 M_R), vers une caméra CCD (QI Click, QI Imaging) afin d'imager le plan arrière de l'objectif. L'échantillon peut être directement imagé sur une caméra CMOS (Orca Flash 4.0, Hamamatsu) à l'aide de la lentille de tube conventionnelle L_T. La lentille convergente L₅, qui est utilisée pour observer le BFP, a une distance focale de 150 mm et est placée de façon à imaginer le BFP avec un grandissement 1 (montage 4f).

3.2.4 Chambre d'observation

Les objets étudiés (vésicules, cellules...) sont placés dans une chambre porte-échantillon réalisée au laboratoire. Cette chambre est un système hermétique destiné à préserver le milieu de l'évaporation du solvant. Elle se compose d'un support en aluminium, aux dimensions 7.5 x 2.5 cm, adapté pour être installé sur un porte-échantillon de la platine de translation (figure 3.6). Les vésicules ou les cellules sont placées entre deux lamelles (24 x 24 mm et d'épaisseur $170\ \mu\text{m} \pm 10\ \mu\text{m}$, Assistent), séparées par un joint en caoutchouc. La première lamelle est installée sur le support, la surface utile vers le haut. Un joint lubrifié d'une graisse à vide est positionné dessus. On y dépose alors les

vésicules ou les cellules resuspendues dans le milieu d'observation. L'échantillon est ensuite recouvert d'une deuxième lamelle pour refermer le système. L'ensemble est immobilisé par un anneau en téflon. Une bague de serrage en aluminium est vissée par le haut afin de bien fixer le système (figure 3.6 B). Une enceinte chauffante (OKO Lab) a été installée autour du microscope pour réaliser les expériences en température optimale pour les cellules, soit 37°C.

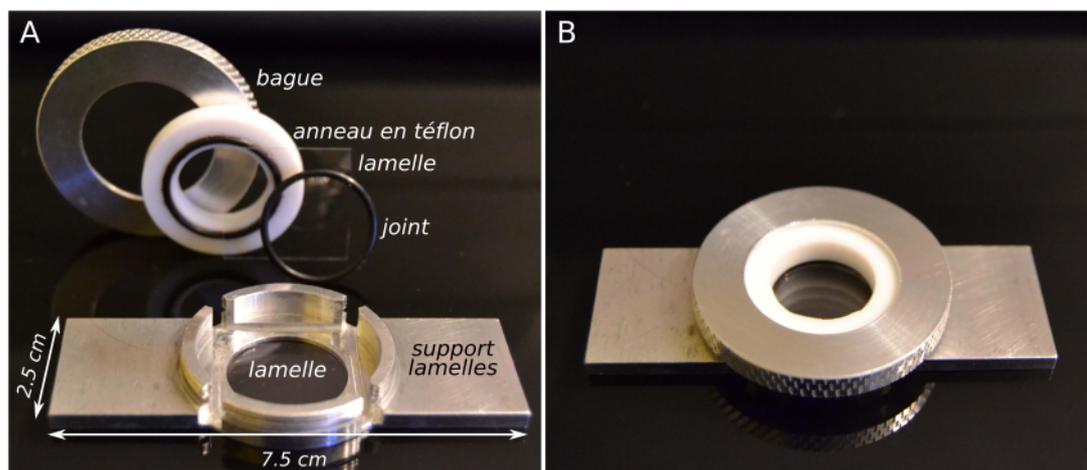


FIGURE 3.6 – Chambre d'observation. (A) Éléments composant la chambre : le support, les lamelles, le joint, l'anneau en téflon et la bague de serrage. (B) Chambre assemblée.

3.3 Calibration de l'angle d'incidence

3.3.1 Échantillon de calibration

Pour calibrer l'angle d'incidence, il est nécessaire d'utiliser un échantillon qui possède trois propriétés essentielles : son épaisseur doit être $\ll \lambda$, et il doit absorber et émettre de façon isotrope. Après de nombreux tests, nous avons choisi d'utiliser une monocouche de boîtes quantiques. Les nanocristaux présentent en effet une très bonne photostabilité, ce qui nous permet d'acquérir un grand nombre d'images au cours du temps et cela sur la même zone. De plus, une fois fixés à la surface dans un film mince de polymère, les QDots ne vont pas se désorber au contact d'un solvant, comme les molécules organiques. Pour réaliser des échantillons de calibration, nous avons dispersé des QDots dans un film mince de polyméthacrylate de méthyle (PMMA, MM=25 kg/mol, 04554-500, Polysciences Inc.). Sachant que le diamètre d'une boîte quantique est ~ 9 nm, nous avons préparé des films de PMMA dopés de QDots, d'une épaisseur ~ 10 nm. Les Quantum Dots sélectionnés pour la calibration sont les "Fort Orange" (paragraphe 2.1.4). Pour que le dépôt soit homogène, les Quantum Dots ont été dilués dans du toluène à une concentration typique de $\sim 10^{-11}$ M. Les couches minces ont été obtenues par *spin-coating*. Afin de trouver l'épaisseur optimale de la couche de QDots, nous avons fait varier certains paramètres comme la vitesse de la rotation,

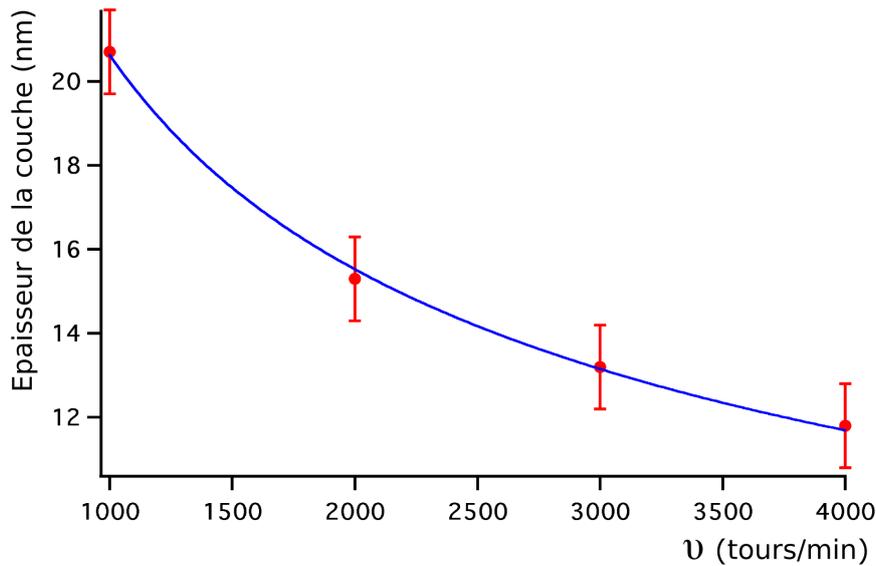


FIGURE 3.7 – Evolution de l'épaisseur des couches minces de PMMA dopées de Quantum Dots en fonction de la vitesse de rotation du *spin coater*. La concentration de la solution de PMMA est de 3.75 g/l dans du toluène. En rouge, sont représentés les points expérimentaux (± 1 nm) et en bleu l'ajustement numérique. Les variables a et α ont été estimées respectivement à 348 et à 0.41 (voir texte).

l'accélération de la tournette (ou *spin coater*) et la concentration du PMMA. L'épaisseur de la couche a été déterminée par ellipsométrie (à $\lambda=633$ nm, Jobin Yvon-Horiba). Un exemple de variation de l'épaisseur d'une couche de PMMA à 3.75 g/l, dopée de QDots en fonction de la vitesse de rotation est présenté sur la figure 3.7. Les points expérimentaux ont été ajustés avec une fonction du type $e(v)=a\frac{1}{v^\alpha}$, où e est l'épaisseur, a une constante qui dépend de la concentration et la viscosité du milieu, v la vitesse de rotation (en tours/min) et α une constante qui vaut $2/3$ dans le cas d'un polymère pur [156]. Une couche de ~ 12 nm a été obtenue avec une vitesse de rotation de 4000 tours/min et une accélération de 4000 tour/min/s, figure 3.7.

La zone d'éclairage sur l'échantillon permet de recouvrir de manière quasi totale la surface du détecteur (caméra CMOS) qui vaut $223 \times 223 \mu\text{m}^2$. Le profil d'illumination peut être ajusté par l'équation :

$$I(x,y) = I_0 e^{\frac{-2((x-x_0)^2+(y-y_0)^2)}{\omega_{xy}^2}} \quad (3.3)$$

On obtient une dimension latérale du faisceau sur l'interface $\omega_{xy}=120 \mu\text{m} \pm 3 \mu\text{m}$ (figure 3.8). Avec cet échantillon, j'ai également pu caractériser le décalage résiduel de la zone d'éclairage quand on augmente l'angle d'incidence. Pour cela, j'ai enregistré des images de luminescence d'une monocouche de boîtes quantiques (Fort Orange) à $\theta=0^\circ$ et $\theta=66^\circ$, pour une interface verre/eau. Le

déplacement latéral du spot d'excitation dans la direction d'inclinaison du faisceau laser dont j'ai parlé au début du chapitre n'est que de $16\ \mu\text{m}$ entre $\theta=0^\circ$ et $\theta=66^\circ$ (figure 3.8), ce qui ne représente que 6-7% du diamètre total du faisceau d'éclairage. Il s'est avéré impossible de faire tendre ce décalage spatial vers zéro, malgré tous mes efforts d'alignement. Je me suis d'ailleurs rendue compte, sur un autre banc expérimental, avec un autre objectif TIRF de la marque Zeiss ($\text{ON}=1.46$, 63x), qu'il était possible de faire disparaître totalement ce décalage résiduel. En conclusion, on peut chiffrer les variations "d'intensité" d'excitation au centre de la caméra, à environ 5-10% après la normalisation de $I(z=0)$ entre $\theta=0$ et $\theta=66^\circ$.

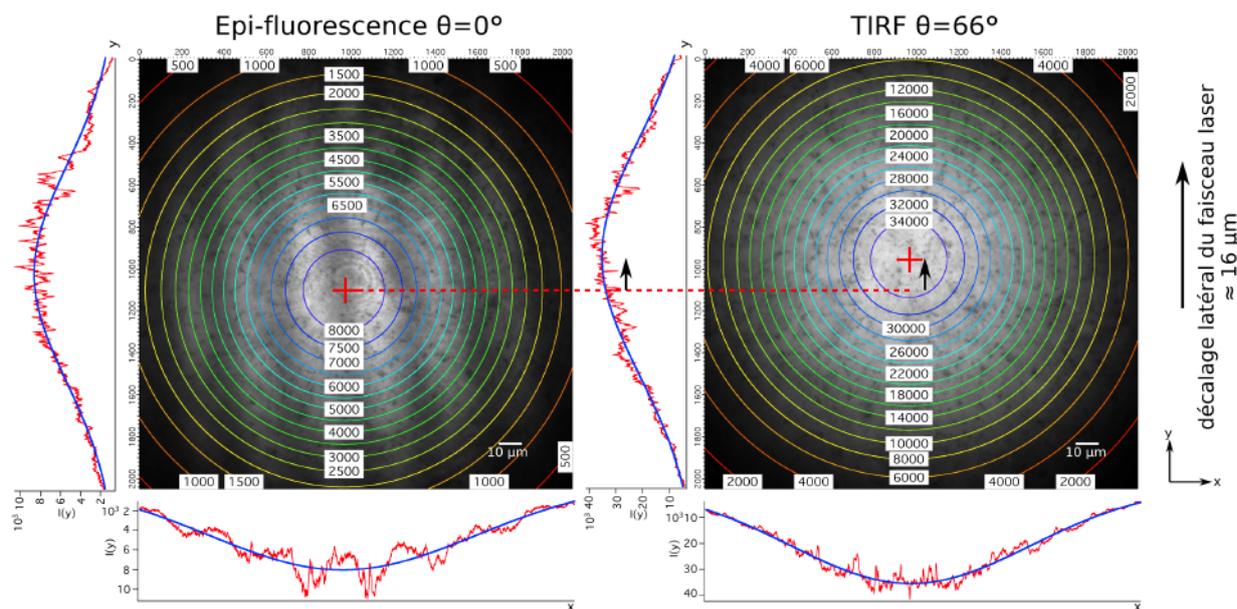


FIGURE 3.8 – Effet du déplacement latéral du faisceau laser lorsqu'on augmente l'angle d'incidence θ de 0 à 66° . Les cercles représentent les lignes du fit par la fonction d'ajustement donnée par l'équation 3.3

3.3.2 Relation de grandissement entre α et θ

L'ensemble (lentille L_{GC} -objectif) constitue un système imageur afocal, où la lentille L_{GC} joue le rôle d'une lentille de tube de focale 250 mm. Ainsi, le plan qui contient le point pivot du miroir M_R est parfaitement imagé sur l'interface (figure 3.9 A). Cet ensemble (lentille + objectif) peut être remplacé par une simple lentille convergente (figure 3.9 B).

Sur la figure 3.9 B, $A_i B_i$ est l'image de $A_0 B_0$, lorsqu'il n'y a aucune aberration ($A_0 B_0$ étant dans le plan pivot et $A_i B_i$ dans le plan de l'interface). Le grandissement transversal G_t et angulaire G_a de ce système imageur est :

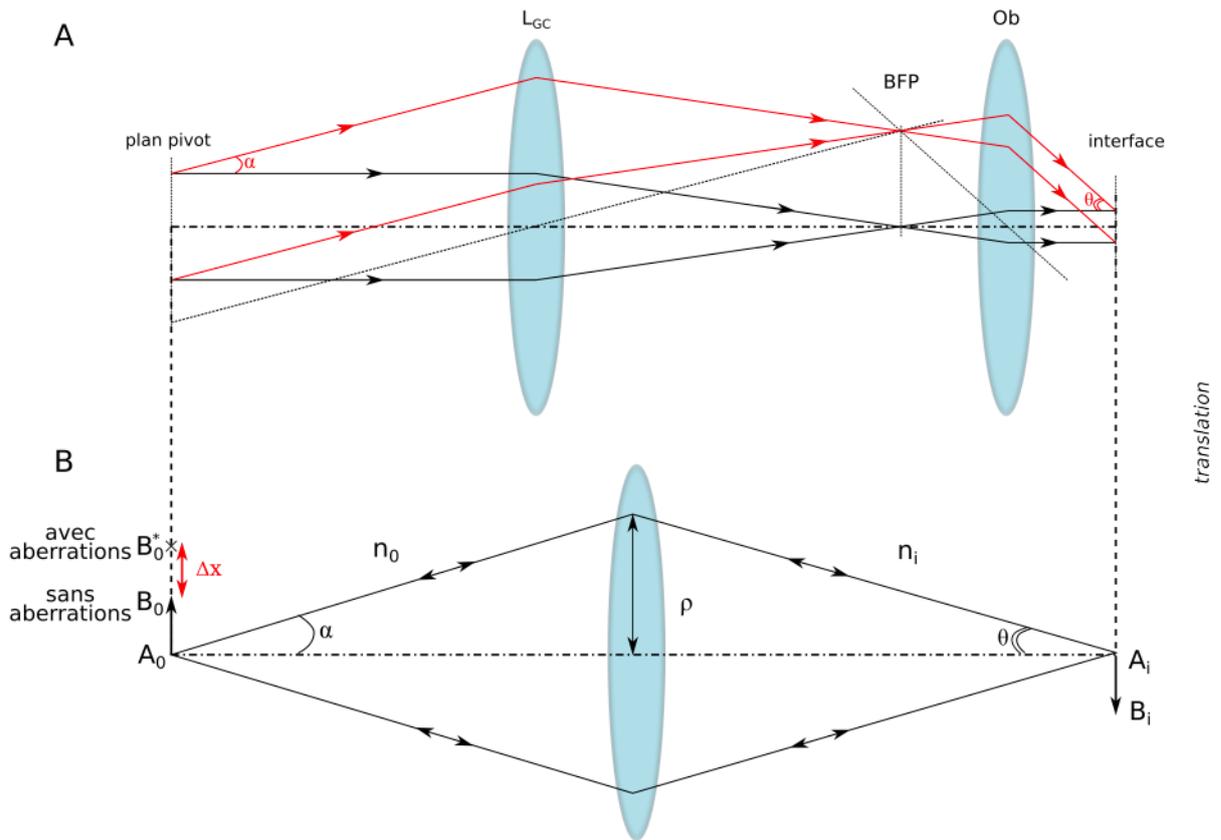


FIGURE 3.9 – Système imageur afocal composé de la lentille L_{GC} et l’objectif. (A) Lorsque le point pivot du miroir M_R est positionné à la distance focale de la lentille L_{GC} , le plan pivot et le plan image sont conjugués. (B) Schéma simplifié du système imageur où les aberrations sont illustrées comme une déformation Δx dans le plan pivot.

$$G_t = \frac{A_i B_i}{A_0 B_0} \frac{n_0}{n_i} \quad (3.4)$$

et

$$G_a = \frac{n_0}{n_i} \frac{1}{G_t} = \frac{A_0 B_0}{A_i B_i} = \frac{\theta}{\alpha} \quad (3.5)$$

Or, comme le montre la figure 3.8, notre système présente un certain nombre d’aberrations géométriques à prendre en compte pour établir la relation de grandissement entre α et θ . Il est coutume d’introduire les aberrations au niveau de l’image. Ces dernières induisent une déformation de l’image que l’on peut décrire par une variation Δx de la position B_i dans le plan image. Néanmoins, pour des raisons de simplification mathématique, il est tout à fait possible de transposer les aberrations au niveau de l’objet, $A_i B_i$ et $A_0 B_0$ étant conjugués via le système imageur. Les aberrations peuvent ainsi être décrites en supposant une déformation Δx de l’objet, tel que le $A_0 B_0^* = A_0 B_0 + \Delta x$. Si on tient compte des aberrations, G_a s’écrit alors :

$$G_a = \frac{\theta}{\alpha} = \frac{A_0 B_0^*}{A_i B_i} = \frac{A_0 B_0}{A_i B_i} + \frac{\Delta x}{A_i B_i} \quad (3.6)$$

Dans le cas d'un faisceau monochromatique, les aberrations courantes sont de cinq types : sphériques, coma, astigmatisme, courbure de champ et distorsion [157]. Même si les objectifs actuels de grande ouverture numérique sont conçus de façon à minimiser toutes ces aberrations, elles apparaissent inévitablement lorsqu'on augmente l'angle d'inclinaison des rayons lumineux [158]. De plus, la lentille de tube dans les microscopes joue un rôle non négligeable dans la correction des aberrations. Dans notre montage, nous avons utilisé une lentille conventionnelle pour L_{GC} (il s'agit d'un doublet achromatique de 2 pouces de diamètre). Les aberrations de type coma sont principalement liées à un mauvais alignement du faisceau laser, ce qui n'est pas le cas dans notre montage. L'astigmatisme et la distorsion sont parfaitement corrigés dans les objectifs à immersion à huile et ceux dédiés au TIRF [158]. En revanche, les aberrations sphériques et de courbure de champ peuvent être relativement importantes. Par conséquent, il est possible d'estimer Δx en ne tenant compte que de ces deux sources d'aberration. Pour les aberrations sphériques $\Delta x \approx \rho^3$ et pour la courbure de champ $\Delta x \approx \rho$ (ρ étant défini sur la figure 3.9 B) [157]. Puisque l'angle α est petit dans nos expériences (typiquement $\sim 0.5^\circ$), $\text{tg}\alpha \approx \alpha \approx \frac{\rho}{f_{GC}}$. Par conséquent G_a s'écrira :

$$G_a = \frac{A_0 B_0}{A_i B_i} + c_2 \alpha + c_4 \alpha^3 \quad (3.7)$$

où c_2 et c_4 sont des coefficients de proportionnalité. θ peut donc s'écrire comme :

$$\theta = G_a \alpha = \frac{A_0 B_0}{A_i B_i} \alpha + c_2 \alpha^2 + c_4 \alpha^4 \quad (3.8)$$

Le rapport $\frac{A_0 B_0}{A_i B_i}$ est le grandissement angulaire du système (objectif + lentille L_{GC}). Sachant que l'objectif que j'ai utilisé a un grandissement de 60x pour une lentille de tube de 180 mm, avec la lentille L_{GC} de focale 250 mm, $\frac{A_0 B_0}{A_i B_i} = 83.33$.

3.3.3 Détermination de θ

Je vais exposer dans ce paragraphe une méthode simple pour calibrer l'angle d'incidence θ en fonction de α . Elle repose sur l'analyse du signal de fluorescence provenant du BFP lorsqu'on excite une monocouche de QDots. L'image observée dans le BFP correspond à la projection du diagramme de rayonnement émis par l'ensemble des QDots excités. A partir des formules du paragraphe 2.2, il est possible de calculer ce que l'on doit observer dans le BFP de l'objectif pour un ensemble de dipôles aléatoirement orientés, parallèlement à l'interface (figure 3.10 A_1 et A_2), et perpendiculairement à l'interface (figure 3.10 B_1 et B_2). A l'aide de ces formules, il est également possible de calculer ce qui se passe dans le cas de dipôles organisés aléatoirement suivant x,y,z et dont l'ensemble constitue une émission isotrope (figure 3.10 C_1 et C_2). L'image du BFP présente un anneau périphérique brillant relatif au régime évanescent, i.e. $\theta > \theta_c$. La frontière intérieure de cet anneau est très intense

et correspond très exactement à $\theta = \theta_c$. θ_c est indiqué par un cercle rouge sur la figure 3.10 A_1 . L'émission des dipôles parallèles est beaucoup plus homogène au delà de θ_c (figure 3.10 A_1) que dans le cas de dipôles perpendiculaires (figure 3.10 B_1). Pour ces derniers, l'émission est beaucoup plus importante lorsque $\theta = \theta_c$ puis elle chute brutalement (figure 3.10 B_1, B_2), faisant apparaître un anneau périphérique plus fin.

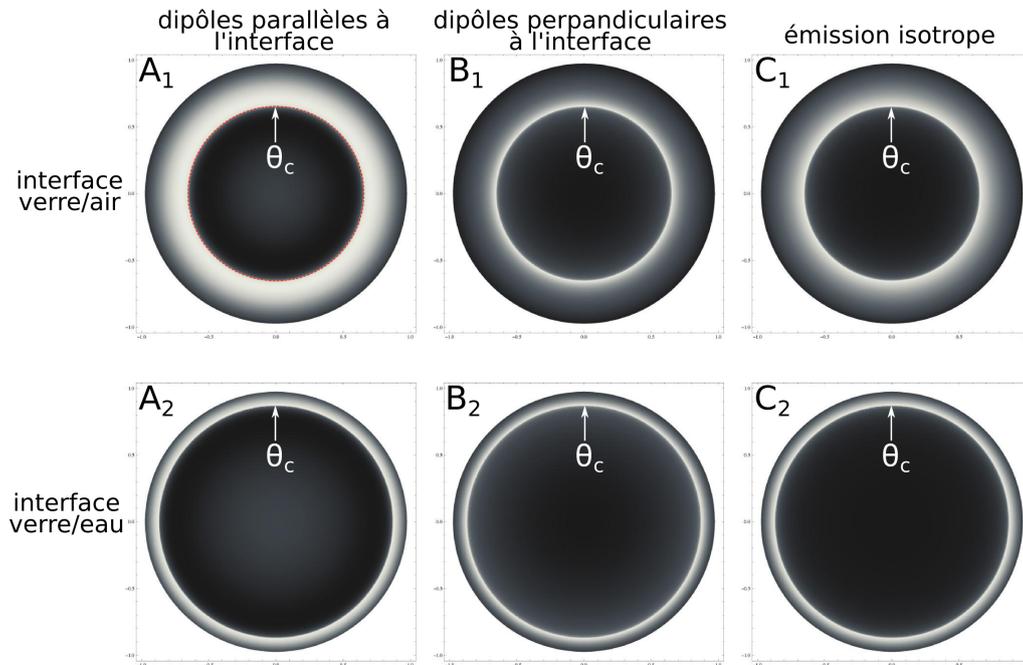


FIGURE 3.10 – Images théoriques du BFP dans le cas d'un objectif de 1.45 d'ON, calculées à partir des formules du paragraphe 2.2. Ce calcul ne tient compte d'aucune aberration. Les images A_1, B_1 représentent respectivement le signal émis par les dipôles parallèles, perpendiculaires pour une interface verre/air. L'image C_1 représente quant à elle une émission isotrope pour la même interface. Les images A_2, B_2 et C_2 représentent les mêmes configurations, mais cette fois pour l'interface verre/eau.

Sur les images expérimentales on observe en plus de l'émission des QDots la position du spot laser. En effet, ce dernier n'est pas complètement éliminé par les différents filtres. Il apparaît sur la figure 3.11 A comme un spot brillant au centre de l'image. Lorsque l'angle d'incidence du faisceau est incliné d'un angle α , le spot laser se déplacera verticalement (figure 3.11 B et C). Plus l'angle α augmente, plus le spot s'approche de l'anneau périphérique (figure 3.11 B). De cette façon, il est possible de suivre la position du spot laser en fonction de l'angle d'incidence α . On mesure alors la position angulaire de l'angle critique, α_c . Elle correspond au moment où le spot laser atteint la frontière intérieure de l'anneau (figure 3.11 C). La fluorescence est maximale quand $\alpha = \alpha_c$, ce qui se traduit par une accentuation de la brillance de l'anneau. On peut alors établir une correspondance très précise entre α et θ pour l'angle critique. La valeur expérimentale de l'angle critique α_c peut

être ensuite associée à une valeur théorique θ_c calculée pour différentes interfaces :

$$\theta_c = \arcsin(n') \quad (3.9)$$

sachant que $n' = n_1/n_2$ où n_2 correspond à l'indice de la lamelle de verre (1.53 à 488 nm) et n_1 l'indice du milieu d'observation, qui peut être tout simplement l'air comme sur l'exemple de la figure 3.11.

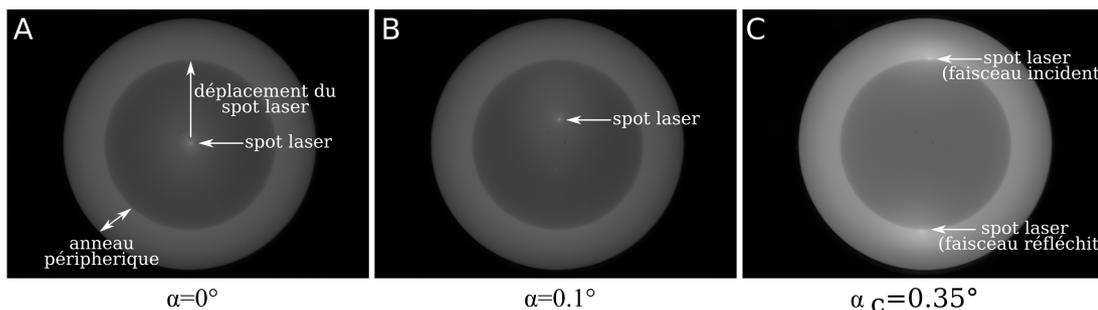


FIGURE 3.11 – Images expérimentales du plan focal arrière de l'objectif (BFP) pour l'interface verre/air. L'anneau périphérique correspond au domaine des ondes évanescentes et le spot brillant, au faisceau d'excitation laser. L'image du BFP à (A) $\alpha=0^\circ$ ou $\theta=0^\circ$, (B) à $\alpha=0.1^\circ$ et (C) à $\alpha=0.35^\circ$. Les images ont été obtenues avec une irradiances laser de 5 W/cm^2 et avec un temps d'acquisition de 150 ms.

Les images expérimentales de la figure 3.12 ressemblent fortement au profil d'émission calculé dans le cas de dipôles orientés aléatoirement suivant x,y,z et dont la résultante est une émission isotrope. Cette ressemblance peut être également illustrée à l'aide d'une intégration radiale du signal dans le BFP (figure 3.12). La courbe noire représente l'intégration radiale extraite à partir d'une image expérimentale du BFP pour l'interface verre/eau et la courbe rouge l'intégration radiale de l'image théorique (figure 3.10 C_2). Comme je l'ai précédemment écrit, l'image théorique a été calculée sans tenir compte des aberrations résiduelles du système. Pour cette raison, les deux courbes ne se superposent pas parfaitement lorsque $\theta \gtrsim \theta_c$. Cependant l'intensité maximale du signal de fluorescence (normalisée à 1 pour $\theta=0$) est identique dans les deux cas. Ainsi, cette expérience montre que l'organisation de nos boîtes quantiques sur l'interface est telle que l'émission est plutôt isotrope.

Afin d'obtenir une courbe de calibration $\theta(\alpha)$, nous avons fait varier n_1 en utilisant des milieux d'indices de réfraction différents. Les monocouches de QDots ont alors été immergées dans l'air, l'eau, le glycérol à 22% (dilué dans l'eau) et le butanol. Ces indices de réfraction théoriques ont été vérifiés expérimentalement à l'aide d'un réfractomètre (Pal-Ri, Atago). Les valeurs théoriques (θ_c) et expérimentales (α_c) de l'angle critique sont résumées dans le tableau 3.1. Les images du BFP pour chaque milieu n_1 sont présentées sur la figure 3.13.

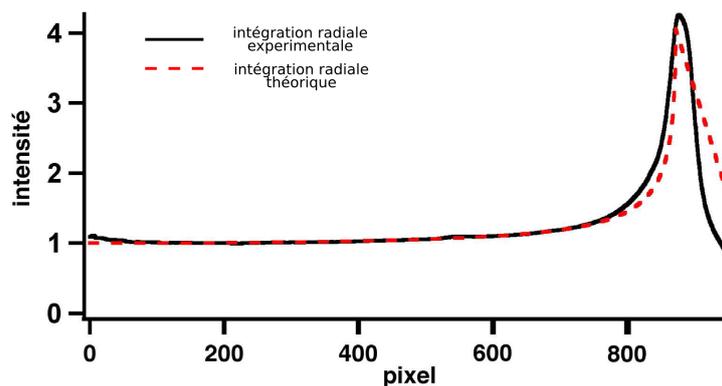


FIGURE 3.12 – Intégration radiale du signal émis par les dipôles orientés aléatoirement suivant x,y,z pour une interface verre/eau. La courbe noire représente l'intégration radiale du signal expérimental et la courbe rouge discontinue, le calcul théorique.

TABLEAU 3.1 – Evolution de l'angle critique (α et θ) en fonction de l'indice de réfraction dans différents milieux à $\sim 23^\circ\text{C}$, comparé avec l'indice théorique [159, 160].

milieu	n_{th}	n_{exp}	α_c (degré)	θ_c (degré)
air	1	1	0.35 ± 0.005	40.82
eau	1.333	1.333	0.466 ± 0.005	60.616
glycérol 22%	1.36	1.358	0.476 ± 0.005	62.585
butanol	1.394	1.397	0.49 ± 0.005	65.95

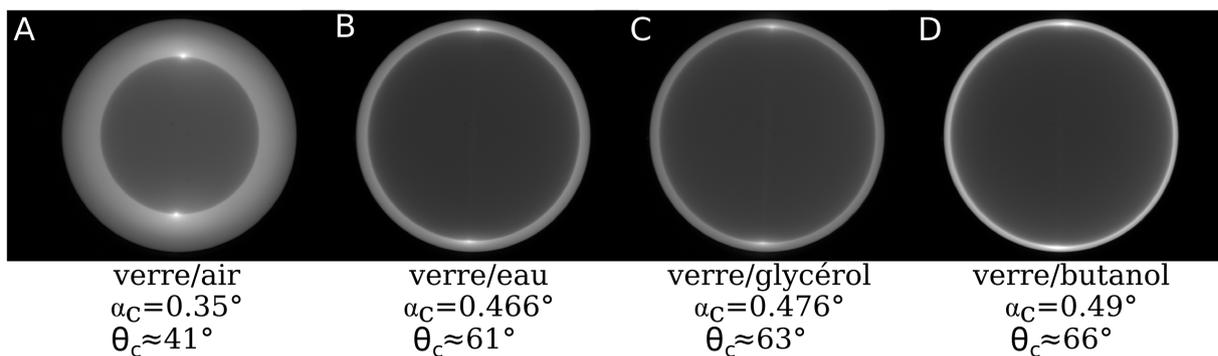


FIGURE 3.13 – Images du plan focal arrière de l'objectif (BFP) enregistrées pour $\alpha = \alpha_c$ pour quatre milieux d'indice n_1 différent. Les images ont été obtenues avec une irradiance laser de 5 W/cm^2 et un temps d'acquisition de 150 ms.

Ainsi, les valeurs de θ_c sont tracées en fonction de α_c (figure 3.14) et ajustées avec l'équation 3.8. Cette fonction prend en compte les aberrations sphériques et de courbure de champ résiduelles.

D'ailleurs, les aberrations de type courbure de champ sont observables sur les images de la figure 3.13, avec une déformation en croissant de lune du spot laser quand α est grand, typiquement $\alpha \gtrsim \alpha_c$. De façon générale, plus l'ouverture numérique est grande, plus les courbures de champ sont importantes. c_2 et c_4 ont été déterminés par la fonction polynomiale d'ajustement (équation 3.8) et valent respectivement $85 (\pm 5)$ et $77 (\pm 22)$. De cette façon, n'importe quelle valeur de l'angle d'incidence θ sur l'interface peut être calculée à partir de l'angle α . Grâce à la connaissance de l'angle d'incidence nous pouvons par la suite déterminer la profondeur d'atténuation κ de l'onde évanescente, calculée à partir de l'équation 2.24.

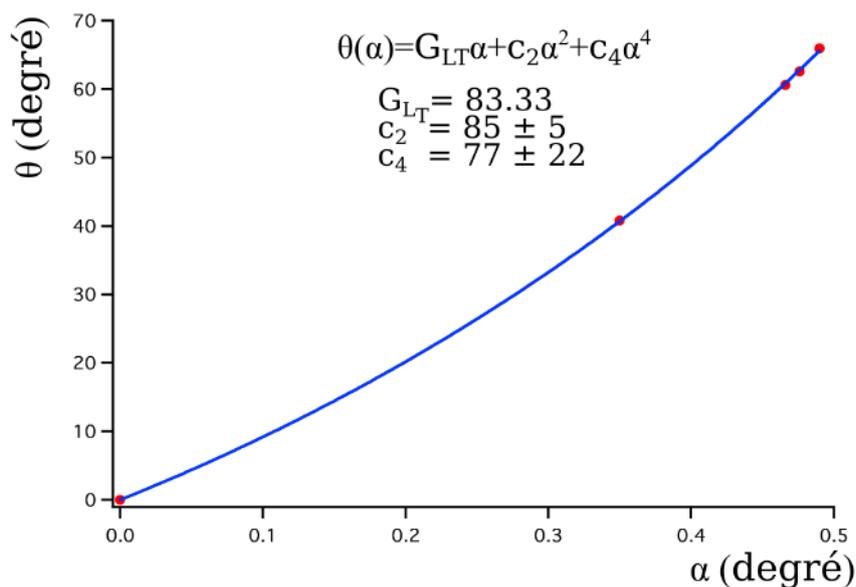


FIGURE 3.14 – Courbe de calibration de l'angle d'incidence θ en fonction de α . Les points expérimentaux (en rouge) pour les différentes interfaces verre/air, verre/eau, verre/glycérol, verre/butanol sont ajustés par l'équation 3.8 (courbe bleue), où c_2 et c_4 valent respectivement $85 (\pm 5)$ et $77 (\pm 22)$.

Chapitre 4

Etude de l'adhésion des vésicules par nTIRFM

4.1 Elaboration des vésicules géantes (Giant Unilamellar Vesicles)

4.1.1 Electroformation des vésicules

Les vésicules géantes ont été synthétisées par électroformation [82]. C'est une méthode relativement simple à mettre en oeuvre qui permet d'obtenir des vésicules de taille homogène et composées d'une seule bicouche lipidique. La synthèse des vésicules a été effectuée dans une chambre d'électroformation fabriquée par nos soins (figure 4.1). Elle se compose d'un cadre en téflon et de deux plaques de verre recouvertes d'une fine couche d'ITO, un matériau conducteur et transparent (Indium Tin Oxide). Nous avons choisi de réaliser un cadre en téflon car sa nature hydrophobe permet de préserver l'étanchéité du système. Des connectiques qui assurent le contact électrique au niveau de la couche ITO ont été collées sur les plaques à l'aide d'une résine conductrice contenant des particules d'argent.

Pour éviter toute contamination bactérienne, les plaques d'ITO sont soigneusement nettoyées au Decon 90, désinfectées à l'éthanol puis rincées abondamment à l'eau ultra-pure (Millipore, résistivité $>15 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, $\text{pH}=6$, fortement appauvrie en ions). Les lipides dilués dans le solvant ad hoc (chloroforme/ méthanol dans la majorité des cas) ont été déposés sur chaque plaque ITO à l'aide d'une seringue Hamilton. Le solvant est ensuite évaporé sous ultra vide pendant 30 minutes. Entre les deux plaques, on place un espaceur en téflon de 4 mm d'épaisseur. Les plaques sont montées en vis-à-vis dans le cadre en téflon et vissées ensemble afin de former un système étanche. Le cadre dispose de deux orifices : l'un pour injecter une solution de sucrose, l'autre pour aspirer les vésicules électroformées. La solution de sucrose à 200 mM est injectée avec une seringue équipée d'une fine aiguille (21G). On applique une différence de potentiel entre les deux plaques avec un générateur à basse fréquence dans le but de créer un champ électrique alternatif. Le champ créé à l'intérieur

de ce condenseur provoque le mouvement des molécules d'eau. Ce mouvement facilite l'autoassemblage en bicouche des lipides. Une tension de 0.2 V à la fréquence de 10 Hz est d'abord appliquée. L'amplitude est augmentée par paliers de 0.2 V, toutes les 30 minutes, jusqu'à atteindre 0.8 V. L'électroformation est alors poursuivie toute une nuit. Avant d'arrêter la synthèse des GUVs, la fréquence est baissée à 4 Hz et l'amplitude à 0.2 V pendant une durée de 15 min. Cette dernière étape permet de décoller les vésicules de la surface des plaques. Elles sont ensuite aspirées à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille de diamètre important (18 G) afin de limiter les forces de cisaillement qui provoqueraient la lyse des vésicules. Les vésicules ainsi préparées peuvent être conservées dans un récipient en verre à 4°C pendant environ un mois.

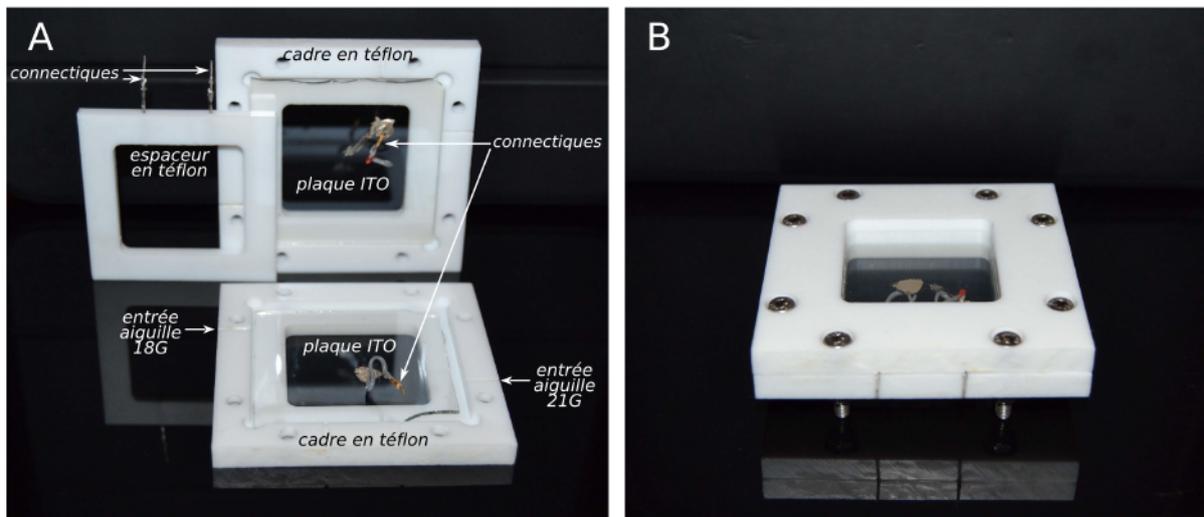


FIGURE 4.1 – Chambre d'électroformation : (A) Le système décomposé pièce par pièce. (B) La chambre assemblée.

4.1.2 Composition des membranes phospholipidiques

J'ai élaboré trois types de vésicules, présentés sur la figure 4.2. Tous les lipides ont été préparés à raison de 2 mg/mL. Le premier type de vésicules, utilisé dans la plupart des expériences, est composé de 99.9% en volume de lipides DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, MM=786 g/mol, Avanti Polar Lipids, 850375P) et de 0.1% en volume de DOPE-ATTO 488 (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-ATTO 488, MM=1316 g/mol, ATTO-TEC, AD488-165), figure 4.2 A. 0.1% de DOPE-ATTO 488 correspond à la concentration optimale pour obtenir un marquage homogène de la membrane. Les solutions sont préparées à 2 mg/mL dans un mélange chloroforme/méthanol (ratio volumique 9 :1) pour le DOPC et dans un mélange dichlorométhane/méthanol (ratio volumique 8 :2) pour DOPE-ATTO 488. Afin de mimer une adhésion spécifique de vésicules (i.e. qui met en jeu une liaison entre deux protéines), nous avons créé un deuxième type des vésicules. Elles sont composées comme précédemment de DOPC (95% en volume), de DOPE-

ATTO 488 (0.1% en volume), avec en plus 4.4% en volume de DSPE-mPEG2000 (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[métoxy(Polyéthylène Glycol)2000], MM=2805 g/mol, Avanti Polar Lipids, 880120P) et 0.5% en volume de DSPE-PEG2000-biotine (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[Biotinyl (Polyéthylène Glycol)2000], MM=3017 g/mol, Avanti Polar Lipids, 880129P) (figure 4.2 B). Ces deux derniers lipides ont été dilués dans un mélange de chloroforme/méthanol (9 :1). Le dernier type de vésicules que j'ai préparé a servi de système contrôle de l'adhésion spécifique (figure 4.2 C). Ces vésicules ont quasiment la même composition que les précédentes : elles ne contiennent pas de lipides biotinylés, DSPE-PEG2000-biotine.

Les phospholipides DOPC, DOPE ou DSPE sont caractérisés par une charge effective neutre (le greffage de molécules de biotine ou de PEG ne fait pas varier leur charge). Ce n'est pas le cas du fluorophore ATTO 488 (ATTO-TEC, AD 488-161). La charge nette de l'ATTO 488 est de -1 à pH 6-7 (figure 2.5 A). Lorsque l'ATTO est greffé au niveau de la tête polaire du phospholipide DOPE (figure 2.5 A), la membrane d'une vésicule composée de DOPE-ATTO 488 aura une charge effective légèrement négative.

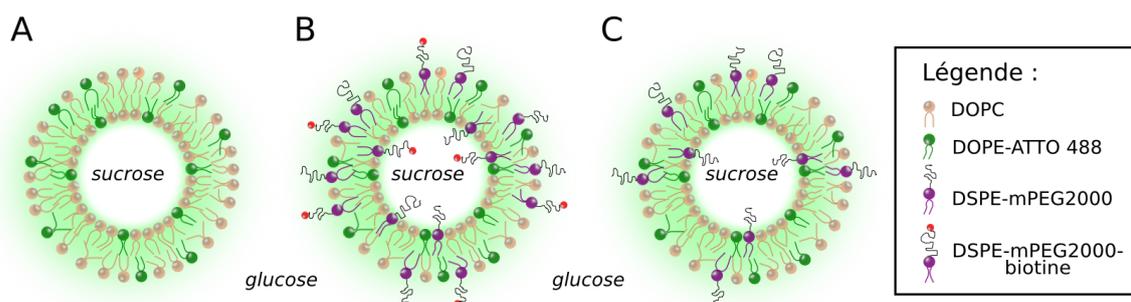


FIGURE 4.2 – Les trois types de compositions membranaires préparés : (A) GUV électroformée à partir de lipides DOPC et DOPE-ATTO 488 ; (B) de DOPC, DOPE-ATTO 488, DSPE-mPEG2000 et DSPE-mPEG2000-biotine ; (C) de DOPC, DOPE-ATTO 488, DSPE-mPEG2000.

Afin de promouvoir la sédimentation des vésicules dans l'échantillon, elles ont été transposées dans une solution de glucose à 250 mM (densité 1.0153 g/cm³). En effet, le sucrose présent à l'intérieur des vésicules a une masse molaire ~ 2 fois plus importante que celle du glucose (342 g/mol pour le sucrose contre 180 g/mol pour le glucose) : on favorise ainsi leur sédimentation guidée par la force gravitationnelle. La concentration en sucre est plus importante à l'extérieur (250 mM) qu'à l'intérieur de la vésicule (la densité du sucrose à 200 mM est 1.0246 g/cm³). Par ce biais, on induit une différence de pression osmotique de part et d'autre de la bicouche lipidique. Afin d'équilibrer la pression, les molécules d'eau passent de l'intérieur vers le milieu extérieur provoquant un léger dégonflement de la GUV. Ce phénomène provoque des fluctuations de la membrane, qui empêchent la vésicule d'éclater lorsqu'elle arrive en contact avec la surface.

4.2 Fonctionnalisation des lamelles de verre

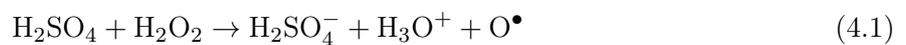
L'un des challenges de notre étude a été de fonctionnaliser des surfaces grâce auxquelles nous pourrions contrôler le comportement adhésif des vésicules. Ainsi, nous avons mis au point différents protocoles de préparation de surfaces afin d'obtenir soit une répulsion ou une attraction électrostatique (adhésion non spécifique), soit une adhésion spécifique par l'intermédiaire de protéines (couple biotine-streptavidine). La méthodologie adoptée pour obtenir chaque type de surface est détaillée dans ce paragraphe.

4.2.1 Réalisation de surfaces chargées négativement

Dans le but de provoquer une répulsion électrostatique des vésicules par la surface, nous avons préparé deux types de substrats chargés négativement. Pour rappel, la membrane de nos vésicules possède une charge effective négative.

A Surfaces SiOH

La première méthode, la plus simple à réaliser, consiste à nettoyer la surface de verre avec une solution piranha. Ce mélange hautement réactif, préparé à partir d'acide sulfurique (H_2SO_4) et d'eau oxygénée (H_2O_2) permet d'éliminer les contaminants organiques des surfaces, suivant la réaction [161] :



Les radicaux libres O^\bullet produits dans la réaction, réagissent avec la surface de verre (figure 4.3 A). La surface, après un traitement au piranha, est parfaitement homogène et présente des terminaisons SiOH (figure 4.3 B). Sa rugosité est très faible ($\lesssim 1$ nm, observé par l'AFM).

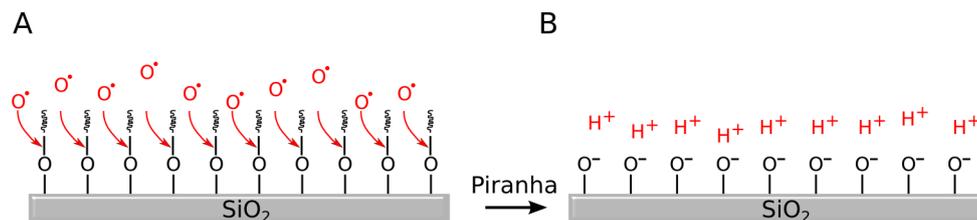


FIGURE 4.3 – Traitement des lamelles de verre au piranha. (A) Elimination des contaminants organiques par action des radicaux libres. (B) Surface nettoyée présentant les terminaisons SiOH, immergée dans l'eau.

Le protocole de préparation des surfaces SiOH est le suivant :

- Les lamelles sont positionnées verticalement dans un bac Hellendahl et immergées dans une solution de piranha pendant une heure à température ambiante. Le mélange piranha se compose de 50% H₂O₂ (à 35% dans l'eau, Sigma Aldrich, 349887) et de 50% H₂SO₄ (pureté 98%, VWR, 102765G).
- Les lamelles sont ensuite soigneusement rincées à l'eau ultra-pure.
- Avant dépôt des vésicules, les lamelles sont séchées à l'argon ou l'azote.

B β -caséine

La β -caséine est une petite protéine. Sa masse moléculaire est de 24 kDa. Elle est présente majoritairement dans le lait (~40% de la masse totale des protéines du lait). Sur cette protéine, il est possible d'identifier deux régions fonctionnelles où le domaine N terminal possède un caractère hydrophile (~50 acides aminés), le reste de la molécule étant hydrophobe. On peut alors tout à fait imaginer que la partie hydrophobe est absorbée à la surface de la lamelle et la partie hydrophile est orientée du côté de la solution. Dans la partie hydrophile, on constate la présence de 5 résidus de type sérine. La chaîne latérale de ces acides aminés peut être estérifiée en présence des groupements phosphates (figure 4.4 A). Ainsi, les sérines phosphorylées sont à l'origine de la charge effective négative de la protéine. Le protocole d'élaboration des surfaces est le suivant :

- Les lamelles sont dégraissées à l'isopropanol dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes.
- Les lamelles sont ensuite recouvertes d'une solution de β -caséine (pureté $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, C6905) diluée à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du PBS à 250 mM (Phosphate Buffer Solution 1M, pH=7.4, Sigma Aldrich, P3619).
- Après une heure d'incubation, les surfaces sont rincées à l'eau ultra-pure puis séchées à l'argon ou l'azote.

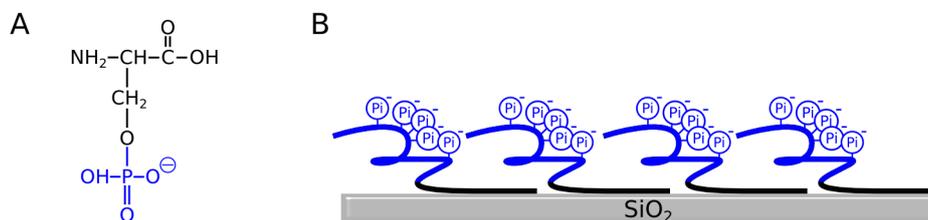


FIGURE 4.4 – (A) Structure chimique de la sérine. Le groupement phosphate (en bleu) apporte un caractère électro-négatif à la β -caséine. (B) Absorption des β -caséines sur une surface en verre. La partie hydrophobe est liée à la surface, alors que la partie hydrophile s'oriente vers la solution aqueuse.

4.2.2 Réalisation de surfaces chargées positivement

Nous avons également souhaité développer des surfaces donnant lieu à une attraction électrostatique. Dans le but de moduler le comportement des vésicules en fonction de la charge, trois types de substrats ont été préparés.

A Aminosilanes

La première catégorie de surfaces présente une terminaison amines (NH_2). Pour cela, les lamelles ont été fonctionnalisées à l'aide d'un aminosilane. Les aminosilanes sont des composés chimiques dotés d'un groupement fonctionnel amine. L'aminosilane utilisé lors de nos fonctionnalisations est le 3-aminopropyldiméthylethoxysilane (APDMES, $\text{MM}=161$ g/mol, pureté $\geq 97\%$, Abcr, AB110423), présenté sur la figure 4.5 B. La lamelle est préalablement nettoyée au piranha. Elle expose à sa surface les groupements hydroxyyles qui réagiront avec l'atome Si de l'aminosilane. Ainsi le groupement éthoxy (OCH_2CH_3) est déplacé, ce qui permet la formation de liaisons covalentes Si-O-Si. La silanisation des surfaces permet d'obtenir un substrat très homogène. Il est important de noter que cette fonctionnalisation est réalisée dans une boîte à gants sous pression d'argon.

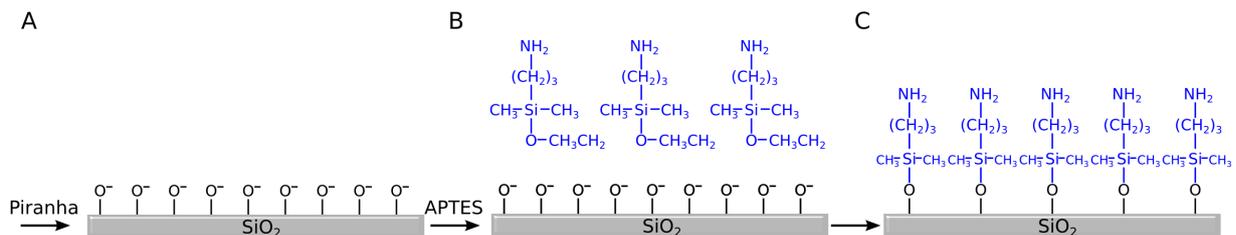


FIGURE 4.5 – Fonctionnalisation des surfaces avec les aminosilanes : (A) nettoyage de la surface au piranha, (B) incubation de la surface avec des aminosilanes, (C) formation des liaisons Si-O-Si entre les aminosilanes et la surface.

Le protocole utilisé pour obtenir ce substrat est le suivant :

- Les surfaces doivent d'abord être soigneusement nettoyées. Pour cela, les lamelles sont positionnées verticalement dans un bac Hellendahl et immergées dans une solution de piranha pendant 30 minutes à température ambiante. Comme précédemment, le mélange piranha a été obtenu à partir de 50% H_2O_2 et de 50% H_2SO_4 (figure 4.5 A).
- Les lamelles sont ensuite soigneusement rincées à l'eau ultra-pure afin d'éliminer toute trace d'acide. Elles sont conservées dans l'eau ultra-pure pour éviter la contamination de l'échantillon.
- Les surfaces nettoyées sont séchées à la tournette pendant 2 minutes (4000 RPM et 3000 RPM/s).

- Les lamelles sont transférées dans un nouveau bac Hellendahl au sein d'une boîte à gants. Elles sont alors plongées dans une solution de 3-aminopropyldiméthylethoxysilane (APDMES, MM=161 g/mol, pureté $\geq 97\%$, Abcr, AB110423) diluée à 0.8% dans du toluène anhydre (concentration 99%, VWR, 41464-AK) (figure 4.5 B). Les terminaisons SiOH permettent les liaisons des groupements réactifs des silanes (figure 4.5 C). La cinétique d'adsorption des silanes est extrêmement lente. On estime que 80-90% des silanes sont adsorbés dans les trois premières heures. Cependant il faut attendre plusieurs heures pour recouvrir l'ensemble de la surface. Ainsi, nous avons fixé l'incubation à 24 heures.
- Au bout de 24 heures, les lamelles sont rincées deux fois au toluène anhydre et sorties de la boîte à gants.
- Elles sont ensuite transférées dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes afin de détacher tous les silanes accrochés de manière non covalente.
- Afin d'éliminer le solvant de la surface des lamelles, le toluène a été évaporé à l'aide d'une pompe à vide jusqu'à une pression de l'ordre de 10^{-6} mbar.

B Poly-L-lysine

La deuxième molécule choisie est la poly-L-lysine. Ce polymère est constitué d'une chaîne de plusieurs lysines, un des acides aminés les plus courants entrant dans la composition des protéines. Les lysines sont liées les unes aux autres par des liaisons peptidiques (entre le groupement carboxyle et amine). Elles possèdent une chaîne latérale, composée de quatre carbones, avec un groupement amine à son extrémité. A pH physiologique (~ 7), les fonctions amines sont chargées positivement (NH_3^+). Le caractère polycation permet une adsorption facile sur beaucoup de surfaces, par exemple le verre (figure 4.6). La petite taille de la molécule permet d'obtenir une couche d'épaisseur nanométrique. Afin de réaliser les surfaces hautement chargées, nous avons utilisé une poly-L-lysine d'une masse moléculaire comprise entre 150 et 300 kDa. Ce polymère se compose alors d'environ 1.4×10^3 à 2.7×10^3 molécules de lysine. Le protocole pour déposer de la poly-L-lysine est résumé ci dessous :

- Les lamelles de verre sont d'abord dégraissées à l'isopropanol. Pour cela, les lamelles sont installées dans un bac Hellendahl puis placées dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes.
- Les surfaces ainsi nettoyées sont ensuite séchées à l'argon ou l'azote.
- Les lamelles sont alors incubées pendant 1 heure avec une solution de poly-L-lysine (MM=150-300 kDa, 0.01%, Sigma Aldrich, P4832) diluée à 3% en volume dans l'eau ultra-pure (pH=6).
- Afin d'enlever l'excès de polymère non adsorbé, les substrats sont rincés à l'eau ultra-pure puis séchés à l'argon ou l'azote.

C PDDA

La troisième surface consiste à déposer un polymère chargé positivement : Poly (diallyldiméthylammonium chloride) (PDDA). C'est un long polymère caractérisé par une densité de charges

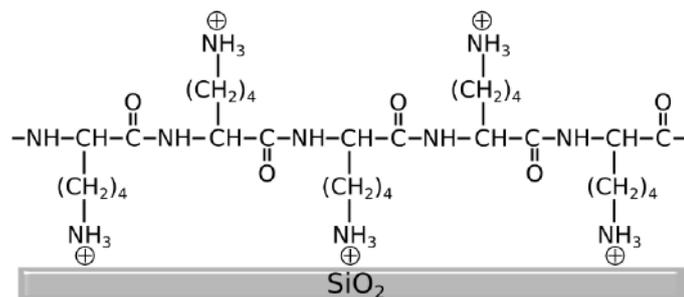


FIGURE 4.6 – Adsorption d'un polymère poly-L-lysine sur une surface en verre.

élevée. Sa masse moléculaire est de l'ordre de quelques centaines de milliers g/mol. Le groupement amine se situe sur le cycle pyrrolidine. Pour que la chaîne du polymère soit correctement déroulée sur la surface, il doit être attiré par les charges négatives présentes à la surface (figure 4.7). Dans le cas contraire, il formera des "pelotes". Afin d'obtenir une couche de PDDA homogène, de l'ordre de 1 nm, nous avons développé le protocole suivant :

- Afin d'obtenir les terminaisons SiOH à la surface, les lamelles sont tout d'abord traitées par une solution piranha.
- Les surfaces sont exposées pendant 1 heure au PDDA (MM= 4×10^5 - 5×10^5 g/mol à 20% dans l'eau ultra-pure, Sigma-Aldrich, 409030) dilué à la concentration de 10 mM dans un tampon à pH acide (AVS Titrimorm buffer, pH=4, 32095.264, VWR).
- Afin d'enlever l'excès de polymère non adsorbé, les substrats sont rincés à l'eau ultra-pure puis séchés à l'argon ou l'azote.

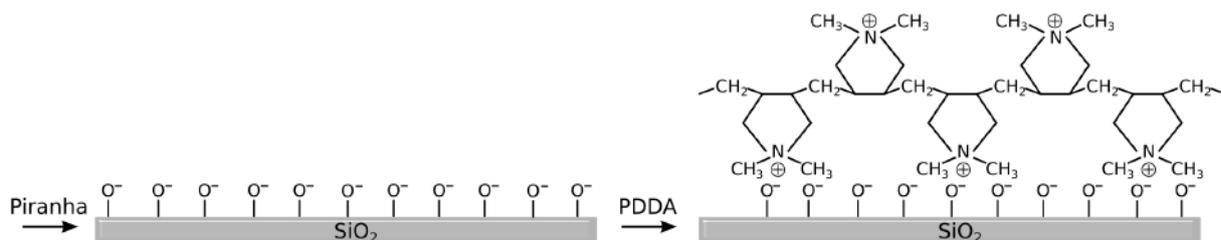


FIGURE 4.7 – Fonctionnalisation de la surface à l'aide de PDDA. Les surfaces sont d'abord nettoyées au piranha. Le groupement amine du PDDA se lie de façon électrostatique aux fonctions SiOH.

4.2.3 Fonctionnalisation des surfaces avec des polyéthylènes glycols (PEG)

A Silanisation de la surface

Les lamelles ont été préactivées avec un silane afin de présenter un groupement terminal amine et permettre la liaison des PEG (figure 4.8 A₃). Le protocole utilisé pour obtenir ce substrat a été présenté dans le paragraphe 4.2.2 A.

B Greffage des PEG

Afin de moduler le comportement des vésicules, j'ai greffé deux différents types de polyéthylènes glycols sur la couche d'aminosilane : des mPEG-NHS 2000 et 5000 (Méthoxy-polyéthylène glycol-NHS), d'une masse molaire respective de 2000 g/mol et 5000 g/mol (DZ3521 et DZ3531, Interchim).

Le protocole de dépôt des PEG-NHS est le suivant :

- Les surfaces silanisées sont incubées pendant une heure avec une solution de polyéthylène glycol-NHS dilué à 10 mg/mL, dans une solution tampon carbonate-bicarbonate à 100 mM (pH=9). Le groupement N-hydroxysuccinimide (NHS) est un groupement hautement réactif qui réagit avec des fonctions amines (figure 4.8 B_1). A pH basique, les esters NHS réagissent avec des amines primaires pour former des liaisons stables amides (figure 4.8 B_2). La réaction est terminée en une heure.
- Les surfaces sont rincées à l'eau ultra-pure puis séchées à l'argon ou l'azote.

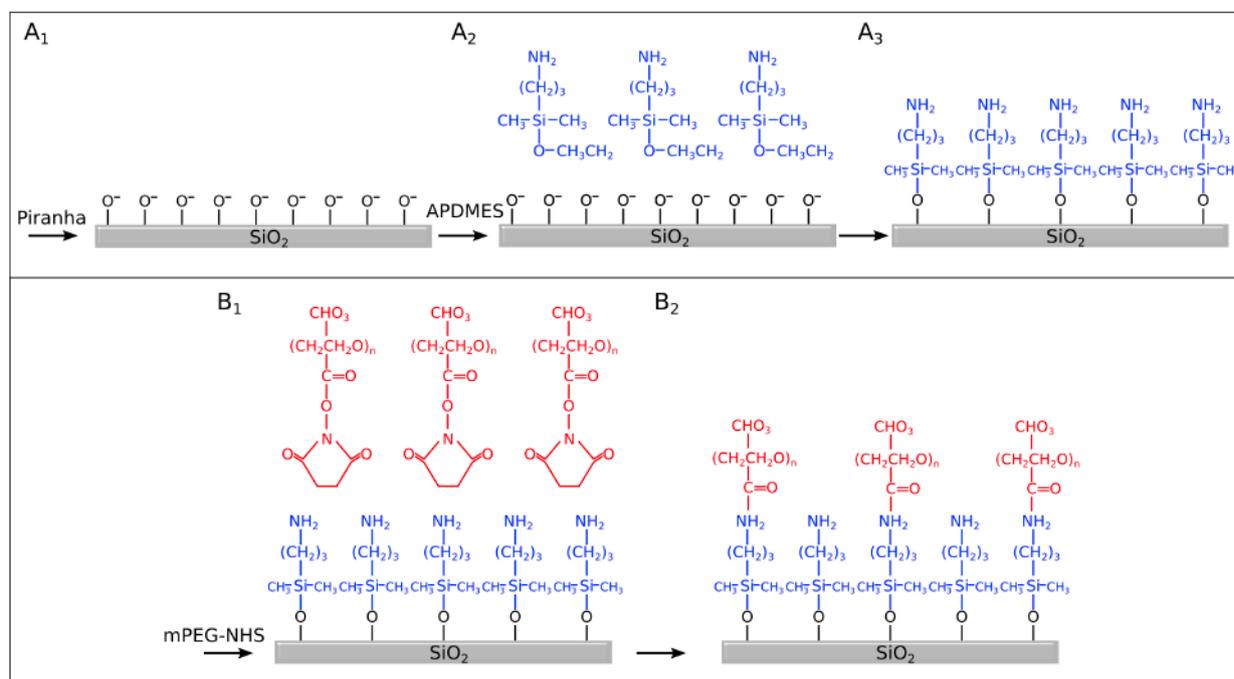


FIGURE 4.8 – Fonctionnalisation des surfaces par les PEG : (A_1) nettoyage de la surface au piranha, (A_2) incubation de la surface avec des aminosilanes, (A_3) liaison des silanes sur la surface, (B_1) incubation des surfaces silanisées avec des mPEG-NHS, (B_2) formation des liaisons amides entre les silanes et les PEG.

4.2.4 Fonctionnalisation des surfaces avec de la streptavidine

Afin de réaliser les surfaces destinées aux expériences d'adhésion spécifique, nous avons fonctionnalisé les surfaces avec de la streptavidine. La streptavidine est un homo-tétramère et sa structure tertiaire présente quatre poches pour loger la biotine, plus petite. Cette dernière est présente à la

surface des GUVs. Le complexe de biotine-streptavidine se caractérise par de nombreuses liaisons hydrogènes et van der Waals. La majeure partie du protocole utilisé pour cette fonctionnalisation a été décrite dans les deux paragraphes précédents. Le point de départ est une surface recouverte de biotine-PEG-NHS. Le protocole est alors le suivant :

- Les lamelles fonctionnalisées par des aminosilanes sont incubées avec une préparation de biotine-PEG-NHS (MM=5000 g/mol, IL1870, Interchim) dans les mêmes conditions que les autres mPEG-NHS (figure 4.5).
- Les lamelles sont ensuite incubées 30 minutes avec une solution de la streptavidine (streptavidine recombinante de *Streptomyces avidinii*, lyophilisée, S0677, Sigma-Aldrich). La protéine a été diluée dans une solution tampon phosphate (PBS, pH=7.2, Invitrogen Life Technologies) à 100 µg/mL.
- Les surfaces sont alors rincées à l'eau ultra-pure puis séchées à l'argon (ou l'azote).

4.3 Caractérisation des surfaces par mesure d'angles de contact

Afin de caractériser nos différentes surfaces fonctionnalisées, nous avons choisi de mesurer les angles de contact d'une goutte d'eau déposée sur les surfaces. Cette méthode permet de quantifier l'affinité d'une solution sur une surface, c'est-à-dire le degré d'hydrophobicité de la surface. Ces mesures de mouillabilité sont simples et rapides à réaliser. Elles permettent de mettre en évidence le changement d'hydrophobicité d'une surface qui résulte de la fonctionnalisation. Dans ce paragraphe je vais décrire les paramètres à prendre en considération lors d'un phénomène de mouillage. Je décrirai le principe d'utilisation de l'appareil de mesure et de détermination des angles de contact. Enfin, les résultats expérimentaux seront présentés pour chacune des surfaces préparées.

4.3.1 Principe général de la mesure d'angles de contact

La mouillabilité d'une surface définit la facilité avec laquelle une goutte de liquide va s'étaler sur cette dernière. La mouillabilité se caractérise par l'angle de contact θ que fait une goutte de liquide sur l'interface (figure 4.9). Le profil de la goutte dépend alors de trois tensions interfaciales : solide-liquide (γ_{SL}), solide-vapeur (γ_{SV}) et liquide-vapeur (γ_{LV}). En d'autres termes, plus θ est grand, plus la surface est hydrophobe. A l'opposé, plus θ est petit, plus la surface est hydrophile.

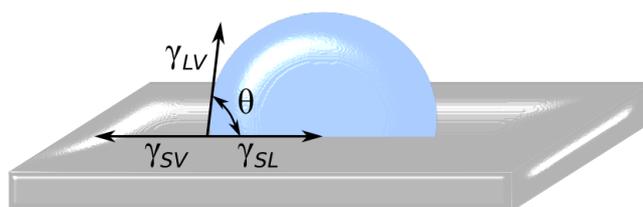


FIGURE 4.9 – Profil d'une goutte étalée sur une surface solide. γ_{SL} , γ_{SV} , γ_{LV} représentent respectivement la tension interfaciale solide-liquide, solide-vapeur et liquide-vapeur et θ l'angle de contact de la goutte avec la surface.

A l'équilibre, la somme de trois forces exercées au niveau de l'interface est nulle, ce qui conduit à la relation de Young décrite par l'équation :

$$\cos \theta_E = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad (4.2)$$

où θ_E est un angle de contact en équilibre. Cependant, la relation de Young n'est vraie que dans le cas où la goutte est en équilibre parfait avec la surface sur laquelle elle repose. Ceci est possible uniquement dans le cas où la surface est très homogène et parfaitement plane. Or, les propriétés d'une surface peuvent être modifiées par l'intermédiaire d'un traitement chimique. Ainsi, toute fonctionnalisation de surface peut induire un changement de nature chimique et de rugosité. L'effet de la rugosité des surfaces a été décrit dans les années 40 par Wenzel [162]. Il a observé que la présence d'une micro-texture sur une surface hydrophobe, renforce davantage son caractère hydrophobe. La mesure d'angles de contact apparaît donc comme une méthode rapide et efficace pour montrer le changement d'état de la surface après fonctionnalisation (bien plus simple que la microscopie électronique ou à force atomique). Cette mesure permet aussi de vérifier l'homogénéité de la fonctionnalisation à grande échelle, typiquement sur toute la surface de la lamelle de verre.

4.3.2 Mesure d'angles de contact

Tout au long de ma thèse, après chaque étape de mise au point d'un nouveau protocole de fonctionnalisation, j'ai pris soin de caractériser les surfaces par des mesures d'angles de contact. Ces angles ont été mesurés à l'aide d'un instrument optique OCA15EC (Data Physics). D'un point de vue pratique, la surface à analyser est installée à l'horizontal sur un porte échantillon. Une goutte d'1 μl d'eau ultra-pure est alors déposée sur la surface à l'aide d'une seringue montée sur un pousse-seringue (figure 4.10). Le système optique permet d'observer le profil de la goutte à l'aide d'une caméra CCD, équipée d'un objectif de grande distance de travail.

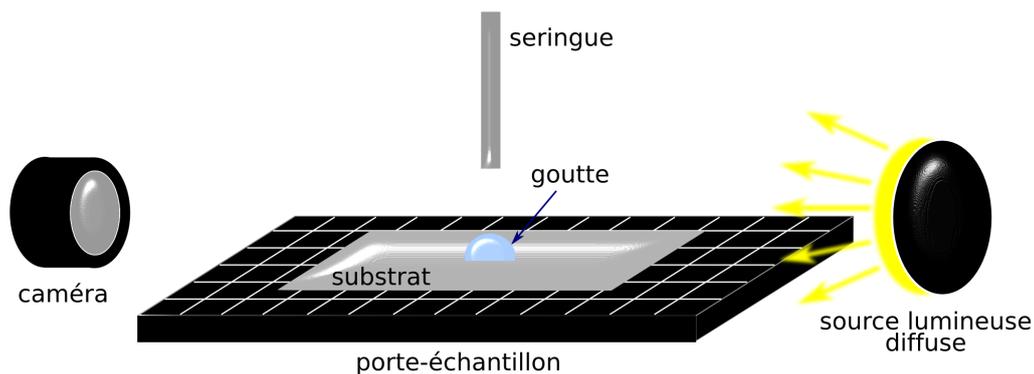


FIGURE 4.10 – L'instrument optique de mesure d'angles de contact, équipé d'un pousse-seringue qui dépose de petites gouttes sur la surface. Une source de lumière éclaire l'échantillon par l'arrière et une caméra équipée d'un objectif permet d'observer le profil de la goutte.

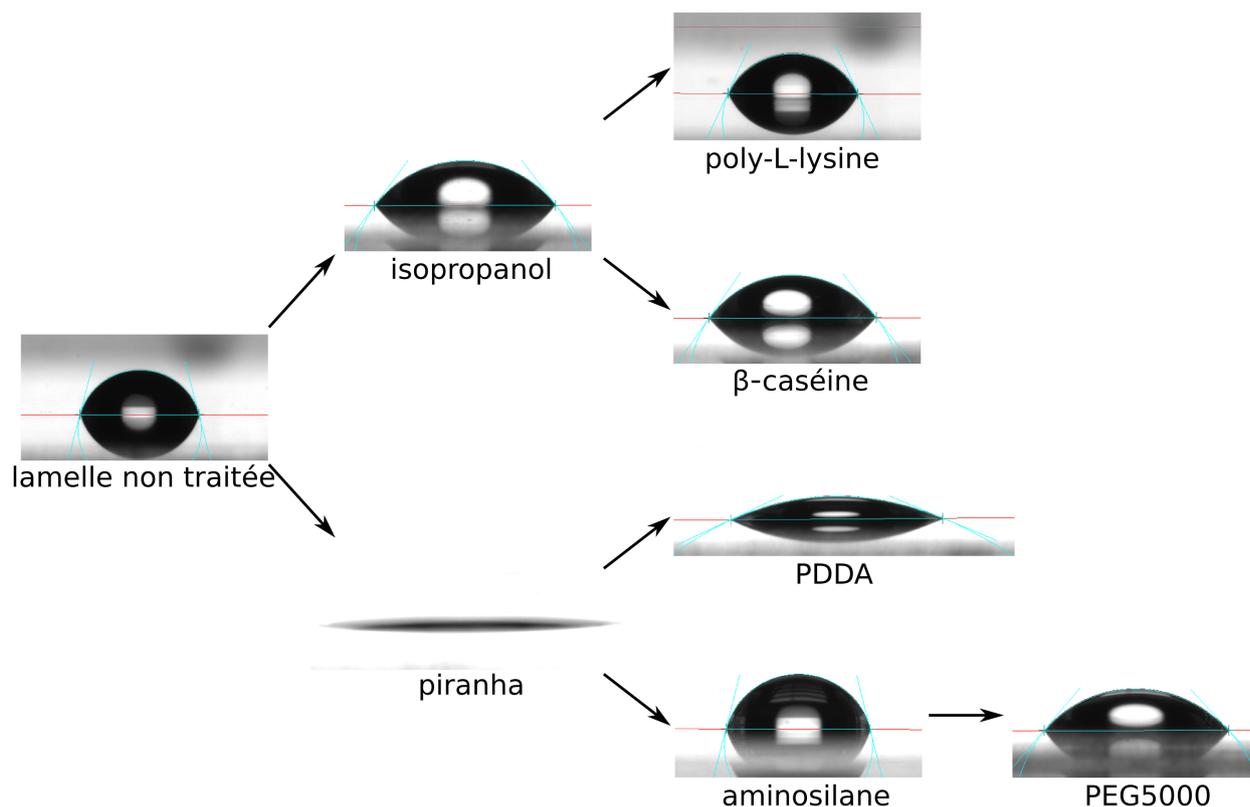


FIGURE 4.11 – Evolution du profil des gouttelettes d'eau déposées sur chaque surface nettoyée puis fonctionnalisée. La ligne rouge figure l'interface. Le profil de la goutte est délimité par l'ellipse dessinée en bleu.

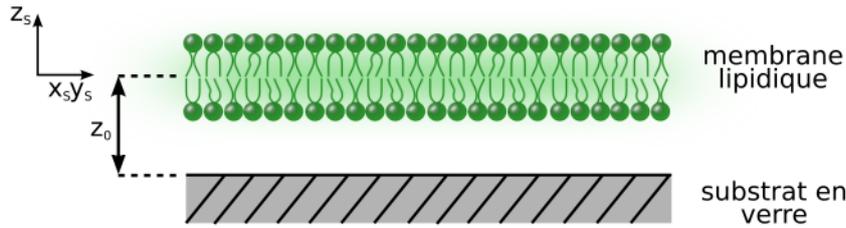
Une ligne de base est tracée au niveau de l'interface eau/substrat. La mesure de l'angle s'effectue à partir de l'image enregistrée avec la caméra. Le profil de la goutte est alors déterminé via un logiciel SCA20. Ce logiciel utilise la méthode par arc d'ellipse pour déterminer l'angle de contact. Le contour de la goutte est ajusté suivant la forme d'un segment d'ellipse. De cette manière, tout le contour de la goutte est parfaitement pris en compte et pas uniquement l'intersection du liquide avec la ligne de base. Les angles de contact de deux côtés de la goutte sont obtenus grâce à un ajustement numérique. Une dizaine de mesures ont été effectuées sur une ou plusieurs lamelles et les résultats sont donnés en terme d'angle moyen pour chaque type de substrat (tableau 4.1). L'évolution du profil des gouttes après chaque traitement de surface est présenté sur la figure 4.11. Il est intéressant de noter qu'après nettoyage au piranha, les surfaces sont très hydrophiles. L'angle de contact est inférieur à 5° (notre appareil ne permet pas de mesurer des angles $\lesssim 5^\circ$).

TABLEAU 4.1 – Tableau récapitulatif des mesures d'angles de contact sur les surfaces étudiées. N signifie le nombre des mesures effectuées.

surface	N	angle moyen (degré)	écart-type (degré)
lamelle non traitée	29	73	7
isopropanol	15	53	2
poly-L-lysine	30	66	4
β -caséine	20	56	4
PDDA	18	23	2
aminosilane	48	75	2
PEG5000	10	46	4
SiOH	-	$\lesssim 6$	-

4.4 Mesure de la distance membrane-surface par TIRF normalisé (nTIRF)

Nous avons développé une technique de microscopie de fluorescence dédiée à l'étude de l'adhésion de vésicules géantes. Cette technique est basée sur une double mesure par microscopie TIRF ($\theta > \theta_c$) et par épi-fluorescence ($\theta = 0^\circ$). Dans ce paragraphe, je vais montrer qu'il est possible de déterminer la distance z_0 qui sépare la membrane lipidique de la surface (figure 4.12), par normalisation du signal TIRF à l'aide de celui enregistré en épi-fluorescence.

FIGURE 4.12 – Membrane lipidique éloignée d'une distance z_0 de l'interface.

4.4.1 Calcul de la distance membrane-interface (approche théorique)

L'interprétation quantitative d'une image TIRF en ce qui concerne la distance membrane/support n'est pas triviale. En effet, le contraste des images TIRF dépend de plusieurs paramètres, dont certains sont inconnus, comme la concentration locale de fluorophores. Un point brillant sur l'image TIRF ne signifie pas forcément que l'objet est situé très près de l'interface mais peut tout simplement être la conséquence de l'aggrégation de fluorophores, même à une distance importante de la surface. En d'autres termes, le signal de fluorescence en TIRF ne dépend pas seulement du déclin exponentiel de l'onde évanescente et de la distance z_0 qui sépare les objets fluorescents de l'interface. Néanmoins, je vais montrer qu'il est possible de s'affranchir de tous ces paramètres inconnus en normalisant l'image TIRF par une autre image obtenue en épi-fluorescence. Pour cela, je vais tout d'abord considérer un plan fluorescent, parallèle à l'interface, infiniment fin et qui émet un signal isotrope.

Le signal de fluorescence f_d enregistré sur un pixel (x_d, y_d) de la caméra CMOS en microscopie grand champ peut s'exprimer sous la forme suivante [163] :

$$f_d(x_d, y_d, \theta) = \iiint dx_s dy_s dz_s f_s(x_s, y_s, z_s, \theta) PSF_{det}(x_d - x_s, y_d - y_s, -z_s) \quad (4.3)$$

où PSF_{det} décrit la "point-spread function" de détection pour un pixel et f_s le signal de fluorescence généré dans l'échantillon. Ce signal peut s'écrire :

$$f_s(x_s, y_s, z_s, \theta) = \eta_d(z_s + z_0) \sigma_{abs}(z_s + z_0) \phi(z_s + z_0) \frac{I_{exc}(x_s, y_s, z_s, z_0, \theta)}{\frac{hc}{\lambda}} C(x_s, y_s, z_s) \quad (4.4)$$

Pour rappel, σ_{abs} est la section efficace d'absorption, $\frac{hc}{\lambda}$ correspond à l'énergie du photon absorbé, η_d est l'efficacité de détection du dispositif et ϕ le rendement quantique. I_{exc} désigne le profil d'excitation laser à un angle donné θ . C représente la distribution locale des fluorophores dans l'échantillon. Si les molécules fluorescentes sont présentes à proximité de l'interface ($z \lesssim \lambda$), η_d , σ_{abs} et ϕ vont fortement dépendre de z_0 . Les variations de η_d avec z ont été évaluées dans le chapitre 2 (voir efficacité de collection ϵ , figure 2.10). En ce qui concerne σ_{abs} et ϕ , on peut également obtenir

leur variation avec z à travers le taux d'émission k_r [134, 133, 135, 164]. En effet k_r , et par voie de conséquence la durée de vie, varient fortement quand la molécule est proche d'une interface. D'ailleurs ce phénomène est à la base de la microscopie MIET (Metal-induced energy transfer) récemment proposée par l'équipe de J. Enderlein pour étudier l'adhésion cellulaire [155].

Dans le cas où on considère un plan fluorescent homogène et d'épaisseur $\ll \lambda$, la distribution de molécule s'écrit tout simplement $C(x_s, y_s, z_s) = C_0 \delta(z_s)$ où C_0 est un nombre moyen de molécule et δ la distribution de Dirac (les molécules fluorescentes se trouvent dans le plan $z_s = 0$). Dans ces conditions, les profils d'excitation laser en épi-fluorescence ($\theta = 0$) et en TIRF ($\theta > \theta_c$) sont :

$$I_{exc}(x_s, y_s, z_s, \theta = 0) = I_0 e^{-\frac{2(x_s^2 + y_s^2)}{\omega_L^2}} \quad (4.5)$$

$$I_{exc}(x_s, y_s, z_s, z_0, \theta > \theta_c) = \gamma(\theta) I_0 e^{-\frac{2(x_s^2 + y_s^2)}{\omega_L^2}} e^{-\frac{(z_s + z_0)}{\kappa(\theta)}} \quad (4.6)$$

où ω_L est le profil latéral de l'irradiance laser. Avec notre premier dispositif expérimental $\omega_L = 50$ μm . γ est le facteur de correction qui tient compte de la variation de "l'intensité" d'excitation au niveau de l'interface en fonction de l'angle d'incidence (figure 2.14, paragraphe 2.4.2). κ est la profondeur d'atténuation de l'onde évanescente dans l'échantillon (équation 2.24, paragraphe 2.4.2).

Sachant que $C = C_0 \delta(z_s)$, le signal de fluorescence enregistré sur la caméra CMOS s'écrit alors pour $\theta = 0$ et $\theta > \theta_c$:

$$f_d(x_d, y_d, \theta > \theta_c) = \eta_d(z_0) \sigma_{abs}(z_0) \phi(z_0) \frac{I_0}{\frac{hc}{\lambda}} C_0 \gamma(\theta) e^{-\frac{z_0}{\kappa(\theta)}} \iint dx_s dy_s e^{-\frac{2(x_s^2 + y_s^2)}{\omega_L^2}} \text{PSF}_{\det}(x_d - x_s, y_d - y_s, 0) \quad (4.7)$$

$$f_d(x_d, y_d, \theta = 0) = \eta_d(z_0) \sigma_{abs}(z_0) \phi(z_0) \frac{I_0}{\frac{hc}{\lambda}} C_0 \iint dx_s dy_s e^{-\frac{2(x_s^2 + y_s^2)}{\omega_L^2}} \text{PSF}_{\det}(x_d - x_s, y_d - y_s, 0) \quad (4.8)$$

Par conséquent, la distance z_0 qui sépare le plan fluorescent de l'interface peut être calculée en divisant l'équation 4.7 par l'équation 4.8. On obtient alors en chaque pixel de la caméra une valeur de z_0 , telle que :

$$z_0(x_d, y_d) = -\kappa(\theta) \ln \frac{f_d(x_d, y_d, \theta > \theta_c)}{\gamma(\theta) f_d(x_d, y_d, \theta = 0)} = -\kappa(\theta) \ln \frac{f_{TIRF}}{\gamma(\theta) f_{EPI}} \quad (4.9)$$

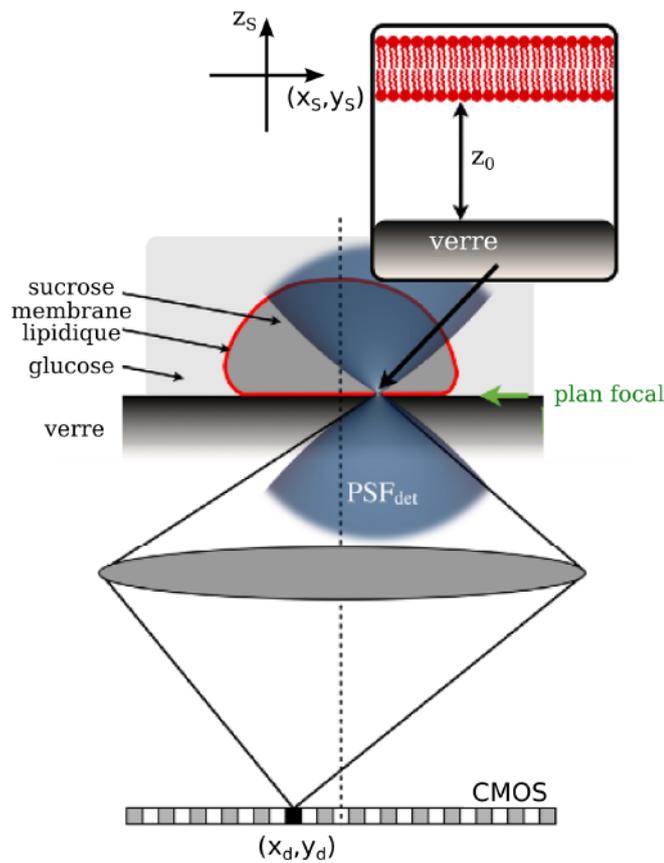


FIGURE 4.13 – Représentation d'une vésicule en adhésion sur une surface. La PSF_{det} pour un pixel arbitraire de la caméra est représentée en bleu.

L'image obtenue en épi-fluorescence est utilisée pour normaliser l'image TIRF, nous permettant ainsi de nous affranchir de tous les paramètres inconnus liés à la concentration locale de fluorophore C_0 , ainsi que ceux liés à l'orientation de la molécule et qui dépendent de z ($\eta_d, \sigma_{abs}, \phi$).

Dans le cas d'une vésicule en adhésion, comme sur la figure 4.13, on considère que la membrane est uniformément marquée à l'échelle de $\frac{\lambda}{ON}$, que son épaisseur est très petite ($\ll \lambda$) et qu'elle est localement plane au voisinage du substrat. L'expression du signal de fluorescence en TIRF est toujours donné par l'équation 4.7 car seule la membrane à proximité de l'interface est excitée par l'onde évanescente. A l'opposé, l'équation 4.8 qui donne le signal enregistré en épi-fluorescence doit être corrigé de façon à tenir compte du signal de fond généré par la membrane supérieure de la GUV. Comme illustré sur la figure 4.13, la PSF_{det} s'étire le long de l'axe z , et les molécules éloignées du plan d'observation vont contribuer, dans une certaine mesure, au signal enregistré en épi-fluorescence. Toutefois ce signal "hors focus" est beaucoup plus faible que celui généré par les molécules présentes dans le plan de mise au point. En effet, la fonction PSF_{det} est maximale dans le plan de mise au point. En conséquence, il est nécessaire d'appliquer un terme correctif multiplicatif,

noté β , à l'équation 4.8. Ce facteur correctif β est tout simplement le rapport (en épi-fluorescence) entre : le signal généré par les molécules dans le plan focal (qui correspond à la toute petite zone que recouvre la PSF_{det} dans le plan focal) et le signal total, c'est-à-dire celui généré dans le plan focal plus celui produit par les molécules "hors focus" (qui correspond à la zone interceptée par la PSF_{det} au niveau de la membrane supérieure sur la figure 4.13). A l'aide de cette représentation graphique de la PSF_{det} , on comprend aisément que β va dépendre du diamètre D de la vésicule. En conclusion, pour une vésicule en adhésion, la distance z_0 entre la membrane lipidique et la surface est donnée par :

$$z_0(x_d, y_d) = -\kappa(\theta) \ln \frac{f_d(x_d, y_d, \theta > \theta_c)}{\gamma(\theta)\beta(D)f_d(x_d, y_d, \theta = 0)} \quad (4.10)$$

En pratique, nous allons normaliser l'image TIRF par une image en épi-fluorescence, enregistrée avec la même mise au point. Le calcul de la distance z_0 est alors effectué à l'aide d'une procédure développée avec le logiciel Igor Pro. Ce calcul numérique tient compte des facteurs de correction $\gamma(\theta)$ et $\beta(D)$. L'évaluation de ces deux facteurs de correction est détaillée dans les paragraphes suivants.

4.4.2 Détermination de κ , γ et β

A Détermination de l'indice de réfraction effectif du milieu et de κ

La profondeur d'atténuation κ de l'onde évanescente est donnée par [146] :

$$\kappa(\theta) = \frac{\lambda}{4\pi} \frac{1}{\sqrt{n_{\text{verre}}^2 \sin^2 \theta - n_{\text{eff}}^2}} \quad (4.11)$$

où n_{eff} l'indice effectif du milieu perçu par l'onde évanescente. On considère alors les vésicules en adhésion comme un système de trois couches. L'onde évanescente pénètre d'abord une première couche de glucose très fine (il s'agit du milieu dans lequel les vésicules sont suspendues). La deuxième couche est la bicouche lipidique, i.e. la membrane de la vésicule. Enfin, la troisième couche est l'intérieur de la vésicule, c'est-à-dire une solution de sucrose (figure 4.13). Les travaux de G. A. Truskey, M. Reichert et J. S. Burmeister montrent que cet empilement de trois couches peut être remplacé par une seule couche effective, d'indice n_{eff} , pour calculer le profondeur d'atténuation [165, 102, 146] L'indice de la membrane lipidique n'influence quasiment par n_{eff} . En revanche l'épaisseur de la première couche a un impact sur n_{eff} , comme il a été mis en évidence par Gingell et collaborateurs [166]. Si l'épaisseur de la première couche est quasiment nulle, alors n_{eff} sera voisin de l'indice du sucrose. Plus l'épaisseur de la première couche augmente, plus n_{eff} tendra à se rapprocher de l'indice du glucose. Pour déterminer n_{eff} , nous avons procédé de la même manière que lors de l'étape de la calibration de l'angle d'incidence θ . La position angulaire de l'angle critique α_c , pour l'interface verre/vésicule, a été mesurée sur le BFP de l'objectif. La figure 4.14 présente une image du

BFP obtenue en observant la fluorescence produite par une vésicule en adhésion. Même si l'anneau excentrique de fluorescence est beaucoup moins contrasté que dans le cas d'un film de QDots (figure 3.13), il est tout à fait possible de déterminer α_c .

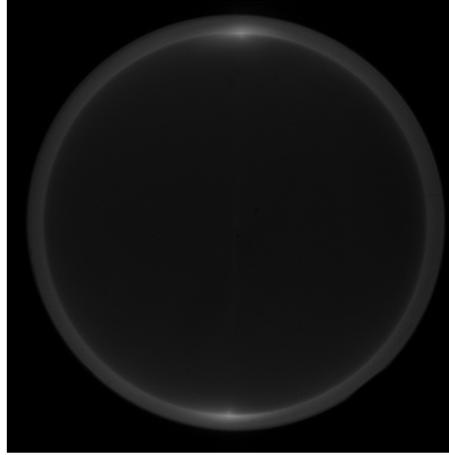


FIGURE 4.14 – Image du BFP enregistrée pour une vésicule en adhésion. Cette image a été obtenue avec excitation laser $\sim 25 \text{ W/cm}^2$ en polarisation "s" et un temps d'acquisition de 200 ms. L'angle critique vaut $\alpha_c = 0.465^\circ \pm 0.002^\circ$, ce qui correspond à $\theta_c = 62^\circ \pm 0.4^\circ$.

L'angle critique θ_c a été ensuite déterminé à partir de la courbe de calibration (figure 3.14), $\theta_c = 62^\circ$. L'indice effectif peut être calculé à l'aide de l'équation :

$$n_{\text{eff}} = n_g \sin \theta_c \quad (4.12)$$

n_{eff} pour une vésicule en adhésion vaut alors 1.350 ± 0.005 . Il est très proche de celui du sucrose (1.343 ± 0.001). Dans le cas où la vésicule subit une répulsion induite par le substrat, elle se trouve loin de l'interface. L'indice effectif est alors celui du glucose : 1.339 ± 0.001 . A partir de l'équation 4.11, il est possible de calculer la profondeur d'atténuation de l'onde évanescente. Ainsi, pour $\theta = 67^\circ$, $\kappa = 97 \pm 4 \text{ nm}$ pour des vésicules en adhésion et $\kappa = 88.9 \pm 0.6 \text{ nm}$ pour les vésicules en répulsion.

B Facteur de correction de la puissance laser γ

L'excitation laser sur l'interface dépend de l'angle d'incidence θ et de l'état de la polarisation du faisceau laser (paragraphe 2.4.2). Au cours de cette étude, j'ai travaillé uniquement en polarisation "s". La variation théorique de "l'intensité" de l'onde évanescente sur l'interface est alors donnée par les équations 2.25 et 2.26. Il est également possible de mesurer expérimentalement l'évolution de $\gamma(\theta)$ en mesurant le signal de luminescence produit par une monocouche de QDots. Les images du BFP ont été enregistrées à différents angles d'incidence pour l'interface verre/eau. On considère

alors que puisque l'irradiation laser est très faible (25 W/cm^2), le signal de luminescence enregistré est directement proportionnel à "l'intensité" d'excitation (on est en dehors de tout phénomène de saturation). Le signal de luminescence pour les différents angles a été mesuré puis normalisé par rapport au signal à $\theta=0$. La figure 4.15 montre que les données expérimentales suivent bien l'évolution de la courbe théorique. "L'intensité" est bien maximale à l'angle critique θ_c .

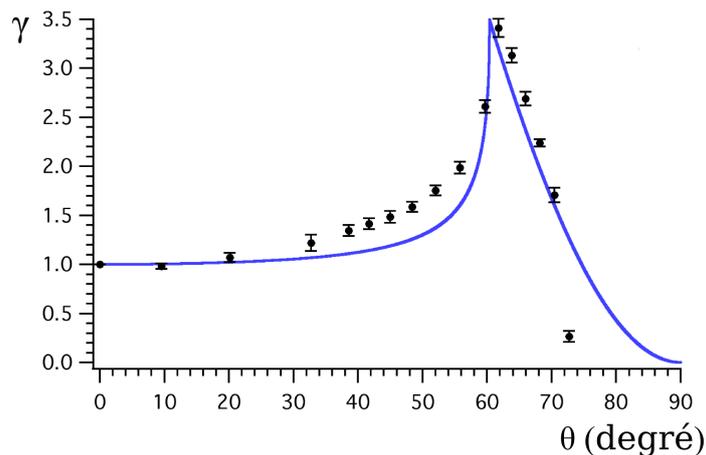


FIGURE 4.15 – Evolution expérimentale de γ avec θ pour l'interface verre/eau. La courbe bleue représente l'évolution théorique de γ . La puissance d'excitation laser est de 25 W/cm^2 .

Ces mesures sont aisées à effectuer lorsqu'il s'agit d'une simple interface, comme l'interface verre/eau et à l'aide d'une monocouche de QDots. Cependant, comme je l'ai mentionné précédemment, l'observation des images du BFP dans le cas de vésicules est nettement plus difficile. La raison principale est que le signal provenant d'une seule vésicule est faible et beaucoup moins photostable que celui des QDots. Afin d'estimer au mieux la valeur de γ , pour un angle θ donné et pour l'indice effectif des vésicules, nous avons extrapolé les valeurs expérimentales de γ obtenues avec une courbe de QDots, pour différents milieux d'observation (figure 4.16). Les monocouches ont été immergées dans trois milieux différents : l'eau, le glucose et le sucrose, afin de se rapprocher le plus possible des conditions réelles obtenues pour des vésicules en adhésion. Les indices de réfractifs de ces milieux ont été mesurés à l'aide d'un réfractomètre à $\sim 24^\circ\text{C}$. Les indices de références sont également donnés dans le tableau 3.2 [167]. L'évolution du γ en fonction de l'indice suit un comportement linéaire (figure 4.16). Les points expérimentaux ont pu être ajustés par une fonction affine. De cette manière, il est possible d'extrapoler à partir de la droite de régression la valeur de γ pour le $n_{\text{eff}}=1.35$. J'ai ainsi obtenu un facteur de correction γ pour $\theta=67^\circ$, de 2.63.

TABLEAU 4.2 – Evolution de facteur de correction γ pour $\theta=67^\circ$ en fonction de l'indice de réfraction du milieu d'observation. Les solutions de glucose et de sucrose ont été préparées dans l'eau ultra-pure à pH=6.

milieu	$n_{\text{théo}}$ (à 20°C)	n_{exp} (à 24°C)	γ	écart-type γ
eau	1.333	1.333	2.49	0.32
glucose	1.339	1.339	2.52	0.20
sucrose	1.343	1.342	2.58	0.13

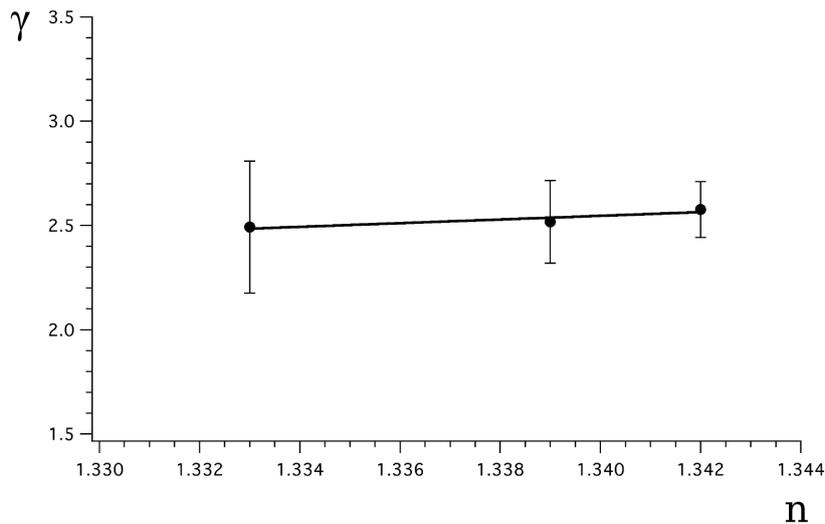


FIGURE 4.16 – Facteur de correction γ , pour $\theta=67^\circ$, en fonction de l'indice de réfraction du milieu. Les données expérimentales (points noirs) ont été ajustées par un fonction affine.

C Facteur de correction β

L'imagerie TIRF est particulièrement bien adaptée à l'observation de la membrane inférieure de la GUV car l'onde évanescente décroît exponentiellement sur quelques centaines de nm de l'interface. Cependant, en épi-fluorescence la profondeur de champ en détection est bien plus grande, typiquement quelques dizaines de μm , même avec un objectif de 1.45 d'ON. Ceci a pour conséquence qu'une partie du signal émis par les sondes fluorescentes localisées loin de la surface, sera détectée. Ainsi, la membrane supérieure des vésicules est une source du bruit de fond en épi-fluorescence qu'il faut estimer afin de calculer la distance membrane-surface. Comme le montre la figure 4.13, la fonction PSF_{det} est étendue selon l'axe z . Par conséquent, les fluorophores situés loin du plan focal peuvent contribuer au signal en épi-fluorescence. Néanmoins, comme je l'ai expliqué précédemment, ce signal "hors focus" est faible, comparé au signal dans le plan focal. En effet, plus on s'éloigne du plan focal, plus la PSF_{det} diminue. Afin d'éliminer ce signal "hors focus", le signal en épi-fluorescence doit être multiplié par un facteur de correction β . β est le ratio entre le signal

généralisé par des molécules fluorescentes dans le plan focal divisé par le signal total, c'est-à-dire le signal dans le plan focal plus celui "hors focus" :

$$\beta = \frac{f_d(x_d, y_d, \theta = 0) \text{ en focus}}{f_d(x_d, y_d, \theta = 0) \text{ en focus} + \text{hors focus}} \quad (4.13)$$

β peut être calculé car on peut prédire la forme de la vésicule. Cette dernière est déterminée par son état d'adhésion et va donc varier selon la surface utilisée. Par exemple, en adhésion faible, la forme de la vésicule peut être approximée par une sphère ou une oblate. A l'opposé, si la vésicule est attirée et s'étale sur la surface, sa forme ressemble plus à une demi-sphère ou une demi-oblate (figure 4.17) [168]. Le facteur β a été calculé théoriquement pour ces quatre formes typiques de GUV à partir de l'équation 4.3. L'expression de la PSF_{det} utilisée pour ce calcul est de la forme Gaussienne-Lorentzienne [163] :

$$\text{PSF}_{\text{det}}(x, y, z) = \frac{\omega_0^2}{\omega(z)^2} e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\omega(z)^2}} \quad (4.14)$$

avec ω

$$\omega(z) = \omega_0 \sqrt{1 + \frac{z^2 \lambda^2}{\pi^2 \omega_0^2}} \quad (4.15)$$

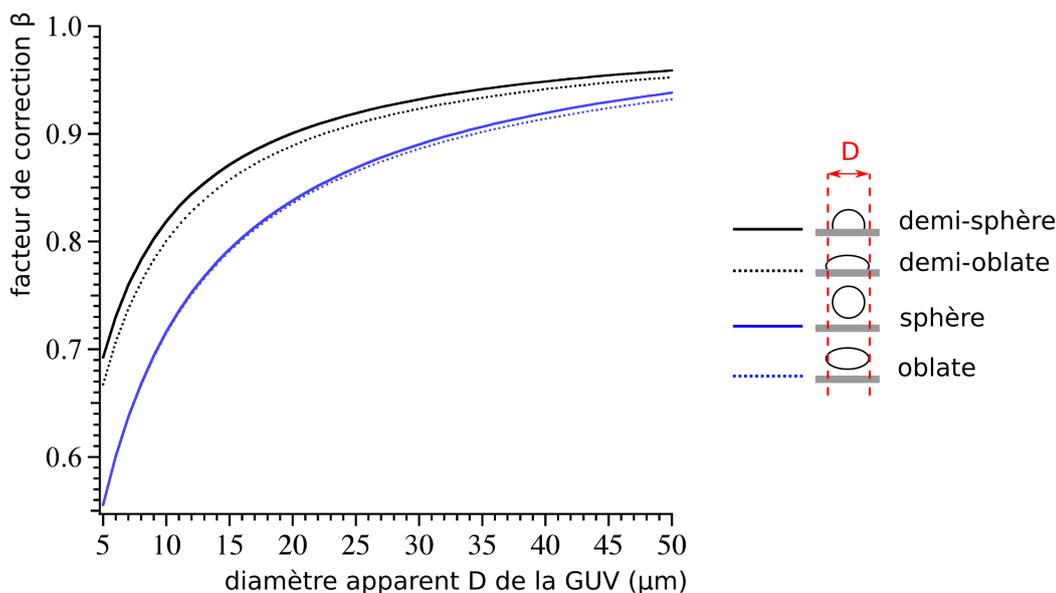


FIGURE 4.17 – Calcul du facteur de correction β en fonction du diamètre apparent D de la vésicule, pour quatre formes différentes de vésicules.

Nous avons fixé ω_0 à 200 nm et λ à 525 nm. Cette valeur du waist ω_0 , correspond à la valeur typique qu'il est possible d'obtenir avec cet objectif [169]. Dans le cas d'une forme oblate, le rapport grand axe sur petit axe a été fixé à 2. La figure 4.17 montre l'évolution de β en fonction du diamètre apparent D (celui observé en épi-fluorescence) de la vésicule. Ce calcul montre bien que le signal "hors focus" est faible. Les vésicules que j'ai étudiées avaient un diamètre D d'au moins 10 μm , par conséquent β est supérieur à 0.7 quelle que soit la forme de la vésicule.

4.5 Analyse des images en TIRF et en épi-fluorescence

En déplaçant la mise au point le long de l'axe z , il est possible d'observer les contours des vésicules en épi-fluorescence. On peut alors déterminer le diamètre apparent D des GUVs et identifier la forme de la vésicule : une sphère (ou une oblate), ou alors une demi-sphère (ou demi-oblate). Cette première analyse est capitale pour déterminer le terme correctif β .

A partir des images TIRF, j'ai déterminé le diamètre de la surface d'étalement des vésicules. On note ce diamètre L (figure 4.18). L'état d'étalement E peut être quantifié à partir du ratio entre L et D , $E = \frac{L}{D}$. Un exemple du calcul de E est présenté sur la figure 4.18 ($E=0.66$). Les valeurs d'étalement E des vésicules sur les différents substrats sont résumées dans le tableau 4.3. Les valeurs de E permettent de réaliser une première classification des interactions vésicules-surface.

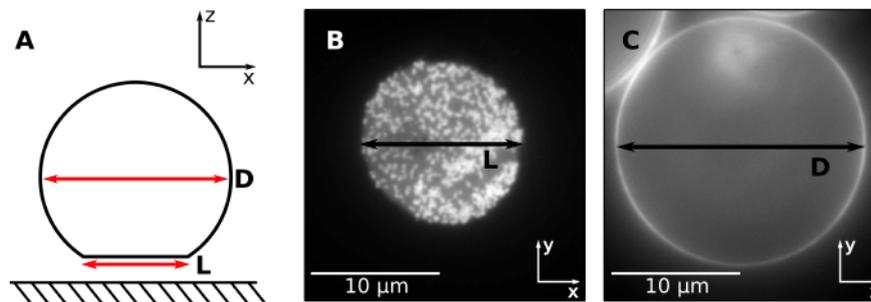


FIGURE 4.18 – (A) Schéma d'une vésicule adhérente sur une surface. L représente le diamètre de la zone de contact et D le diamètre apparent de la vésicule. (B) L est délimité sur l'image TIRF (l'angle d'incidence de $\theta=67^\circ$ en polarisation "s"). (C) D est déterminé à partir d'une image défo-calisée en épi-fluorescence ($\theta=0^\circ$). Sur cet exemple, une vésicule biotinyllée repose sur une surface fonctionnalisée avec de la streptavidine, $L=12.7 \mu\text{m}$ et $D=19.1 \mu\text{m}$. Les images ont été capturées avec un temps d'acquisition de 300 ms et une irradiance de 25 W/cm^2 .

Les valeurs de E révèlent que les vésicules mises en contact avec des surfaces chargées négativement (SiOH et β -caséine) ne s'étalent quasiment pas ($\langle E \rangle \sim 0.15$, tableau 4.4). Au contraire, sur une surface de streptavidine, les vésicules biotinyllées s'étalent de façon nettement plus importante car $\langle E \rangle \sim 0.7$. Sur les autres surfaces, les vésicules s'étalent quasi totalement car $\langle E \rangle \sim 0.9$. Il est

intéressant de noter que sur les surfaces recouvertes de poly-L-lysine ou d'aminosilanes, les forces d'attraction sont telles que $\langle E \rangle \approx 1$ et que très rapidement on observe la lyse des vésicules. L'impact de ce phénomène est important, car ce n'est plus une vésicule qui repose sur la surface, mais une bicouche lipidique. La lyse des GUVs est d'ailleurs la signature des interactions électrostatiques entre la membrane lipidique, chargée négativement, et la surface d'amine ou de poly-L-lysine, chargées positivement.

TABLEAU 4.3 – Tableau récapitulatif des valeurs moyennes du diamètre apparent $\langle D \rangle$, du diamètre de la zone de contact $\langle L \rangle$ et d'étalement $\langle E \rangle$ des vésicules sur différents substrats. Les écart-types entre les mesures sont notés σ_D , σ_L et σ_E . N représente le nombre de vésicules sur lesquelles le ratio a été calculé.

substrat	$\langle D \rangle (\mu\text{m})$	σ_D	$\langle L \rangle (\mu\text{m})$	σ_L	$\langle E \rangle$	σ_E	N
SiOH	24.9	6.4	3.2	1.4	0.12	0.03	21
β -caséine	22.2	1.8	3.6	0.5	0.16	0.02	7
biotine-streptavidine	22.9	7.3	15.6	5.7	0.69	0.15	26
NH ₂ -PEG 5000	27.5	7	22.9	7.2	0.82	0.09	10
PDDA	23.4	6.1	20.7	5.9	0.88	0.07	19
NH ₂ -PEG 2000	21	4.9	18.5	3.8	0.89	0.08	20
NH ₂ /poly-L-lysine	-	-	-	-	≈ 1	-	-

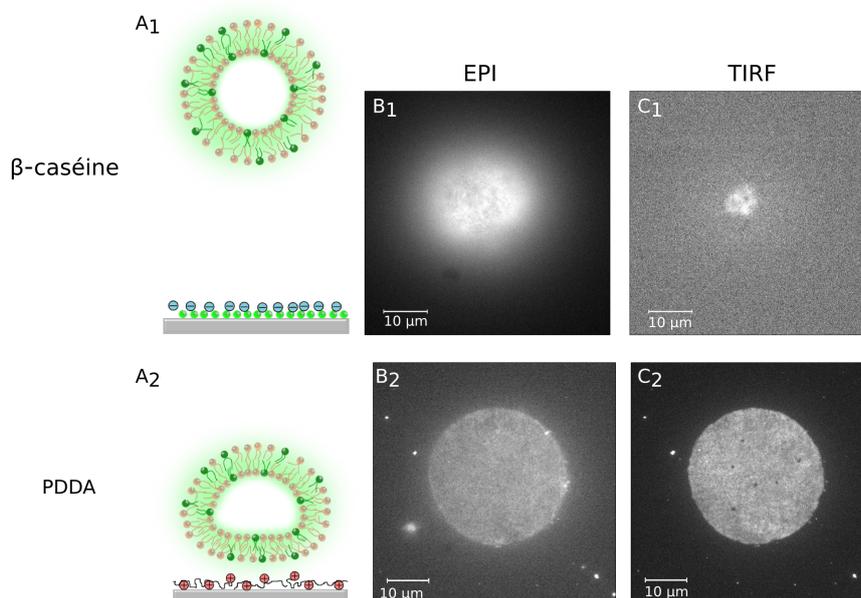


FIGURE 4.19 – Schémas représentatifs d'une vésicule en répulsion sur le substrat recouvert de β -caséine (A_1) et en attraction sur une surface de PDDA (A_2). (B_1 et B_2) : images en épi-fluorescence ($\theta=0^\circ$), (C_1 et C_2) : en TIRF ($\theta=67^\circ$ en polarisation "s"). Les images ont été enregistrées avec une irradiance de 25 W/cm^2 et un temps d'acquisition de 100 ms.

L'adhésion d'une vésicule a des répercussions importantes sur l'image TIRF. Sur les surfaces chargées négativement, les images TIRF mettent en évidence un faible signal de fluorescence, réparti sur une petite zone d'étalement (figure 4.19 C_1). Le fait que ce signal soit faible, signifie que la membrane se situe loin de l'interface. Avec la même mise au point (i.e. sur l'interface), les images en épi-fluorescence font ainsi apparaître un halo lumineux diffus (figure 4.19 B_1). A l'inverse, sur une surface chargée positivement, l'étalement est plus important. La membrane semble être plus proche de l'interface, car le signal TIRF est conséquent (figure 4.19 C_2). De plus, on voit très distinctement apparaître un disque brillant très contrasté et homogène, presque aussi large que celui observé sur l'image en épi-fluorescence (figure 4.19 B_2) en accord avec la valeur de E présentée dans le tableau 4.3 ($\langle E \rangle \sim 0.9$ sur PDDA).

4.6 Détermination des distances membrane-surface

Il est important de souligner un point essentiel : pour que la normalisation du signal TIRF par le signal en épi-fluorescence soit possible, les deux images doivent être capturées rapidement l'une à la suite de l'autre, et strictement dans les mêmes conditions. C'est-à-dire avec la même puissance d'excitation laser, la même mise au point (au niveau de l'interface) et le même temps d'acquisition.

4.6.1 Adhésion non spécifique

Dans le but de quantifier le plus finement possible l'adhésion des vésicules sur les différents substrats préparés, nous avons mesuré les distances z_0 qui séparent la membrane lipidique des surfaces. z_0 a été calculé à l'aide de l'équation 4.10 en chaque pixel des images. Après traitement numérique, on obtient de nouvelles images des distances membrane-support, comme illustré sur la figure 4.20.

Grâce à ces images, il est possible de cartographier les distances z_0 sur la totalité de la zone de contact. La figure 4.20 donne des exemples de cartographie sur différentes surfaces. De plus, afin de mieux comparer les images des distances, nous avons tracé les histogrammes des distances en considérant uniquement la zone centrale d'adhésion (sélectionnée par un ROI, "*region of interest*", délimité sur la figure 4.20 C_i par les carrés noirs), afin de s'affranchir des aberrations sur le calcul de z_0 produites par la courbure de la membrane au bord de la zone d'adhésion. Les histogrammes ont été tracés sous la forme d'une densité de probabilité $p(z_0)$, figure 4.20 D_1 - D_3 . Ces densités de probabilités ont été ajustées avec une distribution Gaussienne afin d'en extraire la valeur moyenne $\langle p(z_0) \rangle$ et son écart-type $\sigma_{p(z_0)}$. Ce dernier paramètre rend compte des fluctuations de la membrane au dessus de la surface (phénomène d'ondulation induit par la force répulsive "d'Helfrich"), mais également de l'hétérogénéité de la surface. En effet, les surfaces étudiées étant fonctionnalisées avec des protéines ou des polymères, elles peuvent présenter certaines imperfections topographiques dues à l'organisation spatiale des molécules. $\sigma_{p(z_0)}$ est aussi appelé "rugosité dynamique" dans la

littérature. Pour chaque type de substrat, j'ai enregistré le comportement de plusieurs vésicules. Les valeurs moyennes et les écart-types des distributions $p_i(z_0)$ obtenus pour chaque GUV ont été moyennés. $\langle z_0 \rangle$ représente la valeur moyenne des valeurs moyennes $\langle p_i(z_0) \rangle$ et $\sigma_{\langle p(z_0) \rangle}$ l'écart-type de ces valeurs. $\langle \sigma_{p_i(z_0)} \rangle$ et $\sigma_{\sigma_{p_i(z_0)}}$ sont respectivement la moyenne et l'écart-type des rugosités dynamiques $\sigma_{p_i(z_0)}$ enregistrées pour chaque vésicule.

Comme je l'ai déjà souligné, il est possible de contrôler les interactions entre les vésicules et son substrat. Etant donné que la charge effective des vésicules est négative, nous avons observé leur comportement sur différentes surfaces chargées. Dans le but d'induire une répulsion électrostatique, les vésicules ont été déposées sur des surfaces électronégatives telles que la β -caséine ou SiOH. Un exemple typique de comportement est présenté sur la figure 4.20 A_1, B_1, C_1 . Les vésicules s'équilibrent à une distance moyenne de $\langle z_0 \rangle = 279$ nm dans le cas de la β -caséine et $\langle z_0 \rangle = 199$ nm dans le cas de SiOH. Lorsque les surfaces sont chargées positivement, les vésicules sont plutôt attirées vers la surface (attraction électrostatique). C'est le cas pour des vésicules mises en contact avec des substrats recouverts de PDDA, de NH_2 -PEG 2000 ou 5000, de poly-L-lysine ou d'amines. Un exemple typique d'image des distances membrane-support sur une surface chargée positivement est donné sur la figure 4.20 C_2 . La distance moyenne $\langle z_0 \rangle$ diminue alors considérablement par rapport à la surface chargée négativement. Pour ces substrats, le $\langle z_0 \rangle$ varie entre 62 et 2 nm. Les résultats obtenus pour toutes les surfaces sont détaillés dans le tableau 4.4.

TABLEAU 4.4 – Tableau récapitulatif des mesures d'adhésion (AS signifie adhésion spécifique et ANS adhésion non spécifique). N représente le nombre de vésicules sur lesquelles les mesures ont été effectuées. Pour l'adhésion spécifique, les vésicules sont composées de 95% de lipides DOPC, 0.1% de DOPE-ATTO 488, 4.4% de DSPE-mPEG2000 et 0.5% de DSPE-PEG2000-biotine. Pour le contrôle de cette adhésion, les vésicules se composent de 95.5% de lipides DOPC, 0.1% de DOPE-ATTO 488 et 4.4% de DSPE-mPEG2000. Les vésicules utilisées pour toutes les autres expériences d'adhésion non spécifique se composent de 99.9% de lipides DOPC et de 0.1% de DOPE-ATTO 488.

substrat	AS	ANS	$\langle z_0 \rangle$ (nm)	$\sigma_{\langle p_i(z_0) \rangle}$ (nm)	$\langle \sigma_{p_i(z_0)} \rangle$ (nm)	$\sigma_{\sigma_{p_i(z_0)}}$ (nm)	N	$\langle h \rangle$ (nm)
β -caséine		x	279	46	18	3	14	121
SiOH		x	199	34	20	3	20	98
contrôle biotine		x	146	19	3	1	12	-
NH_2 -PEG 5000		x	62	18	12	5	22	337
PDDA		x	55	22	9	4	36	372
NH_2 -PEG 2000		x	44	20	15	3	27	388
biotine-streptavidine	x		34/46	16/18	10/7	5/4	21	317
poly-L-lysine		x	14	11	16	2	6	-
NH_2		x	2	10	17	3	6	-

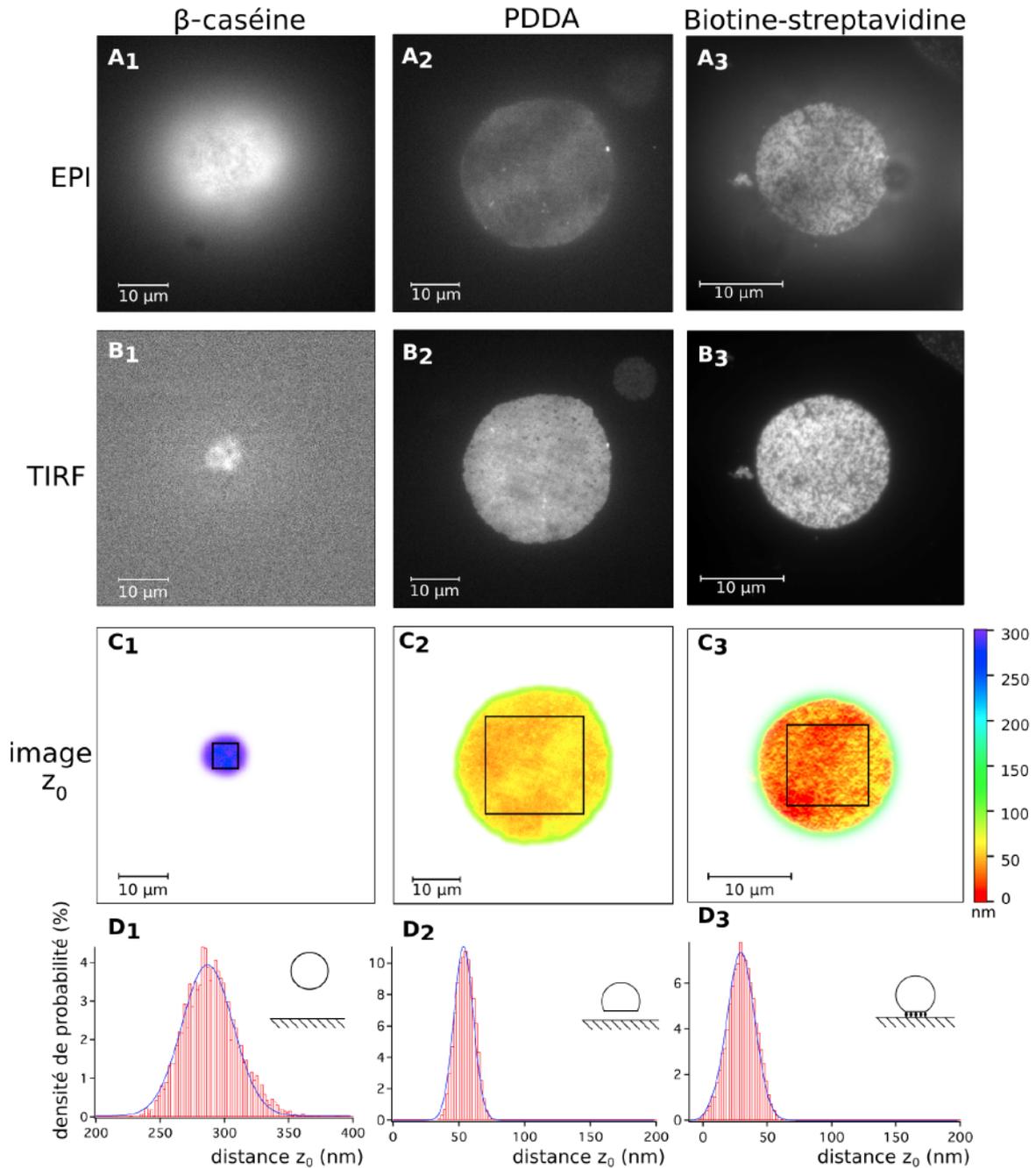


FIGURE 4.20 – (A_i) Images en épi-fluorescence ($\theta=0^\circ$), (B_i) images en TIRF ($\theta=67^\circ$ en polarisation "s"), (C_i) images de distances z_0 , (D_i) histogramme des distances $p(z_0)$ au centre de la zone d'adhésion, délimitée par un ROI (carré noir sur C_i). A_1 à D_1 : cas d'une vésicule sur un substrat recouvert de β -caséine; A_2 à D_2 : vésicule sur une surface de PDDA; A_3 à D_3 : vésicule biotinylée sur une surface recouverte de streptavidine. Les images A_1 , B_1 , A_2 et B_2 ont été enregistrées avec un temps d'acquisition de 100 ms et les images A_3 , B_3 avec un temps d'acquisition de 300 ms. L'irradiance est de 25 W/cm² ($\lambda=488$ nm).

4.6.2 Adhésion spécifique

Nous avons mis en évidence un phénomène d'adhésion spécifique entre la membrane et la surface à l'aide d'un binôme de protéines caractérisé par une force d'interaction très élevée (de l'ordre de $K_d \sim 10^{-14}$ mol/l). Les protéines en question sont la biotine et la streptavidine. Elles sont bien connues pour leur liaison spécifique et donc souvent employées en biophysique. Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé les surfaces fonctionnalisées avec de la streptavidine sur lesquelles des vésicules contenant les phospholipides biotinylés (DSPE-mPEG2000-biotine) ont été déposés. Un exemple d'image des distances membrane-surface pour une GUV en adhésion spécifique est donné sur la figure 4.20 C₃. L'adhésion spécifique se produit lorsque la biotine greffée sur la longue chaîne d'un PEG reconnaît spécifiquement la streptavidine présente sur la surface. Une première liaison biotine-streptavidine provoque l'accumulation des autres biotines sur la même zone, de façon à former des plaques d'adhésion (figure 4.21). Nous avons pu observer différents types de plaques en termes de taille et de répartition. La figure 4.21 A représente le cas d'une vésicule liée à la surface par de nombreuses liaisons biotine-streptavidine. La figure 4.21 B représente un cas où ces liaisons sont moins nombreuses. Un zoom sur une petite zone d'adhésion, délimitée par un ROI sur la figure 4.21 A₁ et B₁, permet de mieux apprécier la taille des plaques (figure 4.21 A₂ et B₂). Cette hétérogénéité est particulièrement visible sur la distribution des distances $p(z_0)$, où on distingue deux sous-populations. $p(z_0)$ a été ajustée à l'aide de deux Gaussiennes et nous avons analysé les distances moyennes $\langle z_0 \rangle$ de ces deux populations ainsi que leurs écart-types moyens $\langle \sigma_{p(z_0)} \rangle$ (tableau 4.5). On peut en déduire que la première population est située ≈ 34 nm et la deuxième vers ≈ 46 nm. La figure 4.21 montre que lorsque la taille des plaques augmente, la distance moyenne membrane-surface de la première population diminue. Sur la figure 4.21 A₂, on peut observer l'existence de petites plaques d'adhésion, très rapprochées. Dans ce cas, la distance z_0 au niveau de ces zones d'adhésion est d'environ 27 nm. Sur la figure 4.21 B₂, les zones d'adhésion sont plus grandes et plus espacées; la distance membrane-surface est alors de ~ 20 nm. Le reste de la membrane, celle qui n'est pas liée à la surface reste à une distance d'environ 40 nm du support.

Afin de confirmer la spécificité de cette adhésion, nous avons déposé sur le même substrat (recouvert de streptavidine) de vésicules dépourvues de phospholipides biotinylés. L'expérience montre bien l'absence d'adhésion spécifique. On observe un faible signal de fluorescence en TIRF, avec des profils similaires à ceux enregistrés sur la β -caséine et SiOH (figure 4.22). La membrane se situe en moyenne à $\langle z_0 \rangle = 146$ nm avec $\langle \sigma_{p(z_0)} \rangle = 3$ nm.

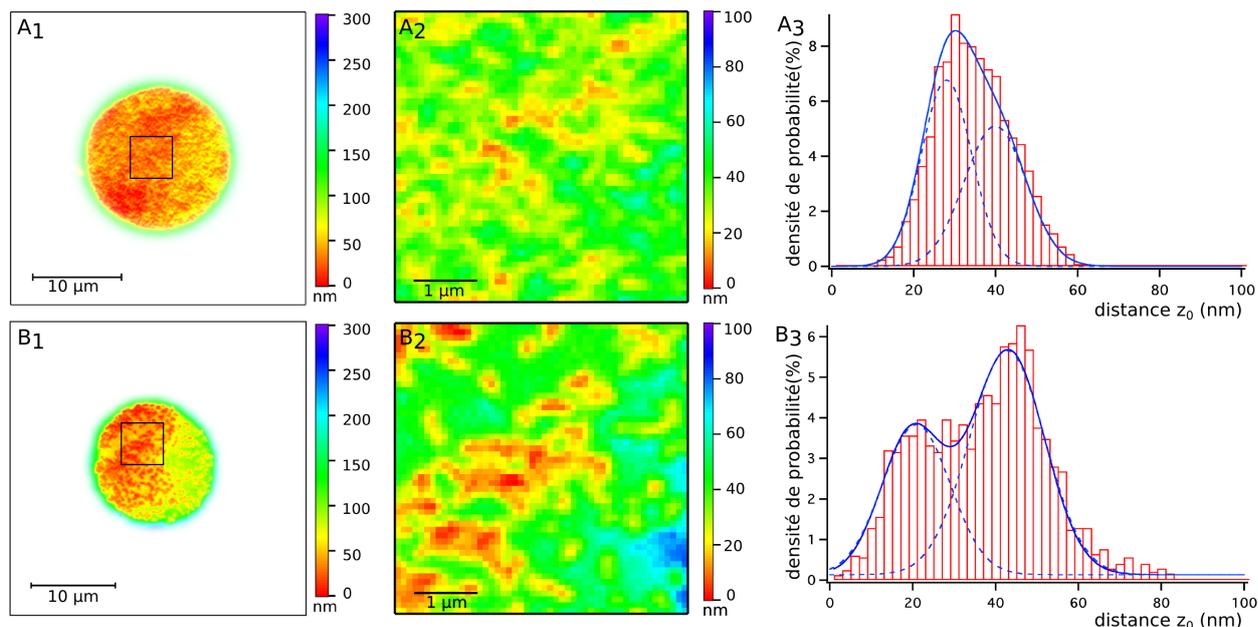


FIGURE 4.21 – (A_1 , B_1) Vésicules biotinylées en adhésion sur un substrat recouvert de streptavidine. Le carré noir représente une zone de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, agrandie sur les images (A_2 et B_2). (A_3 et B_3) Les histogrammes de distances représentés en terme de densités de probabilité $p(z_0)$ établis à partir des images A_2 et B_2 . Les images ont été capturées avec un temps d'acquisition de 300 ms et une irradiance de 25 W/cm^2 .

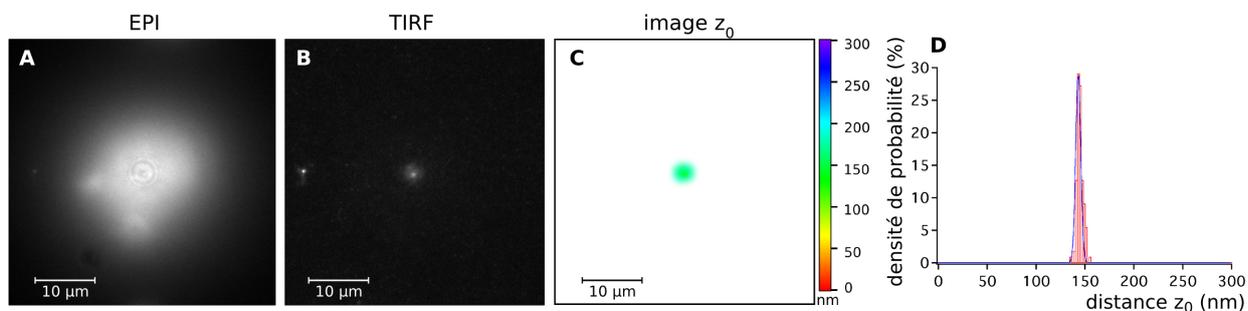


FIGURE 4.22 – (A) Image en épi-fluorescence ($\theta=0^\circ$), (B) image TIRF ($\theta=67^\circ$ en polarisation "s"), (C) image des distances z_0 et (D) son histogramme des distances $p_i(z_0)$, d'une vésicule "contrôle" dépourvue de biotine, déposée sur un substrat recouvert de streptavidine. Les images ont été capturées avec un temps d'acquisition de 300 ms et une irradiance de 25 W/cm^2 .

4.6.3 Discussion

Dans le cas de l'adhésion non spécifique, les forces d'interaction entre la membrane et la surface contrebalancent l'attraction gravitationnelle. Ces interactions entre les GUVs et le substrat peuvent

avoir plusieurs origines. Les forces de van der Waals sont celles qui agissent aux distances les plus courtes, typiquement à l'échelle nanométrique. A plus longue distance, il peut apparaître une attraction ou une répulsion électrostatique. Il existe également une force de répulsion importante, induite par le substrat, à l'origine de l'ondulation de la membrane. Il s'agit de la force de répulsion d'Helfrich [170]. Cette dernière donne naissance à des modulations importantes de la distance membrane-surface, typiquement ≈ 50 nm [170]. Dans le but de montrer l'importance des interactions électrostatiques dans nos expériences, j'ai estimé la distance moyenne entre la membrane lipidique et la surface lorsque l'attraction gravitationnelle est uniquement compensée par la force de répulsion d'Helfrich (j'ai négligé les interactions de van der Waals car elles ne deviennent prépondérantes qu'à des distances de quelques nm). La force de gravitation est donnée par $F_g = \Delta\rho \cdot V \cdot g$, où $\Delta\rho$ est la différence de densité entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule, V le volume de la vésicule et g l'accélération de la pesanteur. La force de répulsion d'Helfrich est quant à elle donnée par [171] :

$$F_{\text{rep}} = \frac{2Ac_{\text{fl}}(K_{\text{B}}T)^2}{K\langle h \rangle^3} \quad (4.16)$$

où A est la surface de la zone de contact, c_{fl} est une constante qui vaut 0.116 [170], K est l'énergie de courbure de la membrane et $\langle h \rangle$ la distance moyenne entre la membrane et le support. En écrivant l'équilibre des forces ($F_{\text{rep}} = F_g$), et à partir des valeurs de L et D , il est possible de calculer $\langle h \rangle$ tel que :

$$\langle h \rangle = \sqrt[3]{\frac{2c_{\text{fl}}A(K_{\text{B}}T)^2}{K\Delta\rho Vg}} \quad (4.17)$$

$\Delta\rho$ vaut 9.3 kg/m^3 dans nos expériences, $K=8.5 \times 10^{-20}$ J pour une membrane en DOPC [172], $T=295^\circ\text{K}$, $A=\pi(\frac{L}{2})^2$ et $V=\frac{4}{3}\pi(\frac{D}{2})^3$ dans le cas d'une sphère ou moitié moins dans le cas d'une demi-sphère. Les valeurs de $\langle h \rangle$ ont été calculées pour toutes les surfaces. Elles sont données dans le tableau 4.4. Les valeurs estimées de la distance membrane-surface ne coïncident absolument pas avec nos valeurs expérimentales. C'est la preuve que nos résultats expérimentaux ne peuvent s'expliquer que si on ajoute une force supplémentaire liée aux interactions électrostatiques. Par exemple sur la surface de β -caséine et SiOH, $\langle h \rangle \sim 100$ nm, alors que $\langle z_0 \rangle \approx 200$ nm pour SiOH et $\langle z_0 \rangle \approx 280$ nm pour la β -caséine. Il existe donc sur ces surfaces une force de répulsion électrostatique importante qui repousse la vésicule au delà de la distance de 100 nm prédite par les fluctuations thermodynamiques de la membrane. De même pour les surfaces chargées positivement (PDDA, NH_2 -PEG, poly-L-Lysine, NH_2), où il existe cette fois une force d'attraction électrostatique qui s'oppose à la force de répulsion d'Helfrich. Pour confirmer le rôle joué par les interactions électrostatiques, nous avons récemment entrepris de mesurer le potentiel ζ des surfaces. Or, il est impossible de mesurer directement ce potentiel sur une surface. Nous avons décidé de faire cette mesure sur des nanoparticules de silice. Au laboratoire, on possède un ζ -mètre (Zetasizer Nano-ZS, Nano series) qui permet de mesurer cette valeur. Les nanoparticules de silice ont été synthétisées suivant la méthode

décrite dans l'article de Bogush et collaborateurs [173]. Les particules que nous avons élaborées ont un diamètre moyen de 140 nm et présentent directement à leur surface les groupements SiOH. Le potentiel ζ de la surface SiOH a été mesuré sur les nanoparticules et vaut ~ -40 mV. Au moment de la rédaction de ce manuscrit, nous n'avons pas eu le temps de reproduire toutes les fonctionnalisations sur les nanoparticules. En effet, les protocoles initialement prévus pour les surfaces doivent être adaptés pour les nanoparticules. Malgré tout, nous avons montré que par ajout de β -caséine, le potentiel ζ est légèrement plus négatif (-45 mV). Lorsqu'on ajoute du PDDA, le potentiel devient positif (30 mV). Pour conclure, ces premières mesures du potentiel ζ renforcent l'hypothèse que les interactions électrostatiques jouent un rôle de premier plan dans nos expériences. En supposant que la valeur moyenne de la distance membrane/surface mesurée en nTIRF soit directement corrélée à l'amplitude de la force d'attraction ou de répulsion électrostatique, il est possible de classer les surfaces comme sur la figure 4.23. Il nous reste à confirmer ce classement à l'aide des valeurs du potentiel ζ .

La rugosité dynamique moyenne $\langle \sigma_{p(z_0)} \rangle$ varie de façon intéressante dans le tableau 4.5. Si on exclut les valeurs enregistrées sur la poly-L-lysine et sur les amines, $\langle \sigma_{p(z_0)} \rangle$ diminue avec $\langle z_0 \rangle$. $\langle \sigma_{p(z_0)} \rangle \sim 19$ nm dans le cas d'une répulsion électrostatique et ~ 12 nm dans le cas d'une attraction électrostatique. Une telle variation de la rugosité dynamique a déjà été observée dans la littérature [174]. La rugosité dynamique semble donc diminuer au fur et à mesure que la force d'adhésion augmente. Dans le cas des surfaces de poly-L-Lysine et NH_2 , $\langle \sigma_{p(z_0)} \rangle \sim 16-17$ nm, car la membrane est instable sur la surface. En effet, comme je l'ai écrit précédemment, on observe très vite la lyse des GUVs sur ces deux surfaces, certainement parce que leur potentiel ζ électropositif est très élevé. La distance moyenne entre la bicouche lipidique et la surface sur poly-L-lysine et NH_2 a été déterminée respectivement à 14 et 2 nm. La distance z_0 est beaucoup plus difficile à déterminer du fait de l'hétérogénéité de la membrane après la lyse. Nous avons d'ailleurs souvent observé l'apparition de nano-vésicules au dessus de la membrane, voire la formation d'invaginations. Cette différence de distance de 10 nm enregistrée entre les amines et la poly-L-lysine peut s'expliquer par l'épaisseur de la double couche électrique de Gouy-Chapman-Stern (paragraphe 1.2.4 B). On peut tout à fait imaginer que dans le cas de la poly-L-lysine le plan de cisaillement est situé beaucoup plus loin de la surface que dans le cas d'une surface recouverte d'amine. Lorsqu'on ajoute des PEG sur les amines, la membrane initialement située à 2 nm est repoussée à 40-60 nm. Cette distance de quelques dizaines de nm ne peut pas s'expliquer par la longueur des PEG, qui n'excède pas ~ 10 nm pour les PEG 5000 et ~ 4 nm pour les PEG 2000 [170]. De plus, les PEG sont des polymères qui ne possèdent aucune charge apparente. Par conséquent ces derniers ne peuvent pas directement contribuer à l'attraction électrostatique des vésicules vers la surface. Plus vraisemblablement, ces observations peuvent s'expliquer par le fait que la couche de PEG écran la charge effective des amines. Leur encombrement stérique ne leur permet pas de former des liaisons avec tous les amino-silanes disponibles. En changeant la masse moléculaire de la chaîne carbonée des PEG, on modifie l'épaisseur de la couche d'écrantage. En conséquence, plus les polymères sont longs, plus la charge

effective de la couche d'amine sera écartée, et plus le potentiel ζ sera faible. Mes observations vont dans le sens : $\langle z_0 \rangle = 62$ nm avec les PEG 5000 et 44 nm avec les PEG 2000. Je souhaite mettre en évidence ce phénomène d'écrantage à partir des mesures du potentiel ζ sur les nanoparticules. La charge effective des surfaces fonctionnalisées au PDDA est également positive. Une partie de la charge du polymère est engagée dans les liaisons avec les groupements SiOH de la surface (nettoyée au piranha) ; l'autre partie est à l'origine de la charge effective de la surface. On peut également imaginer que le polymère n'est pas parfaitement déplié sur la surface mais forme des petites pelotes qui fluctuent, éloignant ainsi à quelques dizaines de nm le plan de cisaillement entre la couche diffuse et la couche de Stern.

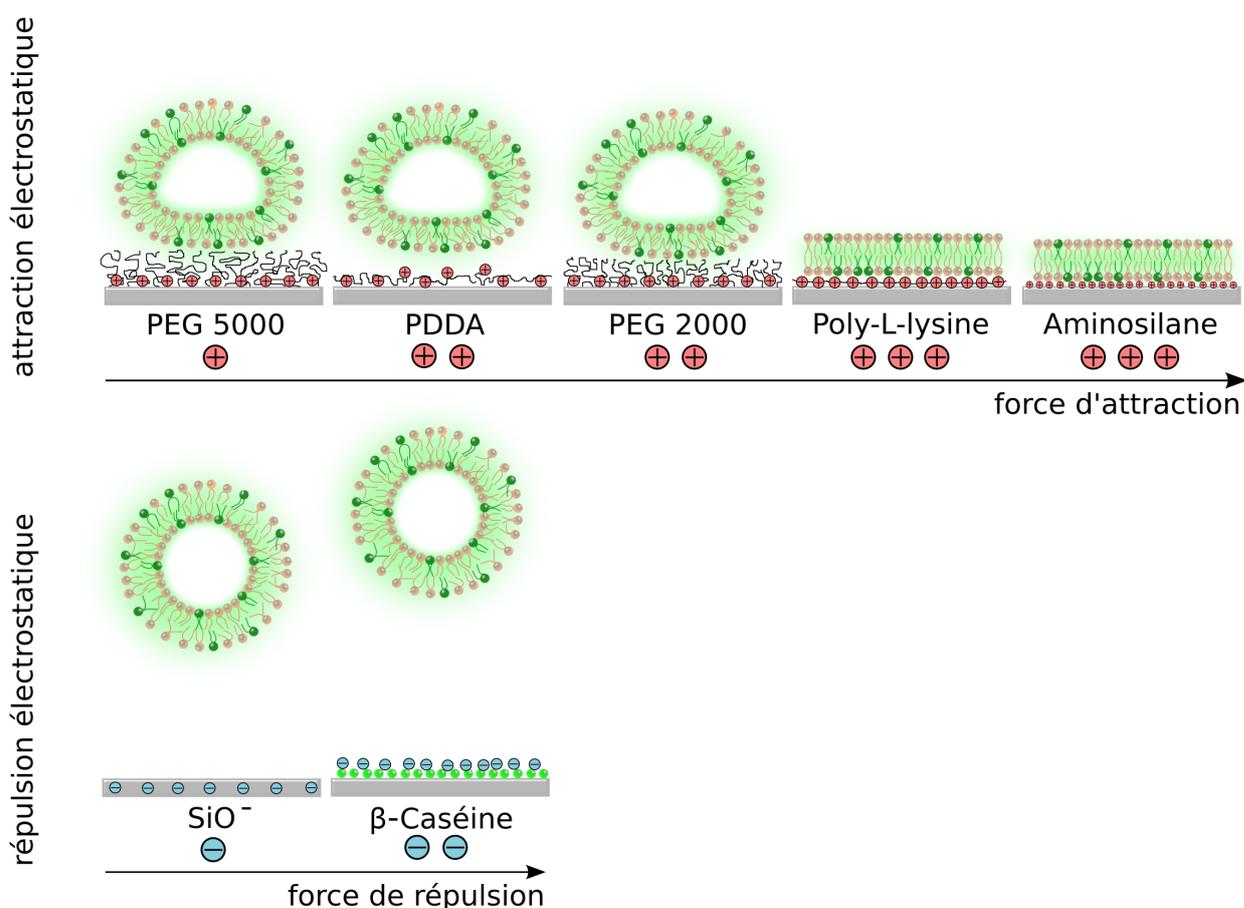


FIGURE 4.23 – Représentation schématique des vésicules en interaction électrostatique sur les différentes surfaces. Dans le cas d'attraction électrostatique, la distance z_0 membrane-surface diminue au fur et à mesure que la force d'attraction augmente. À l'opposé, la distance z_0 augmente avec la force de répulsion.

Dans le cas de l'adhésion spécifique, la distance entre la membrane libre et la surface au niveau des jonctions biotine-streptavidine est en moyenne de 34 nm. La figure 4.21 montre que cette distance varie avec la taille des plaques d'adhésion. Lorsqu'elles se regroupent pour former de larges

zones, $z_0 \sim 20$ nm. Ce phénomène de regroupement de plaques d'adhésion, s'accompagne donc d'un rapprochement de la membrane vers la surface. Ceci peut être corrélé à la densité de streptavidine déposée sur la surface. Le processus serait le suivant : les phospholipides biotinylés présents dans la membrane se regroupent au sein de microdomaines puis se lient aux streptavidines, ce qui provoque l'apparition des plaques d'adhésion. En effet, les lipides biotinylés sont connus pour s'organiser en microdomaines (séparation de phases) à la surface des vésicules [175]. Lorsque la surface est recouverte de streptavidine de façon homogène, de nombreuses petites plaques d'adhésion apparaissent. Cependant, lorsque la streptavidine ne recouvre pas toute la surface de la lamelle, les plaques d'adhésion sont beaucoup plus espacées, et leur taille est plus importante.

Les phospholipides DSPE-mPEG2000 ont pour but d'écranter la surface de la vésicule afin d'éviter le phénomène d'adhésion non spécifique. Ils sont plus nombreux que les DOPE-ATTO488 (chargés négativement) et il est possible d'émettre l'hypothèse qu'ils sont répartis uniformément au sein de la membrane. La présence des DSPE-mPEG2000 à l'intérieur des plaques ne semble pas être gênante car les biotines sont greffées au bout de la chaîne de PEG, de même longueur que celle du DSPE-mPEG2000. Une représentation idéalisée d'une zone d'adhésion est donnée sur la figure 4.24.

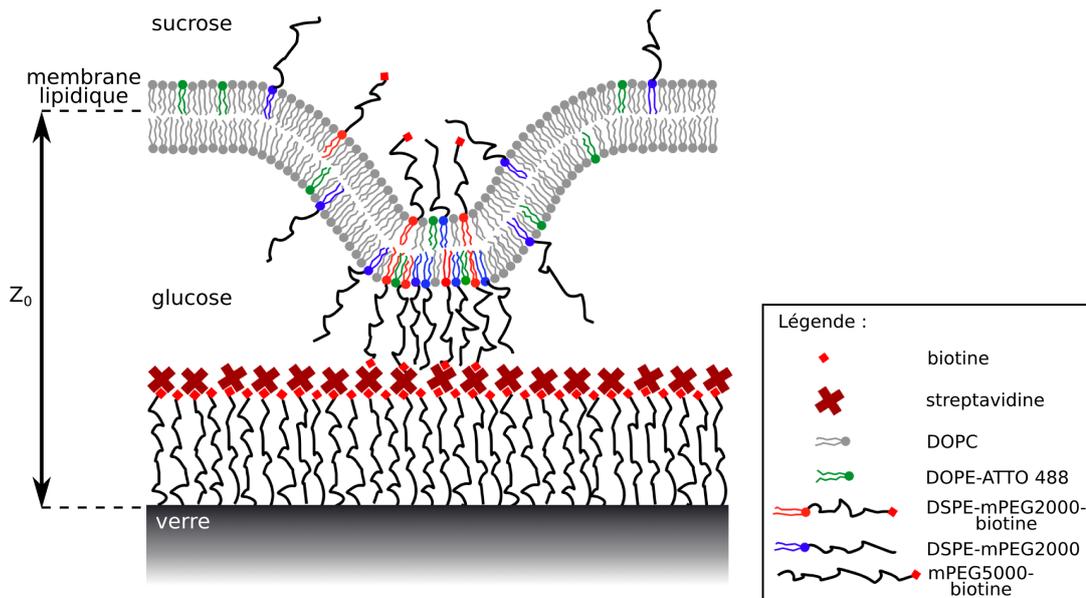


FIGURE 4.24 – Représentation schématique d'une plaque d'adhésion spécifique.

4.7 Simulations Monte Carlo

Pour comprendre quels sont les paramètres expérimentaux qui peuvent influencer le calcul de z_0 , nous avons mis en oeuvre des simulations Monte Carlo afin de reproduire numériquement une expérience nTIRF. Le but de ces simulations est de fournir des informations pertinentes sur l'origine de l'erreur lors du calcul de z_0 .

4.7.1 Simulations du signal de fluorescence

Le temps d'acquisition dans nos expériences était de l'ordre de 100 ms. Si on répète plusieurs fois la mesure sur des vésicules, on se rend compte que le signal varie légèrement en chaque pixel de l'image. L'origine de ces variations du signal est principalement liée à la diffusion de la sonde fluorescente dans la membrane lipidique. Les expériences de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) montrent en effet que le temps moyen que met une molécule pour traverser une zone d'environ 250 nm de diamètre est d'environ 1 ms dans des bicouches lipidiques et 1-5 ms dans des membranes cellulaires [57, 58]. Le grandissement à l'échelle d'un pixel faisant approximativement 100 nm, le processus de diffusion va induire, au niveau de chaque pixel, des fluctuations importantes du signal de fluorescence à l'échelle de la ms. La figure 4.25 A, montre d'ailleurs l'évolution instantanée (toutes les ms) du signal de fluorescence pour un pixel de la caméra, dans le cas d'une vésicule en adhésion. Le signal moyen $\langle F(t) \rangle$ est de 12.8 coups/ms et l'écart-type est de $\sigma_F = 6.6$ coups/ms (ces valeurs ont été obtenues en ajustant l'histogramme du signal de fluorescence avec une distribution Gaussienne, figure 4.25 B). En FCS, on met en évidence qu'il existe un lien entre les fluctuations $\delta F(t)$ du signal et la concentration de fluorophore. Plus le nombre de molécules présentes dans le volume d'analyse est faible, plus les fluctuations $\delta F(t)$ (et par conséquent σ_F) sont importantes. Dans l'exemple de la figure 4.25 A, $\frac{\sigma_F}{\langle F(t) \rangle} \sim \frac{\sigma_{F(t)}}{\langle F(t) \rangle} \simeq 50\%$. Une analyse détaillée d'un grand nombre d'échantillons nous a permis de montrer que le rapport $\frac{\sigma_F}{\langle F(t) \rangle}$ était compris entre 20 et 50% dans nos expériences. Ces variations de quelques dizaines de % sont directement liées au marquage des vésicules, d'une électroformation à l'autre. Ce sont ces fluctuations instantanées $\delta F(t)$ à l'échelle de la ms qui vont après 100 ms (ou 300 ms) de temps d'acquisition, faire fluctuer le signal de fluorescence en chaque pixel. On comprend alors intuitivement que plus les fluctuations $\delta F(t)$ sont importantes (ce qui correspond à un faible marquage), plus l'erreur sur le calcul de z_0 est elle aussi importante. Or, on ne peut pas augmenter indéfiniment la quantité de fluorophore dans les membranes lipidiques. Avec trop de fluorophore DOPE-ATTO488, on verra peut être apparaître des domaines membranaires riches en DOPE et le marquage fluorescent ne sera plus homogène. Il en est de même avec des cellules vivantes. Si la quantité de fluorophore est trop importante, les cellules perdent leur comportement normal, elles ne migrent plus, voir elles désadhèrent. Nous avons donc marqué les vésicules en tenant compte qu'il ne fallait pas une concentration trop importante de fluorophore. Pour voir l'influence des différents paramètres comme $\delta F(t)$ (ou σ_F) et le temps d'intégration sur l'erreur de calcul de z_0 , nous avons simulé le signal de fluorescence enregistré au niveau d'un pixel de la caméra par une méthode Monte Carlo.

La diffusion rapide des sondes fluorescentes provoque des fluctuations du signal de fluorescence au cours du temps, comme sur la figure 4.25 A. Ces fluctuations temporelles suivent une loi Gaussienne, comme le montre la figure 4.25 B. Pour reproduire un tel signal de fluorescence, il suffit de tirer au sort à chaque itération une valeur de fluorescence suivant une loi de probabilité normale (ou Gaussienne). Pour cela, on fixe $\langle F(t) \rangle$ et le rapport $\sum = \frac{\sigma_F}{\langle F(t) \rangle}$. Le logiciel Mathematica permet de faire ce type de tirage au sort. On obtient alors un signal comme celui présenté sur la figure 4.25 C,

où $\frac{\sigma_F}{\langle F \rangle}$ a été fixé à 50% et $\langle F \rangle = 12.8$ coups/ms.

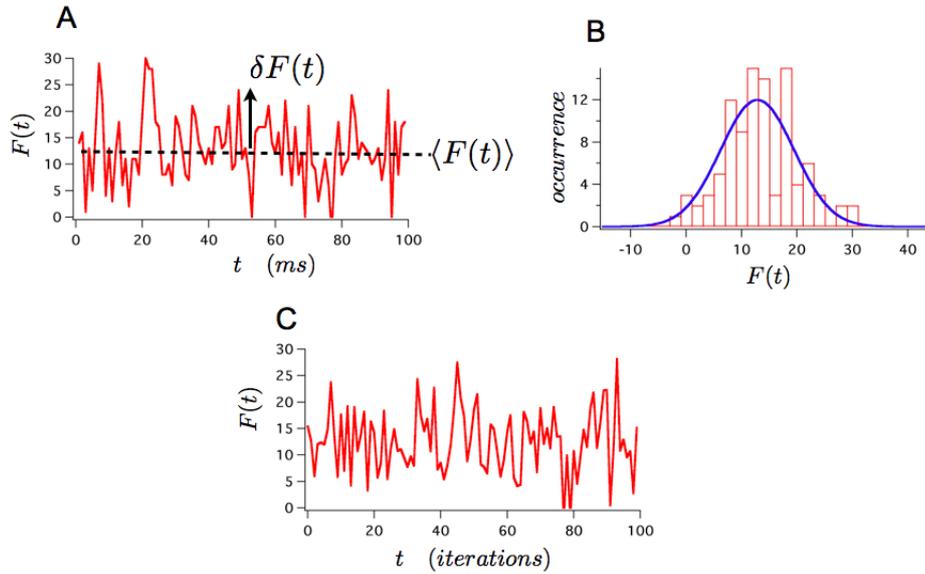


FIGURE 4.25 – (A) Evolution du signal de fluorescence en TIRF au cours du temps enregistré avec la caméra CMOS (les bruits de fond ont été retranchés). (B) Histogramme du signal de fluorescence. Ce dernier est ajusté à l'aide d'une distribution Gaussienne. (C) Exemple de simulation Monte Carlo qui reproduit ce signal expérimental (A).

Pour simuler une expérience, on fixe la valeur de z_0 (noté z_0^{th}), puis on calcule le signal moyen $\langle F(t) \rangle$ en TIRF et en épi-fluorescence. On lance alors deux séries d'itérations pour simuler un signal en épi-fluorescence et en TIRF, sachant que $\gamma=2.3$ et $\beta=1$ et $\kappa=97$ nm. Pour cela, on fixe une valeur de Σ (ou de σ_F). On intègre ensuite le signal pour les deux séries d'itérations, on obtient f_{TIRF} et f_{EPI} , et puis on calcule z_0 à l'aide de l'équation 4.10. Enfin, on chiffre la précision du calcul en déterminant le paramètre Δ , défini comme $\Delta = \frac{|z_0 - z_0^{th}|}{z_0^{th}}$.

4.7.2 Influence du nombre d'itérations et de σ_F (ou $\delta F(t)$)

Nous avons effectué plusieurs séries de simulations, en fixant z_0^{th} à 50 nm et I_0 à 8 coups/ms, et en faisant varier le nombre d'itérations de 3 à 1000, ainsi que Σ de 20 à 50%. Les résultats sont présentés sur la figure 4.26 A. Cette figure montre, d'une part, que pour un niveau donné de fluctuation Σ , l'erreur Δ sur le calcul de z_0 diminue plus le nombre d'itérations augmente. D'autre part, pour un nombre d'itérations fixé, l'erreur Δ augmente avec Σ . Ce résultat corrobore notre intuition de départ, c'est-à-dire que la concentration du marqueur fluorescent influence l'erreur sur le calcul de z_0 . Moins il y a de fluorophores, plus les fluctuations de fluorescence augmentent, et plus il faudra augmenter le temps d'acquisition pour lisser les fluctuations. Une itération correspond au temps que met une molécule pour traverser (diffuser) une zone d'environ 100 nm (le grandissement pour un

pixel). On sait qu'en réalité ce temps vaut typiquement 0.5 à 2 ms : 100 itérations correspondent à 50-200 ms de temps d'acquisition. Or, la majorité des expériences nTIRF ont été réalisées avec un temps d'acquisition de 100 ms. Ce temps d'acquisition est donc tout à fait acceptable, car l'erreur Δ n'excède pas 10%.

4.7.3 Influence du bruit de fond

Il est tout à fait possible d'ajouter un bruit de fond dans nos simulations afin de tenir compte des différentes sources de bruit dans nos expériences. Il y a tout d'abord le bruit "propre" de la caméra CCD ou CMOS qui vaut 100 coups quel que soit le temps d'intégration. Il s'agit en réalité d'un "offset" électronique afin d'éviter l'apparition des signaux négatifs. A ce niveau de fond s'ajoute un bruit lié à l'excitation laser comme la diffusion Raman du verre et du solvant. Sachant que la puissance laser utilisée dans les expériences est très faible, ces signaux Raman sont eux aussi très faibles. Nos simulations ont montré que l'erreur sur le calcul de z_0 n'était pas influencée par les différentes sources de bruit de fond, même lorsqu'ils sont importants.

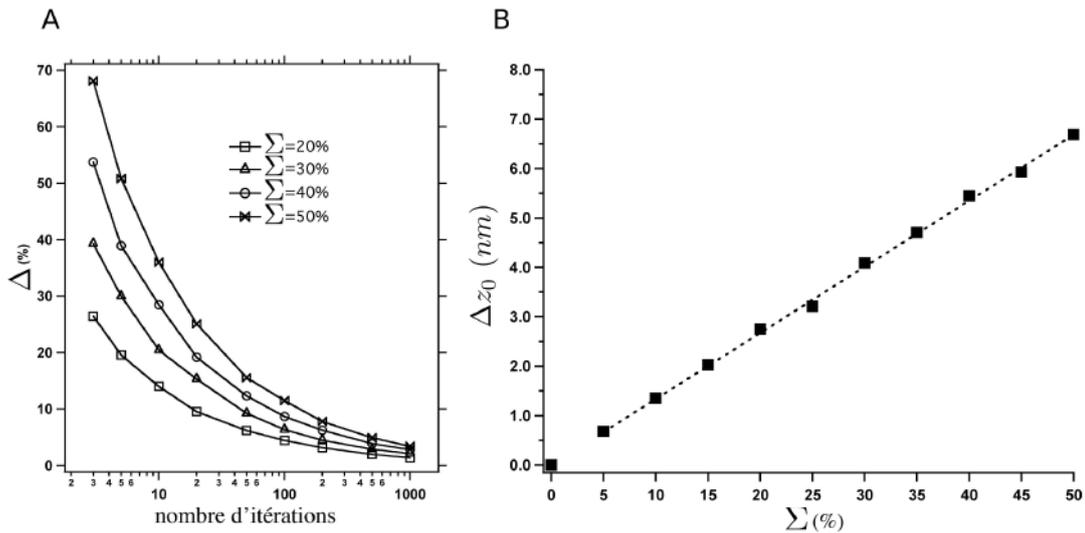


FIGURE 4.26 – (A) Evolution de l'erreur Δ sur le calcul de z_0 en fonction du nombre d'itérations et de Σ . (B) Evolution de Δz_0 avec Σ .

On peut montrer en développant le logarithme dans le calcul de z_0 , qu'il n'est pas nécessaire de soustraire le bruit de fond, si le rapport bruit sur signal est similaire en TIRF et en épi-fluorescence :

$$\ln \frac{f_{TIRF}}{f_{EPI}} = \ln \frac{S_{TIRF} + B_{TIRF}}{S_{EPI} + B_{EPI}} = \ln \frac{S_{TIRF}}{S_{EPI}} + \ln \frac{1 + \frac{B_{TIRF}}{S_{TIRF}}}{1 + \frac{B_{EPI}}{S_{EPI}}} \approx \ln \frac{S_{TIRF}}{S_{EPI}} \quad (4.18)$$

où S_{TIRF} correspond au signal émis par les molécules d'ATTO 488 et B_{TIRF} au bruit de fond en TIRF (de même pour le signal en épi-fluorescence). Comme la valeur de B/S est faible et quasiment

identique en TIRF et en épi-fluorescence, le deuxième terme du développement du logarithme tend vers zéro. Nous avons vérifié expérimentalement cette approximation.

4.7.4 Erreur absolue Δz_0

Il est possible de chiffrer l'erreur absolue sur z_0 , notée Δz_0 , à l'aide de nos simulations Monte Carlo. Il suffit pour cela de lancer un grand nombre de simulations (typiquement 10^4 , ce qui correspond à une image de 100x100 pixels) et de calculer l'écart-type sur l'ensemble des mesures de z_0 . Cet écart-type donne l'erreur absolue Δz_0 sur la mesure de z_0 .

Dans une première série de simulations, nous avons montré que Δz_0 ne varie pas avec la position de z_0^{th} de la membrane lipidique. Ce résultat est important, car il montre que l'erreur sur le calcul de z_0 est constante quelle que soit la position axiale de la membrane lipidique.

Dans une seconde série de simulations, nous avons regardé comment varie Δz_0 en fonction de Σ . Pour cela nous avons fixé z_0^{th} à 100 nm, I_0 à 8 coups/ms et le nombre d'itérations à 100. La figure 4.26 B montre l'évolution de Δz_0 avec Σ . Il apparaît d'une part que l'erreur varie linéairement avec Σ ; d'autre part, que Δz_0 reste relativement faible de l'ordre de quelques nm, typiquement $\lesssim 5$ nm. Si on différencie l'équation 4.10, on peut alors montrer que :

$$\Delta z_0 \sim \kappa \left(\frac{\Delta \gamma}{\gamma} + \frac{\Delta \beta}{\beta} \right) \quad (4.19)$$

si on néglige les erreurs sur κ et sur les signaux de fluorescence. Par ailleurs, on peut tout à fait estimer que l'erreur relative sur β est de l'ordre de 5-10%. L'erreur sur γ provient essentiellement du décalage spatial du spot laser quand on augmente l'angle d'incidence (paragraphe 3.3.1). On peut donc aussi tout à fait estimer que $\frac{\Delta \gamma}{\gamma} = 5-10\%$. Sachant que $\kappa \approx 100$ nm, alors $10 < \Delta z_0 < 20$ nm. Si on ajoute ensuite à cette valeur les 5 nm d'erreur induite par les fluctuations du signal de fluorescence, on trouve que $15 < \Delta z_0 < 25$ nm. Les résultats des expériences d'adhésion spécifique présentés sur la figure 4.21 constituent un bon moyen de tester la résolution axiale de notre technique. L'histogramme 4.21 B_3 fait clairement apparaître les deux sous-populations lorsque la distance qui les sépare est d'au moins 20 nm. Une telle preuve expérimentale pour l'appréciation de la résolution axiale d'un système optique est extrêmement rare dans la littérature. L'erreur sur la mesure de la distance z_0 provient donc essentiellement de l'erreur sur les calculs des facteurs de correction γ et β . La résolution axiale de notre système est donc d'environ 20 nm et peut être comparable avec celle obtenue par la microscopie RICM. La résolution en RICM est souvent estimée à ~ 5 nm [170, 176]. Or, cette évaluation ne tient pas compte de la divergence des rayons lumineux à la sortie de l'objectif. La résolution RICM peut être appréciée sur les distributions des distances dans la référence [170]. Dans cet article du groupe de E. Sackmann, la résolution axiale est en réalité tout à fait similaire à la notre, c'est-à-dire environ 20 nm.

4.8 Conclusion

Nous avons développé une technique qui permet d'étudier l'adhésion de vésicules géantes. Notre approche se base sur la normalisation de l'image TIRF par une image enregistrée en épi-fluorescence. Nous l'avons nommée nTIRF, pour *normalized Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*. Notre outil offre la possibilité d'observer, avec une résolution axiale de l'ordre de 20 nm, la topographie d'une membrane lipidique en contact avec une surface.

Nous avons pu, grâce à la microscopie nTIRF, caractériser l'adhésion de vésicules en mesurant les distances qui séparent la membrane de la surface. Les vésicules ont été déposées sur différents substrats fonctionnalisés. Dans un premier temps, je me suis intéressée au phénomène d'adhésion non spécifique, où l'attraction et la répulsion des vésicules étaient guidées par des interactions électrostatiques. Pour cela, les vésicules ont été déposées sur des surfaces chargées négativement telles que la β -caséine ou SiOH. Sur ces surfaces, la membrane des GUVs est repoussée au delà de 150-200 nm de l'interface. A l'opposé, les vésicules déposées sur les substrat chargés positivement comme le PDDA ou les NH₂-PEG, subissent une forte attraction électrostatique. La membrane se trouve alors à moins de 100 nm de l'interface. Dans le cas de surfaces fonctionnalisées avec des aminosilanes et la poly-L-lysine, l'attraction est telle, qu'elle provoque la lyse (i.e. l'éclatement) des vésicules sur la surface. La résolution axiale de notre technique nous a permis de mettre en évidence des effets relativement fins, comme celui lié à la variation de la longueur de la chaîne de PEG, où la distance $\langle z_0 \rangle$ est 18 nm plus grande avec les PEG 5000 que pour les PEG 2000. Les polymères de polyéthylène glycol sont caractérisés par un rayon de giration qui dépend de la longueur de la chaîne de PEG. Grâce à cette propriété, les PEG sont souvent utilisés pour mimer un glycocalyx (la couche de polysaccharides liée de manière covalente aux phospholipides et aux protéines membranaires) [177].

L'adhésion spécifique a été étudiée à l'aide de vésicules biotinylées sur un substrat recouvert de streptavidine. Ce type d'étude est souvent utilisé dans le but de mimer les conditions d'adhésion cellulaire. Les plaques d'adhésions induites par les liaisons biotine-streptavidine peuvent être comparées aux points focaux d'adhésion que développe la cellule avec la MEC. La présence des plaques d'adhésion a déjà été observée dans des nombreuses études [80, 177, 178]. Notre étude montre que la membrane se situe en moyenne à ~ 34 nm de la surface au niveau des zones d'adhésion. Cette distance résulte de l'épaisseur du sandwich moléculaire entre la membrane et l'interface. Ce sandwich multicouche est composé d'une première couche de NH₂-PEG5000-biotine, d'une seconde couche de streptavidine et d'une troisième couche de biotine-PEG2000 présente au niveau de la membrane des vésicules. Si on néglige la taille de la biotine qui mesure moins d'un nm, l'épaisseur de la première couche est principalement définie par la longueur de la chaîne de PEG, estimée à ~ 10 nm. La taille de la streptavidine, étudiée par cristallographie, s'élève à environ 5-6 nm [179, 180]. L'épaisseur de la dernière couche est prédominée par la longueur des PEG, environ 4 nm [170]. Il n'est alors pas étonnant que les plaques d'adhésion spécifique soient situées à une distance minimum de 20

nm, limitée par la taille de ce sandwich moléculaire. La valeur de z_0 mesurée par nTIRF est de ce fait acceptable compte tenu de la résolution de notre technique. Mes mesures coïncident avec les résultats trouvés par L. Limozin et K. Sengupta par RICM [95], en particulier en ce qui concerne la différence de distances z_0 entre la membrane libre et celle liée à la surface ($\sim 20\text{-}30$ nm).

Chapitre 5

Etude de l'adhésion cellulaire par VA-TIRFM

5.1 Introduction

La microscopie nTIRF est une méthode relativement simple à mettre en œuvre, qui permet d'étudier avec précision l'adhésion de vésicules géantes. Néanmoins, il n'est pas possible d'appliquer cette technique sur des cellules. En effet, il est difficile d'estimer le facteur de correction β pour les cellules, d'une part parce qu'on ne peut pas prédire les contours d'une cellule vivante en adhésion, et d'autre part parce qu'il existe de nombreux organites intracellulaires susceptibles de générer du bruit en épi-fluorescence. L'approche que nous avons retenue pour mesurer les distances membrane-surface sur les cellules est la technique VA-TIRF (TIRF à angle variable) proposée et développée conjointement par F. Lanni et collaborateurs [101] et G. Truskey et collaborateurs [102]. La méthode VA-TIRF repose essentiellement sur l'acquisition d'une série d'images TIRF à différents angles d'incidence θ ($\theta > \theta_c$). Cette technique permet de cartographier les distances entre la membrane plasmique et la surface (uniquement pour la partie ventrale de la cellule). Les angles d'incidence étant très proches les uns des autres, nous avons dû améliorer notre montage optique, notamment en implantant une platine de rotation plus précise que celle utilisée pour la microscopie nTIRF. Cette nouvelle platine motorisée (présentée dans le chapitre 3) permet de contrôler l'angle α avec une précision de $2 \times 10^{-4}^\circ$. L'optimisation du montage expérimental a fait l'objet d'une partie importante de mon travail de troisième année de thèse. Ainsi, les résultats expérimentaux que je présenterai à la fin de ce chapitre constituent plus une étude de faisabilité qu'une étude biologique en-soi. Ce chapitre sera donc consacré à la description de la microscopie VA-TIRF, suivie de résultats préliminaires que j'ai pu obtenir sur deux lignées cellulaires en adhésion sur différentes surfaces recouvertes de biomolécules (fibronectine, collagène de type IV, poly-L-lysine, albumine ou encore β -caséine).

5.2 Modèles cellulaires

J'ai choisi de présenter les résultats obtenus sur deux lignées de cellules adhérentes : MDA-MB-231 et U-87 MG, même si au cours de mes travaux j'ai également travaillé sur d'autres lignées comme les cellules MCF7, HT-1080 ou MDCK2-GFP-Pgp. Ces deux lignées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATTC).

A Lignée MDA-MB-231

La lignée MDA-MB-231 (HTB – 26TM, ATTC) est issue d'un adénocarcinome mammaire humain. Ces cellules ont été prélevées à partir d'une métastase située au niveau d'un épanchement pleural. MDA-MB-231 est l'acronyme de M.D. Anderson - Metastatic Breast, en référence à l'institut M.D. Anderson Cancer Center (Houston) où la lignée a été établie en 1973 [181]. *In vitro*, cette lignée cellulaire est reconnue pour avoir un phénotype hautement invasif, en comparaison avec d'autres lignées d'adénocarcinome étudiées (typiquement la lignée MCF7). Les injections répétitives *in vivo* de ces cellules provoquent l'apparition de métastases chez les souris. Les études ont démontré qu'elles expriment de nombreux récepteurs matriciels, notamment les sous-unités α_2 , α_3 , α_v , ainsi que β_1 , β_5 des intégrines [182, 183]. L'expression de ces sous-unités permet, entre autres, l'adhésion des MDA-MB-231 sur le collagène de type IV ($\alpha_2\beta_1$) ou la fibronectine ($\alpha_v\beta_5$) [90, 184]. Les altérations d'expression de ces récepteurs ont été également associées au développement de métastases [183]. La lignée MDA-MB-231 nous a été fournie par Hamid Morjani, Université de Reims Champagne-Ardenne (UMR CNRS 6237).

B Lignée U-87 MG

La seconde lignée est U-87 MG (HTB – 14TM, ATTC). Il s'agit d'une des premières lignées cellulaires établies à partir d'un glioblastome humain dans les années 60 [185]. Ces cellules appelées MG (*malignant glial*) ont été décrites comme ayant une morphologie atypique : souvent polynucléaire avec des prolongements membranaires très fins. Des lignées additionnelles ont été développées par la suite sur la base des MG. Les U-87 MG appartiennent à la série U- établie à l'université d'Uppsala. Les cellules U-87 MG sont souvent utilisées dans les études d'adhésion. Elle expriment notamment les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3/\beta_5$, ce qui leur procure la spécificité d'adhésion sur la fibronectine [5]. Cette lignée nous a été fournie par Monique Dontenwill, Université de Strasbourg (UMR CNRS 7213).

C Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées au sein d'une étuve à 37°C sous atmosphère humide, à 5% de CO₂. L'entretien des lignées se fait durant la phase exponentielle de leur croissance, en général lorsque

la monocouche de cellules atteint 70-80% de confluence. L'entretien s'effectue dans des conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire : le milieu usagé est d'abord retiré et les cellules sont rincées à l'aide d'une solution de PBS (Phosphate Buffer Solution, pH=7.4, Invitrogen). Le tapis cellulaire est décollé sous action de la trypsine (Trypsin-EDTA, 0.05% 1x, Gibco). 300 μ L de cette enzyme est reparti uniformément sur le fond de la boîte de culture puis les cellules sont incubées 3 à 5 minutes à 37°C afin d'optimiser la digestion enzymatique. La trypsine est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques de certains acides aminés. Elle permet la digestion des protéines d'adhésion et provoque le détachement des cellules. L'action de la trypsine est inhibée par l'addition de 5 mL de milieu de culture. Les cellules sont alorsensemencées dans de nouvelles flasques de culture, d'une surface de 25 cm², à une concentration typique de 10⁴ cellules/mL pour un volume de 5 mL. Les lignées cellulaires sont cultivées dans des milieux différents qui sont du MEM (Minimum Essential Medium) Glutamax-I (Gibco) pour les MDA-MB-231 et du EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) avec L-glutamine (Lonza) pour les cellules U-87 MG. Les milieux sont supplémentés de 10% de sérum de veau foetal (SVF, Gibco) et de 1% d'un mélange d'antibiotiques (Péniciline 100 U/mL et Streptomycine 100 μ g/mL, Gibco). Ces milieux contiennent du rouge de phénol qui indique leur changement de pH.

D Marquage de la membrane plasmique et milieu d'observation

L'observation des cellules a été réalisé dans un milieu de culture ne présentant pas de signal de fluorescence à $\lambda=488$ nm. Les milieux comme le MEM ou le EMEM, même sans rouge de phénol, produisent un signal de fluorescence relativement important à 488 nm. Nous avons constaté que deux vitamines sont à l'origine de cette fluorescence : la riboflavine, en majeure partie et l'acide folique, dans une moindre mesure. La société Evrogen produit un milieu de culture ne contenant pas de riboflavine et fortement appauvri en acide folique : le milieu DMEM^{gfp}-2 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Evrogen). Nous y ajoutons de la L-glutamine (2 mM), du HEPES (10 mM) et 1% de SVF. Ce nouveau milieu est parfait pour les observations en fluorescence à 488 nm car il préserve l'état physiologique des cellules pendant plusieurs heures et ne produit quasiment pas de bruit de fond à 488 nm. La sonde fluorescente utilisée pour marquer la membrane plasmique est la DiO. Les propriétés de cette sonde ont été décrites dans le chapitre 2 (paragraphe 2.1.3). Elle a été choisie parce qu'elle est préférentiellement excitable en polarisation "s". De plus, elle permet d'obtenir un marquage de la membrane très homogène, en évitant l'internalisation. Le protocole de marquage que j'ai mis en place s'inspire de celui décrit dans l'article publié par Johnson et collaborateurs [186]. Les cellules sont tout d'abord lavées au PBS puis décollées du fond de la boîte de culture avec de la trypsine (on utilise jusque là, un protocole identique à celui pour l'entretien des cellules). Les cellules sont ensuite resuspendues à une concentration de 3x10⁵ cellules/mL dans 1 mL de milieu non fluorescent (DMEM^{gfp}-2, Evrogen), supplémenté de 1% de SVF, de L-glutamine et d'HEPES. Une solution de DiO, diluée dans du DMF à la concentration 700 μ M, est placée dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes avant d'en prélever \sim 7 μ L et de l'injecter dans le tube

qui contient les cellules en suspension (concentration finale de DiO est $\sim 5 \mu\text{M}$). Les cellules sont incubées à l'étuve (37°C , 5% CO_2) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm. On élimine alors le surnageant contenant l'excès de sondes fluorescentes non intégrées à la membrane. Les cellules sédimentées au fond de tube sont resuspendues dans le milieu non fluorescent, chauffé à 37°C . La procédure de centrifugation est répétée encore deux fois, afin d'éliminer le maximum de DiO non liée à la membrane. Les cellules sont enfin déposées sur des lamelles de verre fonctionnalisées, fixées dans une chambre d'observation (paragraphe 3.2.5). Pour permettre l'adhésion cellulaire, les chambres d'observation sont placées dans l'étuve. Afin de pouvoir comparer les résultats expérimentaux sur différents substrats, toutes les mesures d'adhésion ont été effectuées au bout d'une heure d'incubation à 37°C et 5% CO_2 .

5.3 Fonctionnalisation des lamelles de verre

Dans le but de comparer le comportement adhésif des cellules à celui des vésicules, nous avons réalisé les surfaces destinées à provoquer soit une répulsion, soit une attraction électrostatique (adhésion non spécifique). J'ai reproduit un certain nombre de fonctionnalisations de surfaces réalisées lors de l'étude de l'adhésion de GUVs. Afin d'induire l'adhésion spécifique des cellules sur un substrat, de nouveaux protocoles de préparation de surfaces ont été élaborés. L'adhésion spécifique est obtenue par l'intermédiaire de protéines matricielles : fibronectine ou collagène de type IV. Pour éviter la contamination bactérienne des surfaces, tous les protocoles ont été réalisés dans des conditions stériles (sous la hotte à flux laminaire). La méthodologie adoptée pour obtenir chaque type de surface est détaillée dans ce paragraphe.

5.3.1 Réalisation de surfaces chargées négativement

Pour évaluer le comportement adhésif des cellules lorsque la surface induit une force de répulsion électrostatique sur la membrane plasmique, nous avons préparé deux types de surfaces chargées négativement (la membrane cellulaire étant elle aussi chargée négativement).

A β -caséine

Pour rappel, la β -caséine est une protéine qui, lorsqu'elle forme une monocouche sur une lamelle de verre, provoque l'apparition d'une charge effective négative. Ses caractéristiques et le protocole de fonctionnalisation de la surface ont été présentés dans le chapitre 4 (paragraphe 4.2.1 B).

B Albumine de sérum bovin (BSA)

L'albumine, comme la β -caséine, est une protéine chargée négativement (66.5 kDa). C'est la protéine la plus abondante du sérum. Sa concentration physiologique se situe entre 30 et 40 g/litre

de sang. L'albumine joue le rôle de régulateur de pH sanguin. Pour cette raison, elle est très soluble à $\text{pH}=7$. Cette propriété est provoquée par la charge élevée de la protéine, induite majoritairement par les acides aminés chargés négativement (acide glutamique et aspartique). D'après les études cristallographiques, la structure tertiaire de l'albumine est en forme de cœur, mesurant environ 8 nm de long et 3 nm d'épaisseur [187]. A pH acide ($\text{pH}=2-7$), l'albumine a tendance à se déplier. Nos expériences ont été réalisées à $\text{pH}=7.2$: il est envisageable que la protéine conserve sa structure tertiaire et donc s'adsorbe de façon non covalente à la surface. L'albumine que nous avons utilisée pour fonctionnaliser les surfaces est l'albumine de sérum bovin (BSA). Le protocole d'élaboration des surfaces est le suivant :

- Les lamelles sont dégraissées à l'isopropanol dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes.
- Elles sont ensuite recouvertes d'une solution de BSA (pureté $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, A3803) diluée dans une solution tampon phosphate (PBS, $\text{pH}=7.2$, Invitrogen Life Technologies) à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Après une heure d'incubation, les surfaces sont rincées au PBS puis séchées à l'argon (ou l'azote).

5.3.2 Surface chargée positivement (poly-L-lysine)

Nous avons également souhaité développer des interfaces donnant lieu à une attraction électrostatique de la membrane vers la surface. Nous avons donc choisi de fonctionnaliser les surfaces avec de la poly-L-lysine. Le protocole pour ce type de surface est présenté dans le chapitre 4, paragraphe 4.2.2 B. A noter que cette fois la poly-L-lysine est diluée dans le PBS. Ce changement de solvant ne modifie pas les conditions de fixation du polymère car les groupements amines ont un $pK_a \sim 9.5$, ce qui signifie qu'ils restent sous la forme chargée NH_3^+ à $\text{pH}=7.2$.

5.3.3 Fonctionnalisation des surfaces pour l'adhésion spécifique

Dans le but de réaliser les surfaces destinées aux expériences d'adhésion spécifique, nous avons fonctionnalisé les lamelle de verre avec les composants de la matrice extracellulaire : la fibronectine et le collagène de type IV. La structure de ces deux protéines matricielles a été décrite dans le chapitre 1 (paragraphe 1.2.2).

A Fonctionnalisation des surfaces avec de la fibronectine

Une couche homogène de fibronectine peut être obtenue par simple physisorption sur des lamelles nettoyées au piranha. Les groupements SiOH induisent une attraction électrostatique des groupements amines présents sur la protéine. Le protocole de préparation des surfaces est le suivant :

- Afin d'obtenir les terminaisons SiOH à la surface, les lamelles sont tout d'abord traitées par une solution piranha (50% H₂O₂ et 50% H₂SO₄), décrite précédemment dans le paragraphe 4.2.1 A.
- Les surfaces sont exposées pendant 1 heure à la solution de fibronectine (Fibronectine de plasma humain 0.1%, Sigma-Aldrich, F0895) diluée à la concentration de 10 µg/mL dans du PBS pH=7.2.
- Afin d'enlever l'excès de protéine non adsorbée, les substrats sont rincés au PBS puis séchés à l'argon (ou l'azote).

B Fonctionnalisation des surfaces avec le collagène de type IV

Les fibres de collagène étant plus volumineuses que celles de la fibronectine, le protocole précédent ne fonctionne pas. Il est nécessaire de lier le collagène par chimisorption à la surface (via des liaisons covalentes). Les protocoles conventionnels de préparation de surfaces avec du collagène reposent sur le séchage d'une goutte d'une solution de collagène. Cependant, cette méthode de préparation ne permet pas de contrôler l'épaisseur de la couche (un aspect critique dans nos expériences). Afin d'obtenir les couches d'épaisseur nanométrique, nous avons développé un protocole de fonctionnalisation des surfaces de manière spécifique, à l'aide d'aminosilanes. Les fonctions amines de ces derniers permettront la liaison des fibres de collagène via les fonctions carboxyles des acides aminés sur la chaîne peptidique de la protéine, tels que l'aspartate ou le glutamate. Le protocole de fonctionnalisation est le suivant :

- Les surfaces sont soigneusement nettoyées avec une solution piranha, puis fonctionnalisées avec des aminosilanes (Cf. paragraphe 4.2.2 A).
- Les surfaces silanisées sont ensuite incubées pendant quatre heures avec une solution de collagène de type IV (Collagène de type IV de cellules humaines dilué dans l'acide acétique à 0.5 M, Sigma-Aldrich, C6745) dilué à 50 µg/mL dans une solution de PBS.
- Afin d'enlever l'excès de protéine non adsorbée, les substrats sont rincés au PBS puis séchés à l'argon (ou l'azote).

5.4 Caractérisation des surfaces

Afin de caractériser nos différentes surfaces, nous avons choisi la méthode des angles de contact. Comme au chapitre 4 (étude de l'adhésion de vésicules par nTIRF), nous avons pu démontrer un changement d'état de la surface après sa fonctionnalisation. Les mesures nous ont permis de vérifier également l'homogénéité de la fonctionnalisation. Les résultats des mesures pour chaque type de substrat sont résumés dans le tableau 5.1. L'évolution du profil d'une goutte d'eau ultra-pure déposée sur chaque surface après traitement est présentée sur la figure 5.1.

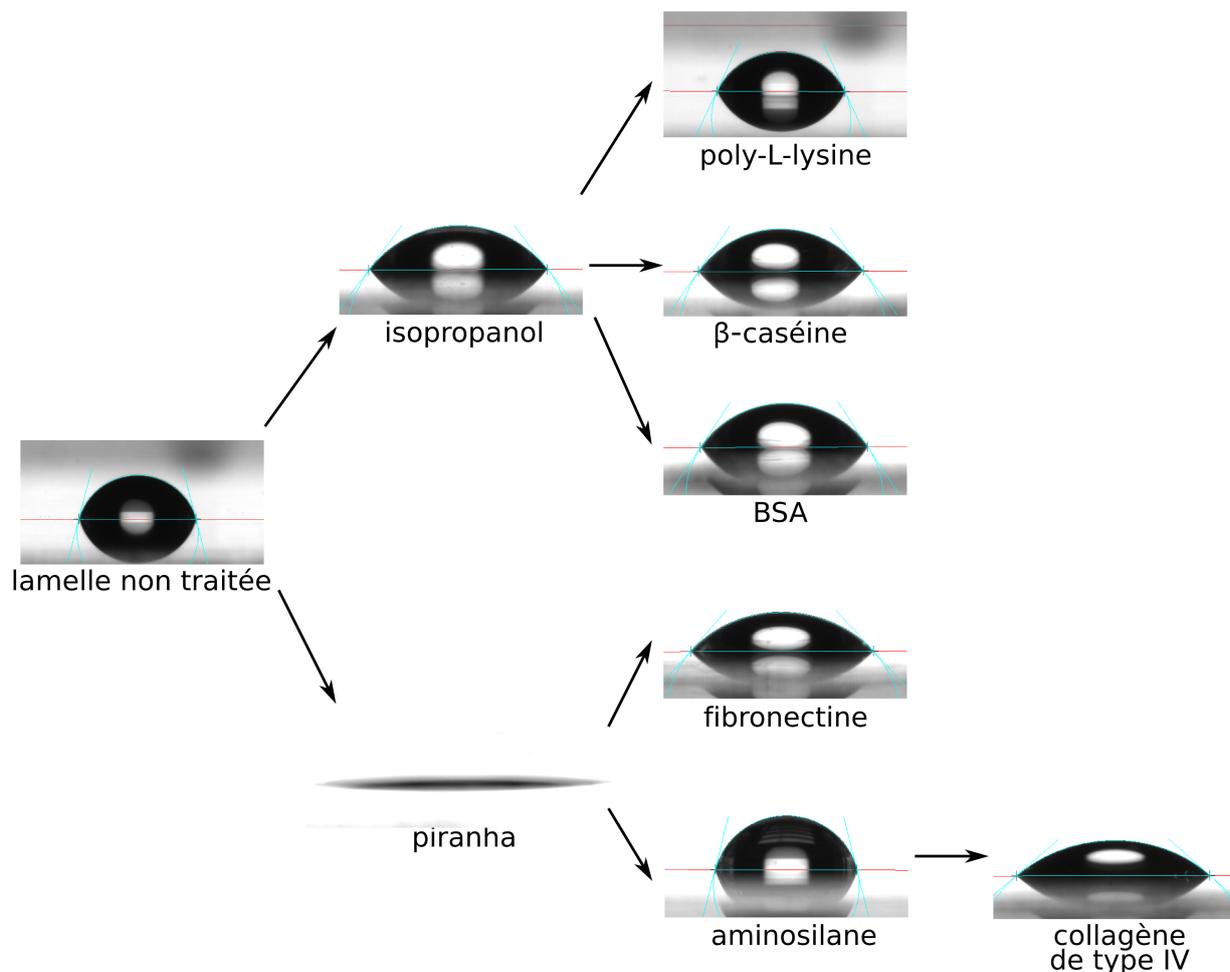


FIGURE 5.1 – Evolution du profil d’une gouttelette d’eau déposée sur chaque surface nettoyée puis fonctionnalisée. La ligne rouge figure l’interface. Le profil de la goutte est délimité par l’ellipse dessinée en bleu.

Dans l’objectif d’estimer l’épaisseur de la couche de protéines déposées sur les surfaces par fonctionnalisation, j’ai caractérisé ces surfaces par ellipsométrie (HORIBA, Jobin Yvon, UVISEL). Ces mesures n’ont pas été réalisées directement sur les lamelles de verre, mais sur des substrats de silicium. J’ai évalué l’épaisseur de la couche de fibronectine à $\sim 3-4$ nm et celle de collagène de type IV à ~ 4 nm. Il est intéressant de noter que ces mesures m’ont permis de vérifier la nature du dépôt en déterminant simultanément l’indice effectif de la couche. J’ai enregistré une valeur d’indice de ~ 1.4 sur nos dépôts d’épaisseur nanométrique. D’après la littérature, l’indice effectif de ces deux protéines matricielles est typiquement ~ 1.5 [188].

TABLEAU 5.1 – Tableau récapitulatif des mesures d'angles de contact sur les surfaces étudiées. N correspond au nombre de mesures effectuées.

surface	N	angle moyen (degré)	écart-type (degré)
lamelle non traitée	29	73	7
isopropanol	15	53	2
poly-L-lysine	30	66	4
β -caséine	20	56	4
BSA	20	56	2
SiOH	-	$\lesssim 6$	-
fibronectine	20	49	2
aminosilane	48	75	2
collagène de type IV	20	41	3

5.5 Mesure de la distance membrane-surface par VA-TIRF

Je vais montrer dans ce paragraphe comment il est possible, à partir d'une série d'images TIRF enregistrées en augmentant graduellement l'angle d'incidence θ , de déterminer la distance qui sépare la membrane plasmique du substrat. Comme dans le chapitre précédent, la distance membrane/-substrat est notée z_0 (figure 4.12).

5.5.1 Calcul de la distance membrane-surface (approche théorique)

La méthode pour déterminer la distance z_0 en VA-TIRF est radicalement différente de celle en nTIRF. Si on se réfère aux travaux de Burmeister, Truskey et Reichert (pionniers dans le domaine), la dépendance angulaire du signal de fluorescence, émis par une membrane marquée, est exponentielle [146]. Il est possible de formaliser ce signal de fluorescence si on considère comme dans le chapitre 4, le signal isotrope produit par un plan parallèle à l'interface et d'épaisseur infinitésimale. Cette approximation est tout à fait acceptable dans le cas de la membrane ventrale d'une cellule, si le marquage est bien réalisé. En effet, lorsque la cellule est en adhésion sur un substrat, la membrane plasmique, dont l'épaisseur est nanométrique, est localement parallèle à l'interface. L'expression du signal de fluorescence en TIRF ($\theta > \theta_c$) $f_d(x_d, y_d, \theta)$ pour un pixel arbitraire de la caméra CMOS est donné dans le paragraphe 4.4.1 (équation 4.7). Par conséquent, le signal de fluorescence produit à différents angles θ , tels que $\theta_c < \theta_1 < \theta_2 < \theta_3 \dots < \theta_{10}$, est donné par :

$$\begin{aligned}
f_d(x_d, y_d, \theta_1) &= \eta_d(z_0)\sigma_{abs}(z_0)\phi(z_0)\frac{I_0}{hc}C_0\gamma(\theta_1)e^{-\frac{z_0}{\kappa(\theta_1)}}\iint PSF_{det}(x_d, y_d) \\
f_d(x_d, y_d, \theta_2) &= \eta_d(z_0)\sigma_{abs}(z_0)\phi(z_0)\frac{I_0}{hc}C_0\gamma(\theta_2)e^{-\frac{z_0}{\kappa(\theta_2)}}\iint PSF_{det}(x_d, y_d) \\
f_d(x_d, y_d, \theta_3) &= \eta_d(z_0)\sigma_{abs}(z_0)\phi(z_0)\frac{I_0}{hc}C_0\gamma(\theta_3)e^{-\frac{z_0}{\kappa(\theta_3)}}\iint PSF_{det}(x_d, y_d) \\
&\text{etc} \\
f_d(x_d, y_d, \theta_{10}) &= \eta_d(z_0)\sigma_{abs}(z_0)\phi(z_0)\frac{I_0}{hc}C_0\gamma(\theta_{10})e^{-\frac{z_0}{\kappa(\theta_{10})}}\iint PSF_{det}(x_d, y_d) \quad (5.1)
\end{aligned}$$

On remarque que pour chaque angle θ_i , le signal de fluorescence en TIRF ne varie pas simplement de façon exponentielle avec la distance z_0 . Il dépend aussi de nombreux paramètres inconnus tels que η_d , σ_{abs} , ϕ , C_0 . Tout comme en microscopie nTIRF, la technique VA-TIRF permet de s'affranchir de tous ces paramètres inconnus, qui pour certains dépendent de z_0 . Pour cela, on définit la grandeur χ qui regroupe tous les grandeurs qui ne dépendent pas de θ :

$$\chi(x_d, y_d, z_0) = \eta_d(z_0)\sigma_{abs}(z_0)\phi(z_0)\frac{I_0}{hc}C_0\iint PSF_{det}(x_d, y_d) \quad (5.2)$$

On peut alors réécrire le signal de fluorescence pour chaque angle d'incidence, normalisé par le facteur de correction d'irradiance γ (paragraphe 2.4.2) :

$$\begin{aligned}
\frac{f_d(x_d, y_d, \theta_1)}{\gamma(\theta_1)} &= \chi(x_d, y_d, z_0)e^{-\frac{z_0}{\kappa(\theta_1)}} \\
\frac{f_d(x_d, y_d, \theta_2)}{\gamma(\theta_2)} &= \chi(x_d, y_d, z_0)e^{-\frac{z_0}{\kappa(\theta_2)}} \\
&\text{etc.} \quad (5.3)
\end{aligned}$$

En prenant le logarithme de $\frac{f_d(x_d, y_d, \theta_i)}{\gamma(\theta_i)}$ on obtient alors la série d'équations :

$$\begin{aligned}
\ln \frac{f_d(x_d, y_d, \theta_1)}{\gamma(\theta_1)} &= \ln \chi(x_d, y_d, z_0) - \frac{z_0}{\kappa(\theta_1)} \\
\ln \frac{f_d(x_d, y_d, \theta_2)}{\gamma(\theta_2)} &= \ln \chi(x_d, y_d, z_0) - \frac{z_0}{\kappa(\theta_2)} \\
&\text{etc.} \quad (5.4)
\end{aligned}$$

En conclusion, la distance z_0 entre le plan fluorescent (i.e. la membrane) et la surface, correspond à la pente de la droite $\ln \frac{f_d(x_d, y_d, \theta_i)}{\gamma(\theta_i)}$ tracée en fonction de $-\frac{1}{\kappa(\theta_i)}$. Ce traitement des signaux de fluorescence en TIRF permet de s'affranchir, comme en nTIRF, de tous les paramètres inconnus liés à la concentration locale du fluorophore dans la membrane plasmique, et de tous ceux relatifs à l'orientation du moment dipolaire $\vec{\mu}_{01}$. Un exemple de traitement de signal est donné sur la figure 5.2.

Le signal de fluorescence enregistré en chaque pixel de l'image est divisé par γ puis tracé en fonction de l'inverse de la profondeur d'atténuation de l'onde évanescente ($-1/\kappa$). Les points expérimentaux peuvent alors être ajustés par la droite de régression :

$$\ln \frac{f_{TIRF}(\theta_i)}{\gamma(\theta_i)} = \ln \chi - \frac{z_0}{\kappa(\theta_i)} \quad (5.5)$$

La pente de la droite correspond alors à la distance z_0 entre la membrane et l'interface. L'ordonnée à l'origine de la droite $\ln \chi$ n'est pas utile pour calculer z_0 . Il ne reste plus qu'à réaliser ce traitement en chaque pixel de l'image, afin d'obtenir une nouvelle image qui représente la valeur de z_0 en chaque pixel.

5.5.2 Approche expérimentale

Le réglage de l'incrément angulaire $\Delta\theta$ est capital en VA-TIRF. Il doit être le plus grand possible, sachant que θ_i doit être compris entre $\theta_c=61.24^\circ$ et $\theta_{max}=72^\circ$. J'ai décidé que la première image de la série serait enregistrée pour un angle d'incidence θ voisin de 63° , et la dernière pour un angle $\theta \sim 68^\circ$. Il est en effet important de souligner que pour $\theta > 68^\circ$, les images de fluorescence présentent trop d'aberrations pour être exploitables. Dans cet intervalle angulaire, il est tout à fait possible d'acquérir une série de 10 images tous les $\Delta\theta=0.4^\circ$, ce qui correspond à un pas $\Delta\alpha$ de 0.002° au niveau de la platine de rotation M_R (figure 3.2). Les angles d'incidence θ_i ont été déterminés grâce à la courbe de calibration $\theta(\alpha)$ (paragraphe 3.3.2). La procédure de prise de mesure en VA-TIRF est résumée sur la figure 5.3.

On commence par enregistrer une série de 10 images TIRF d'une cellule, pour différents angles d'incidence θ_i tel que $\theta_1 < \theta_2 < \theta_3 \dots < \theta_{10}$. La progression angulaire est donnée dans le tableau 5.2. Pour les mêmes positions angulaires, on enregistre également des images du fond sur une zone dépourvue des cellules. Pour chaque angle θ_i , les images de fond sont moyennées, puis ajustées à l'aide d'une fonction Gaussienne 2D (équation 3.3, figure 3.8), de façon à extraire un profil typique du fond qui sera soustrait aux images TIRF. Le bruit sur les images provient essentiellement du bruit propre de la caméra CMOS ("*offset*" de 100 coups). La diffusion Raman de l'eau et de la lamelle de verre, et l'auto fluorescence des protéines contenues dans le milieu de culture (SVF) produisent également du bruit dans une moindre mesure. L'évolution du bruit en TIRF, tracée en fonction du temps d'acquisition et de la puissance laser, est représentée sur la figure 5.4. Ce bruit a été déterminé en enregistrant le signal en TIRF à $\theta=63.59^\circ$ d'une lamelle recouverte du milieu de culture dit "non fluorescent" supplémenté de 1% SVF. On remarque que le bruit augmente linéairement avec le temps d'exposition. Pour une puissance laser de 5 W/cm^2 et un temps d'acquisition t_{acq} de 100 ms, ce qui correspond aux paramètres typiques que j'ai utilisé expérimentalement, le bruit vaut ~ 230 coups/pixel. Le signal de fluorescence enregistré sur les cellules en adhésion est quant à lui variable. Néanmoins, il reste supérieur à quelques milliers de coups pour 100 ms d'acquisition.

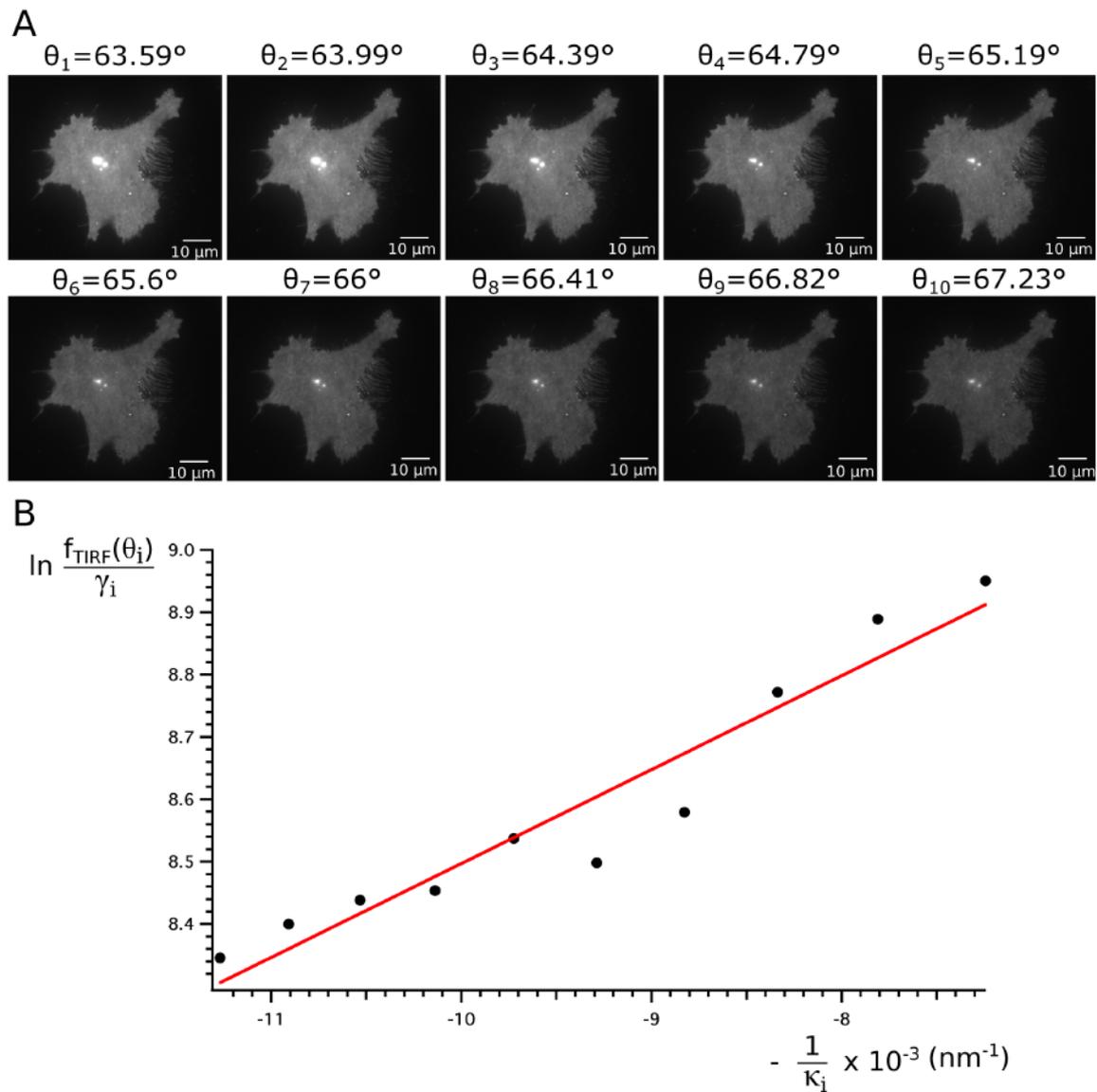
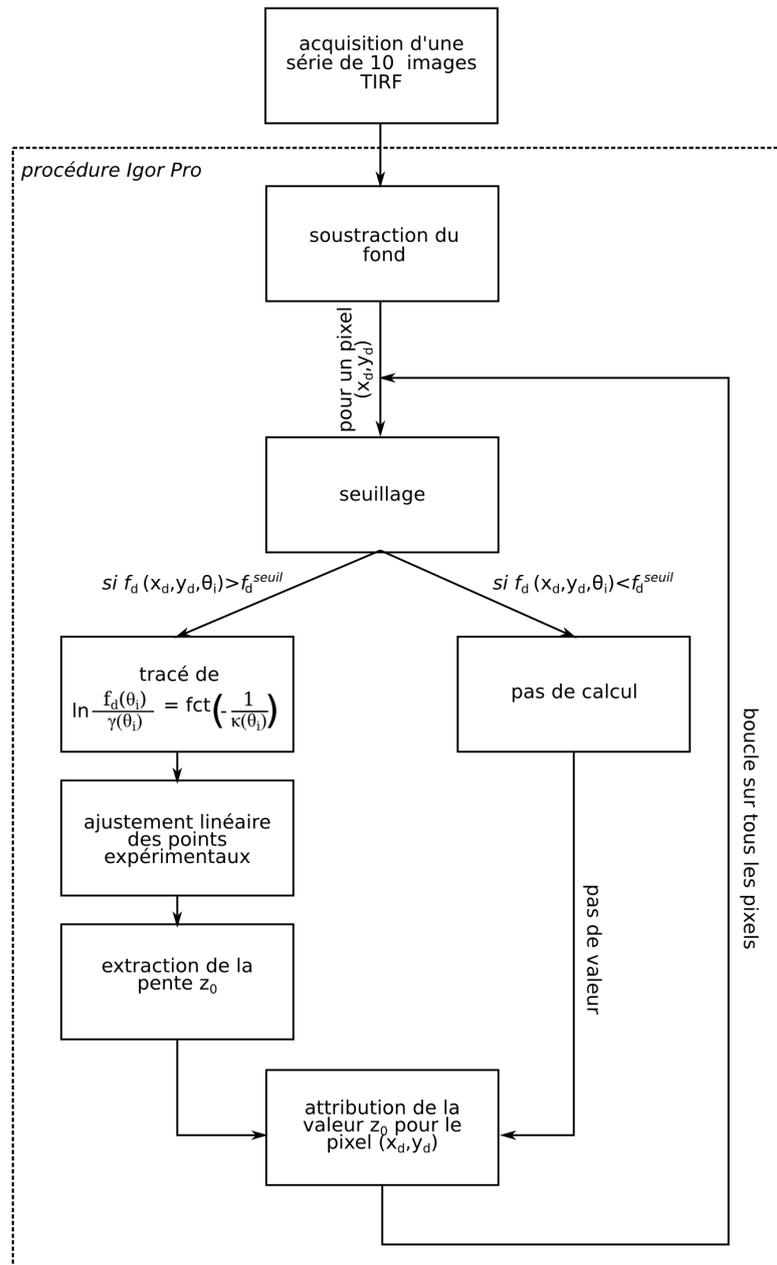


FIGURE 5.2 – Exemple de calcul de la distance membrane-interface. (A) Une série d'images TIRF enregistrées à différents angles d'incidence θ en polarisation "s". Il s'agit d'une cellule MDA MB 231 en adhésion sur de la fibronectine dans un milieu de culture non fluorescent, à 37°C. La fluorescence a été collectée à l'aide d'un objectif à immersion (ON=1.45; 60x) pour une excitation laser à 488 nm (5 W/cm²) et un temps d'acquisition de 100 ms. (B) Evolution de $\ln(f_{TIRF}(\theta_i)/\gamma_i)$ en fonction de $-1/\kappa_i$ pour un pixel arbitraire au niveau de la zone d'adhésion. Les points ont été ajustés à l'aide de l'équation 5.5 (courbe rouge). La pente de la droite est $z_0=151$ nm.

FIGURE 5.3 – Procédure qui permet de construire l'image des distances z_0 .TABLEAU 5.2 – Progression angulaire des angles d'incidence α et θ , et valeurs de κ utilisées pour les mesures VA-TIRFM. Les profondeurs d'atténuation κ ont été calculées l'aide de l'équation 4.11, sachant que $n_{\text{eff}}=1.341$.

α_i (degré)	0.48	0.482	0.484	0.486	0.488	0.49	0.492	0.494	0.496	0.498
θ_i (degré)	63.59	63.99	64.39	64.79	65.19	65.6	66	66.41	66.82	67.23
κ_i (nm)	138	128	120	113	108	103	99	95	92	89

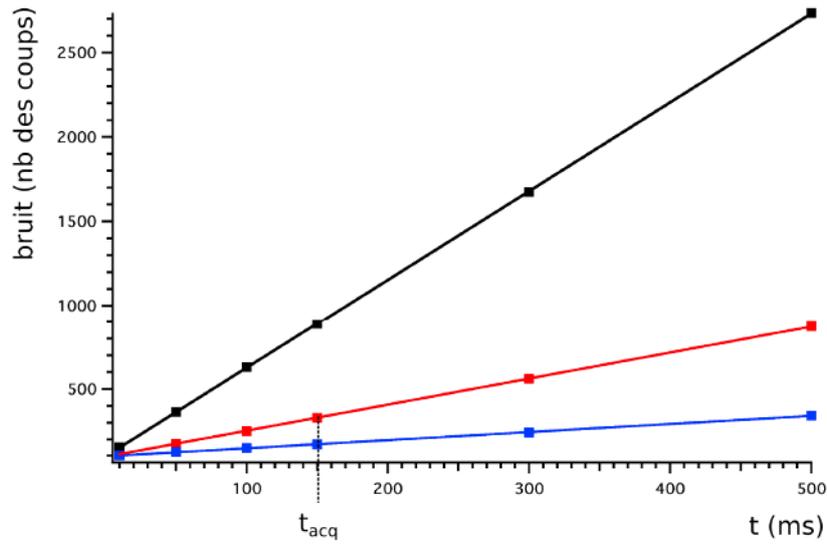


FIGURE 5.4 – Evolution du bruit de fond pour $\theta=63.59^\circ$ en fonction du temps d'acquisition et de la puissance d'excitation laser. Le signal d'émission a été collecté à l'aide d'un objectif à immersion (ON=1.45 ; 60x), $\lambda=488 \text{ nm}$, pour trois puissances laser différentes : 1.5 W/cm^2 (carrés bleus), 5 W/cm^2 (carrés rouges) et 18 W/cm^2 (carrés noirs). Les points expérimentaux ont été ajustés par une fonction affine.

La distance membrane-surface est intégralement calculée à l'aide d'une procédure que nous avons développée sur Igor Pro (Wave Metrics). Le programme soustrait d'abord le fond pour chaque image TIRF. La distance z_0 est ensuite calculée, pixel par pixel, suivant la procédure décrite sur la figure 5.3. On effectue tout d'abord un seuillage dont l'objectif est d'optimiser le temps de calcul, en évaluant z_0 uniquement au niveau de la cellule. Une bonne valeur de seuil est déterminée en calculant la valeur moyenne du signal $f_{TIRF}(\theta_i)$ sur l'ensemble de la première image de la série. Lorsqu'il y a lieu de calculer z_0 , on trace la courbe $\ln \frac{f_{TIRF}(\theta_i)}{\gamma(\theta_i)}$ en fonction de $(-\frac{1}{\kappa(\theta_i)})$ à l'aide des signaux de fluorescence enregistrés au niveau du même pixel. Les valeurs de $\gamma(\theta_i)$ et $\kappa(\theta_i)$ sont les mêmes pour tous les pixels et pour toutes les cellules. En effet, l'indice effectif d'une cellule en adhésion ne varie quasiment pas d'une cellule à l'autre, quel que soit le substrat. Les points expérimentaux sont ensuite ajustés en réalisant une régression linéaire afin d'en extraire la valeur de la distance z_0 . Le temps de calcul pour une image de 500×500 pixels est de l'ordre de 20 minutes.

5.5.3 Détermination de κ et γ

A Détermination de l'indice effectif d'une cellule en adhésion et de $\kappa(\theta_i)$

L'indice effectif du milieu correspond à l'indice perçu par l'onde évanescente d'une cellule en adhésion. Il s'avère que cette mesure est plus difficile à réaliser que dans le cas d'une vésicule. La

technique qui consiste à observer le signal dans le BFP de l'objectif, utilisée précédemment, n'est pas transposable aux cellules (paragraphe 4.4.2). En effet, le signal "hors focus" produit par l'ensemble de la cellule quand $\theta < \theta_c$, modifie le contraste observé dans le BFP, rendant impossible la localisation de θ_c . J'ai donc dû changer de stratégie pour mesurer l'angle critique et par conséquent n_{eff} . Une série d'images a été enregistrée à l'aide de la caméra CMOS, autour de la position présumée de l'angle critique. Le signal moyen de fluorescence $\langle f \rangle$ émis par la cellule est déterminé en réalisant un ROI (région d'intérêt), comme illustré sur les figures 5.5 A_1 et A_2 . $\langle f \rangle$ est ensuite tracé en fonction de l'angle d'incidence α (figures 5.5 B_1 et B_2). On distingue nettement deux comportements différents sur ces courbes : la première partie de la courbe, entre 0.464° - 0.468° , décroît plus rapidement que la deuxième partie, au-delà de 0.468° . Or, on sait que pour les angles supérieurs à l'angle critique (i.e. en régime évanescent), l'intensité de fluorescence décroît quasiment linéairement entre θ_c et 70° (figure 2.14 et 4.15). Sachant que pour $\theta \lesssim \theta_c$, le volume sondé par le faisceau laser est nettement plus important qu'en régime évanescent, il est tout à fait attendu d'enregistrer un signal moyen de fluorescence $\langle f \rangle$ plus grand quand $\theta < \theta_c$ que lorsque $\theta > \theta_c$. Les deux régimes observés sur la figure 5.5 correspondent donc à $\theta < \theta_c$ (droite bleue) et à $\theta > \theta_c$ (droite verte). L'intersection entre ces deux droites nous permet de déterminer l'angle critique et par conséquent l'indice effectif de la cellule (l'équation 4.12). En répétant ce type de mesure sur un grand nombre de cellules, nous avons obtenu que $\alpha_c \approx 0.468^\circ$, soit $\theta_c \approx 61.24^\circ$ et donc $n_{\text{eff}} = 1.341$ pour les cellules MDA-MB-231 et pour les cellules MCF7 n_{eff} varie avec la surface (tableau 5.3). Cette valeur est très proche de l'indice de l'eau (1.33), mais reste inférieure à l'indice du cytoplasme (1.37), ce qui suggère que la membrane plasmique est relativement loin de la surface, typiquement vers 100 nm [166]. Grâce à la valeur de n_{eff} , il est possible de calculer l'atténuation de l'onde évanescente $\kappa(\theta_i)$ (tableau 5.2). Pour le premier angle $\theta_1 = 63.59^\circ$, $\kappa_1 = 138$ nm. Pour le dernier $\theta_{10} = 67.2^\circ$, $\kappa_{10} = 89$ nm. On fait donc varier l'atténuation κ d'environ 50 nm entre la première image TIRF et la dernière.

TABLEAU 5.3 – Tableau récapitulatif des mesures de l'indice effectif n_{eff} ($n_{\text{eff}} = n_g \sin \theta_c$) sur les cellules MDA-MB 231 et MCF7. N correspond au nombre de cellules sur lesquelles les mesures ont été effectuées.

lignée cellulaire	substrat	α_c (degré)	θ_c (degré)	n_{eff}	N
MCF7	verre	0.468	61.24	1.341	3
	poly-L-lysine	0.466	60.92	1.333	2
	BSA	0.466	60.92	1.333	3
	β -caséine	0.468	61.24	1.341	3
	fibronectine	0.468	61.24	1.341	2
MDA-MB-231	poly-L-lysine	0.468	61.24	1.341	4
	BSA	0.468	61.24	1.341	5
	β -caséine	0.468	61.24	1.341	4
	fibronectine	0.468	61.24	1.341	4

B Facteur de correction de la puissance laser γ

Comme le montre l'équation 5.5, le signal de fluorescence doit être normalisé par le facteur de correction γ_i qui reflète les variations de l'excitation laser sur l'interface (figure 2.14). Pareillement à la microscopie nTIRF, nous avons fixé la polarisation laser en configuration "s". Afin de déterminer les valeurs de $\gamma(\theta_i)$, j'ai mesuré dans le BFP le signal produit par une monocouche de QDots pour chaque angle θ_i de la série du tableau 5.2. L'évolution de $\gamma(\theta_i)$ dans cet intervalle angulaire est donnée sur la figure 5.6 A pour l'interface verre/eau et 5.6 B pour l'interface verre/glycérol 22%. Puisque la normalisation par le signal en épi-fluorescence ($\theta_i=0$) n'est pas possible sur une cellule, nous allons normaliser $\gamma(\theta_i)$ par rapport à sa valeur en θ_1 , le premier angle de la série ($\theta_1=63.59^\circ$). J'ai choisi l'eau et le glycérol 22%, car l'indice effectif des cellules en adhésion est compris entre 1.333 (indice de l'eau) et 1.358 (indice du glycérol 22%).

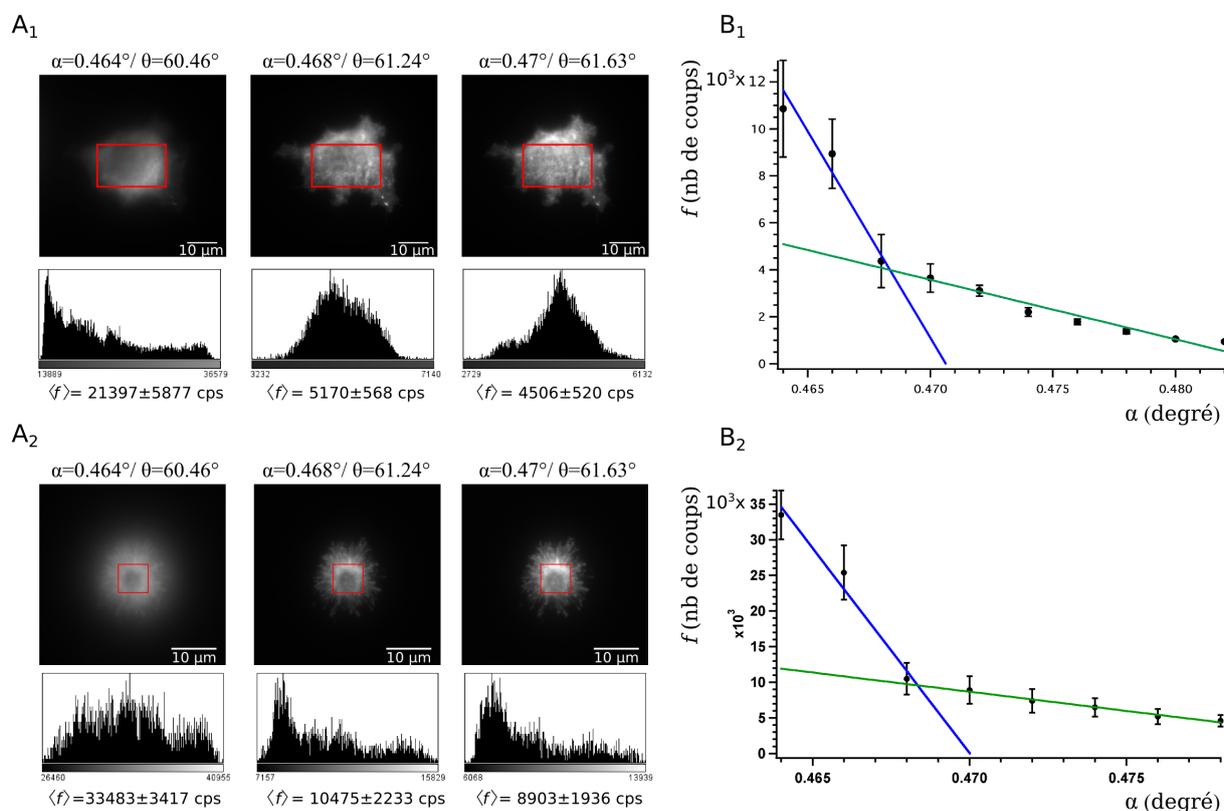


FIGURE 5.5 – Détermination de l'indice effectif d'une cellule. (A) Images de fluorescence et histogrammes du signal correspondant, évalués dans la région d'intérêt délimitée par le carré rouge. Le signal moyen est indiqué sous chaque histogramme. (A₁) Il s'agit d'une cellule MCF7 sur verre et (A₂) d'une cellule MDA-MB-231 sur BSA, dans un milieu de culture non fluorescent, à 37°C (ON=1.45 ; 60x, $\lambda=488$ nm, $P_{laser}=5$ W/cm² et $t_{acq}=50$ ms). (B₁) Evolution du signal moyen de fluorescence $\langle f \rangle$ avec α correspondant à la cellule MCF7 et (B₂) correspondant à la cellule MDA-MB-231.

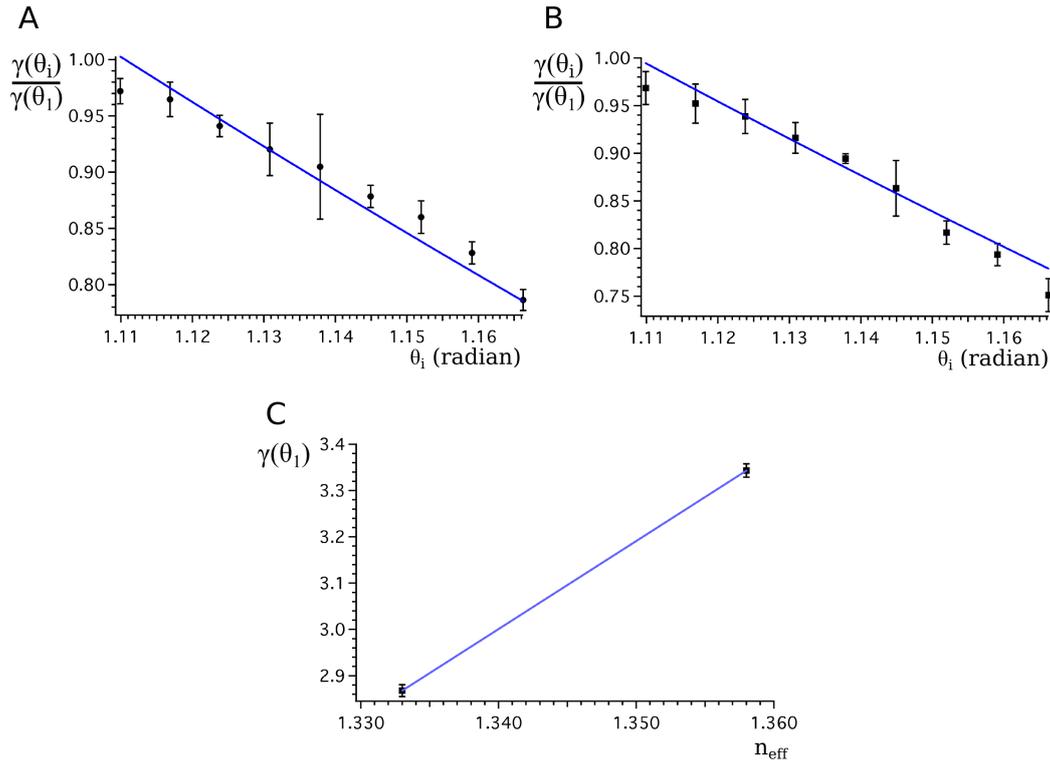


FIGURE 5.6 – (A) Evolution relative de $\gamma(\theta_i)$ en fonction de l'angle d'incidence θ_i pour l'interface verre/eau. (B) De même pour l'interface verre/glycéról 22%. Les points expérimentaux ont été ajustés avec l'équation 5.6. (C) Détermination de $\gamma(\theta=63.59^\circ)$ en fonction de l'indice du milieu d'observation.

Les points expérimentaux des figures 5.6 A et B ont été ajustés grâce à l'expression théorique de γ en polarisation "s" (équation 2.26), pour $\theta > \theta_c$:

$$\frac{\gamma(\theta_i)}{\gamma(\theta_1)} = (1 + n')^2 \frac{\cos^2 \theta_i}{1 - n'^2} \frac{1}{\gamma(\theta_1)} \quad (5.6)$$

où n' est égal à $n_{\text{glycéról}}/n_{\text{verre}}$ ou est $n_{\text{eau}}/n_{\text{verre}}$. Grâce à l'ajustement numérique, on obtient la valeur de $\gamma(\theta_1)$ qui vaut respectivement 2.87 ± 0.01 et 3.34 ± 0.01 pour les interfaces verre/eau et verre/glycéról 22 %. Pour trouver le facteur de correction $\gamma(\theta_1)$ correspondant à l'indice effectif des cellules ($n_c=1.341$), j'ai extrapolé linéairement le comportement de $\gamma(\theta_1)$ en fonction de n_{eff} obtenu pour l'eau et le glycéról (figure 5.6 C). Un tel comportement linéaire a déjà été observé (figure 4.16) : deux points suffisent pour déterminer la bonne valeur $\gamma(\theta_1)$ correspondant à l'indice effectif d'une cellule en adhésion. J'en ai déduis alors que $\gamma(\theta_1)=3.02$ pour $n_{\text{eff}}=1.341$. Cette valeur nous permet de calculer à l'aide de l'équation 5.6, les valeurs de $\gamma(\theta_i)$ dans le cas de cellules en adhésion. Ces valeurs sont données dans le tableau 5.4.

TABLEAU 5.4 – Récapitulatif des valeurs θ_i et $\gamma(\theta_i)$ utilisées pour les observations sur cellule.

θ_i (degré)	63.59	63.99	64.39	64.79	65.19	65.6	66	66.41	66.82	67.23
$\gamma(\theta_i)/\gamma(\theta_1)$	0.996	0.968	0.941	0.913	0.886	0.859	0.833	0.806	0.780	0.754

5.5.4 Vérification dans le cas où $z_0=0$

Afin de m'assurer de l'exactitude des différentes valeurs de $\gamma(\theta_i)$ et $\kappa(\theta_i)$, j'ai vérifié que pour une couche de QDots déposée à la surface d'une lamelle de verre, la technique VA-TIRF permet bien de retrouver $z_0=0$. J'ai ainsi testé la procédure de calcul pour l'interface verre/eau. J'ai obtenu que la valeur moyenne de z_0 est centrée autour d'une distance de 0 nm, avec un écart-type de 18 nm. Cette vérification importante m'a permis de confronter la procédure de calcul en microscopie VA-TIRF sur un cas réel, pour lequel on connaît la valeur de z_0 .

5.6 Adhésion cellulaire

Pour évaluer le degré d'adhésion des cellules, j'ai réalisé des cartographies des distances membrane/surface. L'objectif que nous nous sommes fixé est le même qu'en microscopie nTIRF, c'est-à-dire obtenir l'histogramme des distances $p(z_0)$ qui caractérise le comportement des cellules sur un substrat donné. Les grandeurs statistiques associées aux distributions des distances ont été décrites dans le paragraphe 4.6.1.

Dans ce paragraphe, je vais présenter les résultats que j'ai obtenus sur les deux lignées cellulaires suivantes : MDA-MB-231 et U-87 MG. Afin de les comparer avec ceux enregistrés sur les vésicules géantes, les cellules ont été déposées sur des surfaces recouvertes de poly-L-lysine et de β -caséine. Ces surfaces sont fréquemment utilisées dans les mesures d'adhésion usuelles, comme lors d'un test de rinçage. Ce test est destiné à étudier la spécificité du comportement adhésif des cellules [5]. Les substrats de poly-L-lysine et de β -caséine (ou d'albumine) jouent le rôle de surfaces référence pour quantifier l'adhésion. En effet, l'adhésion est maximale sur la poly-L-lysine et minimale sur la β -caséine ou l'albumine. J'ai également initié des études d'adhésion spécifique sur ces cellules. Afin d'assurer une reconnaissance spécifique, les cellules ont été mises en contact avec des surfaces recouvertes de fibronectine et de collagène de type IV. Toutes les observations ont été réalisées après une heure d'incubation à 37°C et 5% de CO₂. Quant aux mesures VA-TIRF, elles ont été effectuées à 37°C pendant une durée limitée à une heure.

5.6.1 Adhésion non spécifique

Des cellules MDA-MB 231 en suspension dans le milieu de culture non fluorescent ont été déposées sur des substrats fonctionnalisés avec des molécules connues pour interagir de façon non

spécifique avec les cellules. Sachant que la charge effective de la membrane cellulaire est négative, j'ai comparé le comportement des cellules sur des surfaces chargées positivement (poly-L-lysine) et négativement (β -caséine et BSA).

A Résultats expérimentaux

Un exemple typique de comportement d'une cellule MDA MB 231, incubée sur une surface recouverte de poly-L-lysine, est présenté sur la figure 5.7 (A_1-E_1). Les images en DIC, en épi-fluorescence et en TIRF donnent un aperçu de la morphologie cellulaire. Il apparaît que les cellules adoptent une forme inattendue, la membrane s'étire de façon à former un disque plat sur la surface, alors que les organites comme le noyau restent dans une partie globulaire centrale, loin de l'interface car invisible sur l'image TIRF. Etant donné que les prolongements membranaires sont très fins, le contour de la cellule se distingue difficilement sur l'image en DIC. J'ai alors souligné le contour cellulaire en rouge (figure 5.7 A_1). L'image en épi-fluorescence B_1 montre un signal conséquent provenant de la membrane supérieure compactée autour du noyau. L'image des distances z_0 obtenue en VA-TIRF permet d'apprécier l'étirement de la membrane sur le substrat (figure 5.7 D_1). On observe que certains prolongements membranaires sont en contact proche du substrat, c'est-à-dire à une distance $z_0 \lesssim 50$ nm (zones bleues foncées sur l'image). La partie centrale de la cellule semble être plus éloignée, atteignant les distances de ~ 150 nm. A l'aide de la distribution des distances $p(z_0)$, tracée sous la forme d'une densité de probabilité (figure 5.7 E_1), on peut conclure que la membrane plasmique se situe à une distance moyenne de $\langle p(z_0) \rangle = 121$ nm. Sur les substrats chargés négativement, l'étalement de la membrane est complètement différent. Les cellules sur un substrat de β -caséine ont une morphologie plutôt sphérique, comme le montre l'image DIC avec dans ce cas une petite zone d'adhésion, mise en évidence sur l'image TIRF (figures 5.7 A_2 et C_2). Sur l'image en épi-fluorescence (B_2) on observe là encore un halo lumineux très intense au centre, corrélé à la morphologie globulaire de la cellule. L'image TIRF met en exergue que la surface de contact avec le substrat est très petite (figure 5.7 C_2). L'image topographique obtenue en VA-TIRF montre quant à elle que l'étalement est très hétérogène et que la cellule développe des filopodes afin de pouvoir s'accrocher à la surface (figure 5.7 D_2). Au niveau des filopodes, la membrane est très proche de l'interface ($z_0 \lesssim 50$ nm). La distribution des distances $p(z_0)$ reflète l'hétérogénéité de l'étalement de la membrane. $p(z_0)$ est en effet très dissymétrique. Par conséquent, la moyenne des distances z_0 est différente du maximum de la distribution ($p(z_0)^{max} \approx 131$ nm et $\langle p(z_0) \rangle \approx 154$ nm, figure 5.7 E_2). L'adhésion des cellules MDA-MB 231 sur β -caséine, figure 5.7 (A_2-E_2), est représentative de ce que j'ai observé sur les surfaces recouvertes de BSA.

Pour mieux apprécier les différences de comportement cellulaire sur poly-L-lysine, BSA et β -caséine, les distributions $p(z_0)$ enregistrées sur plusieurs cellules ont été moyennées. Les distributions moyennes $P(z_0)$ ($P(z_0) = \frac{1}{N} \sum_i p_i(z_0)$) sont tracées sur la figure 5.8. Les distributions enregistrées sur la BSA et la β -caséine ont été ajustées par une somme de deux fonctions Gaussiennes. Les maximums

de ces deux profils Gaussiens sont donnés dans le tableau 5.5. Concernant la poly-L-lysine, $P(z_0)$ s'ajuste très bien avec une simple Gaussienne. Les valeurs moyennes des distances $\langle z_0 \rangle$ et leurs écart-types moyens $\langle \sigma_{p(z_0)} \rangle$ pour ces trois substrats sont données dans le tableau 5.5.

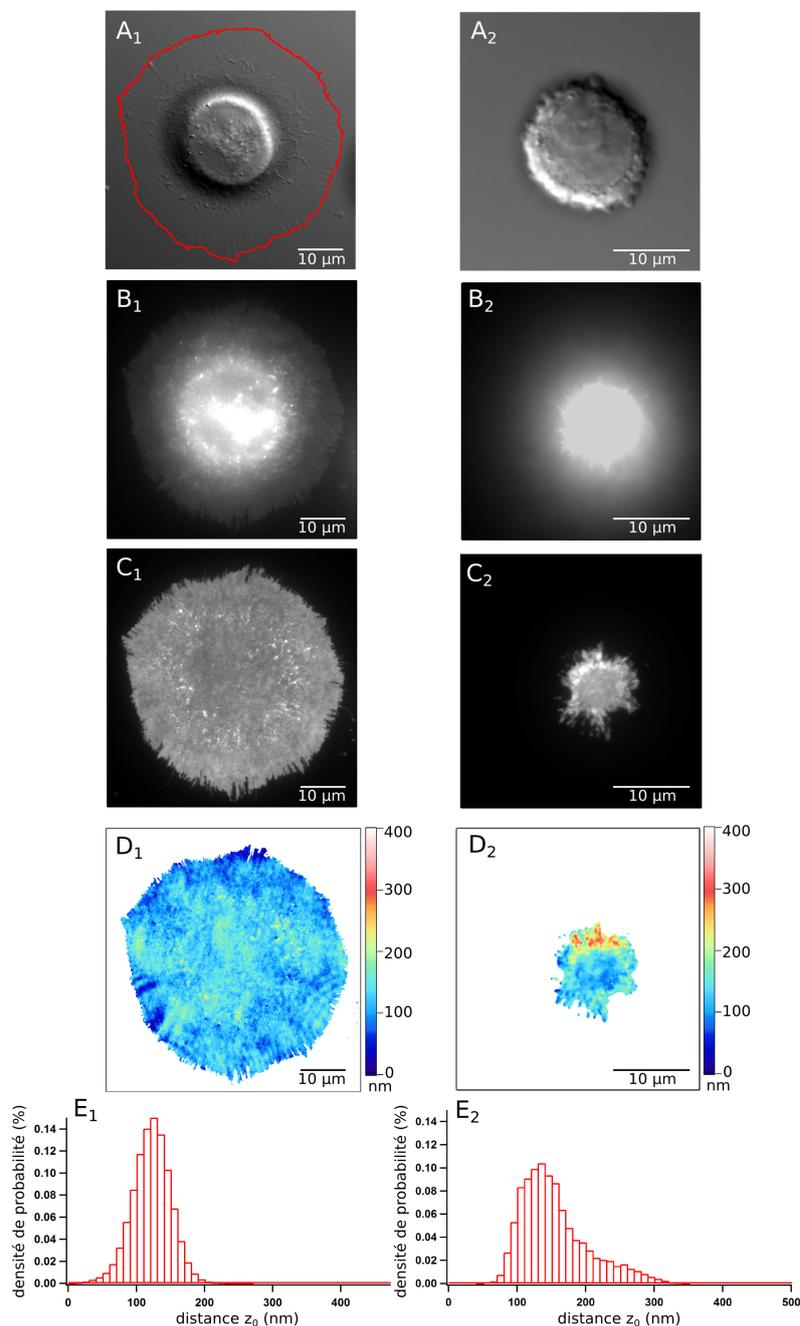


FIGURE 5.7 – Images de deux cellules MDA MB 231 en adhésion sur la poly-L-lysine (A_1 - D_1) et sur la β -cas eine (A_2 - D_2), après une heure d'incubation. (A_i) : images en DIC, (B_i) : en épi-fluorescence ($\theta=0^\circ$), (C_i) : en TIRF pour $\theta=63.59^\circ$ en polarisation "s". (D_i) : cartographie des distances z_0 et (E_i) : densités de probabilité $p(z_0)$ correspondant aux images D_i . Les images B_1 , B_2 , C_1 et C_2 ont été obtenues pour une puissance laser de 5 W/cm^2 et un temps d'acquisition de 100 ms.

TABLEAU 5.5 – Tableau récapitulatif des mesures d'adhésion sur les cellules U-87 MG et MDA-MB 231 en adhésion spécifique (AS) et non spécifique (ANS). $\langle z_0 \rangle$ représente la moyenne des valeurs moyennes $\langle p_i(z_0) \rangle$, $\sigma_{\langle p_i(z_0) \rangle}$ est l'écart-type de ces moyennes. $\langle \sigma_{p_i(z_0)} \rangle$ et $\sigma_{\sigma_{p_i(z_0)}}$ sont respectivement la moyenne et l'écart-type des rugosités dynamiques $\sigma_{p_i(z_0)}$ mesurées pour chaque cellule. $P(z_0)^{max}$ le (ou les) maximum(s) de la (des) Gaussienne(s) qui permet(tent) d'ajuster le profil de la distribution. N correspond au nombre de cellules sur lesquelles les mesures ont été effectuées.

lignée cellulaire	substrat	AS	ANS	$\langle z_0 \rangle$ (nm)	$\sigma_{\langle p_i(z_0) \rangle}$ (nm)	$\langle \sigma_{p_i(z_0)} \rangle$ (nm)	$\sigma_{\sigma_{p_i(z_0)}}$ (nm)	$P(z_0)^{max}$ (nm)	N
U-87 MG	verre		x	159	23	45	10	151 ; 185	14
	fibronectine	x		224	23	49	7	161 ; 205 ; 240	5
MDA-MB 231	poly-L-lysine		x	112	6	29	2	105	9
	BSA		x	138	13	48	10	120 ; 176	9
	β -caséine		x	157	23	49	7	138 ; 203	11
	fibronectine	x		154	9	40	8	146	10
	collagène de type IV	x		160	23	41	12	115 ; 164 ; 193	5

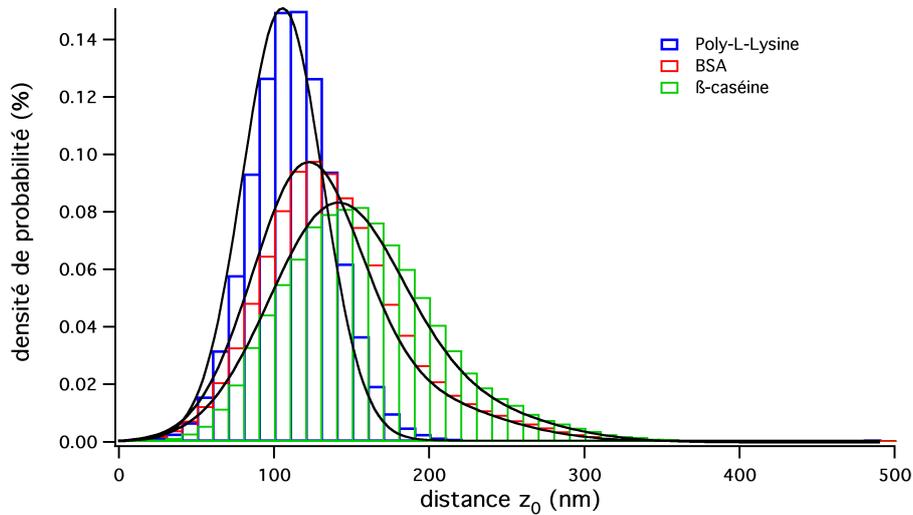


FIGURE 5.8 – Distributions des distances z_0 ($P(z_0)$) moyennées sur plusieurs cellules MDA-MB 231 en adhésion sur la poly-L-lysine (bleu), BSA (rouge) et la β -caséine (vert). Ces histogrammes ont été ajustés à l'aide de plusieurs fonctions Gaussiennes (courbes noires : résultantes des fits).

B Discussion

Les résultats obtenus sur BSA, β -caséine et poly-L-lysine, nous ont permis d'évaluer le processus d'adhésion cellulaire lorsqu'il est guidé par des interactions électrostatiques. La charge effective

négative de la membrane cellulaire fait qu'une cellule est fortement attirée par une surface recouverte de poly-L-lysine (chargée positivement). Sur ces surfaces, toutes les cellules ressemblent à un "œuf au plat" et aucune d'elles, après une heure d'observation sous microscope, n'a initié un comportement migratoire. Cette morphologie où l'étalement est uniforme ne semble pas propice à la migration. Ces cellules ainsi attirées vers la surface, par l'intermédiaire d'une force d'attraction électrostatique (mise en évidence au chapitre 4), pourraient avoir de grandes difficultés à migrer sur ce substrat. Les surfaces chargées négativement, comme celles recouvertes de β -caséine ou de BSA, induisent une force de répulsion qui semble inhiber l'étalement et l'attachement de la cellule. En effet, les figures 5.7 C_2 et D_2 montrent que les cellules sont peu étalées sur le support et que la distance moyenne membrane/support est plus grande que sur la poly-L-lysine (tableau 5.5). La surface d'adhésion sur BSA et β -caséine ne représente que $\approx 17\%$ de la surface d'adhésion que développe une cellule sur la poly-L-lysine. Sur ces surfaces chargées négativement, les cellules produisent également de nombreux filopodes pour adhérer. Ces résultats peuvent expliquer le faible taux d'adhésion couramment observé sur BSA ou β -caséine (proche de 0%), lors d'un test de rinçage. En effet, il paraît plus simple de décrocher des cellules qui développent une faible surface de contact. De plus, la figure 5.8 montre que le comportement adhésif des cellules sur les deux substrats chargés négativement est différent. Un net décalage de la distribution $P(z_0)$ sur β -caséine vers les distances plus élevées est mis en évidence. Ce phénomène est peut-être lié à une différence de charge effective de l'interface comme je l'ai observé entre les surfaces SiOH et celles recouvertes de β -caséine dans le cas des vésicules géantes. Une mesure du potentiel ζ me permettrait de confirmer (ou infirmer) cette hypothèse.

Lorsqu'on analyse plus en détails la distribution des distances $P(z_0)$, on remarque l'existence de deux sous-populations sur les substrats chargés négativement ($P(z_0)$ a été ajustée à l'aide de deux Gaussiennes). Les positions $P(z_0)^{max}$ de ces deux sous-populations sont données dans le tableau 5.5. A l'opposé, une seule Gaussienne est utilisée pour ajuster la distribution enregistrée sur la poly-L-lysine. Cette unique Gaussienne reflète l'homogénéité de la topographie membranaire sur cette surface. Concernant la β -caséine ou la BSA, nous pouvons imaginer que la première population qui correspond aux distances les plus courtes, coïncide avec les filopodes par lesquels les cellules s'ancrent à la surface. La deuxième population correspondrait quant à elle à la membrane autour des filopodes.

5.6.2 Adhésion spécifique

Afin de mimer le microenvironnement cellulaire, j'ai étudié l'adhésion de cellules U-87 MG et MDA-MB 231 sur des surfaces recouvertes de fibronectine et de collagène de type IV. L'adhésion entre les cellules et les surfaces devient alors spécifique car elle est régulée par les interactions entre les protéines de la matrice et les récepteurs membranaires associés (par exemple les intégrines).

A Résultats expérimentaux

La première étude que j'ai réalisée consistait à comparer les conséquences d'une adhésion spécifique sur $P(z_0)$ avec une adhésion non spécifique. J'ai effectué cette expérience à l'aide de cellules U-87 MG déposées d'une part sur une lamelle recouverte de fibronectine, d'autre part sur une simple lamelle de verre. Deux exemples de comportement d'adhésion sont présentés sur la figure 5.9. On remarque que les cellules adhérentes sur la surface de verre ne développent pas de forme migratoire (figures 5.9 B_1 , C_1), comme observé précédemment sur la BSA ou la poly-L-lysine. Au contraire, la forme des cellules déposées sur la surface fonctionnalisée avec de la fibronectine suggère que les cellules sont en cours de migration (figures 5.9 A_2 à C_2). On distingue clairement un front migratoire avec de nombreux filopodes à l'avant ainsi qu'un arrière train en cours de rétractation (figures 5.9 B_2 , C_2). La présence du noyau à l'avant de la cellule, visible sur l'image en épi-fluorescence (le halo lumineux sur la figure 5.9 A_2), sous-entend que la cellule se trouve dans la phase terminale de la migration : le noyau vient d'être transloqué et la queue est déjà bien rétractée (voir la figure 1.3). Les images TIRF (figures 5.9 B_1 et B_2) rendent compte de l'étalement relativement important de la membrane sur les deux surfaces. La cartographie des distances z_0 sur la figure 5.9 C_1 , montre que la cellule en adhésion sur du verre développe des lamellipodes dans différentes directions correspondant aux zones bleues foncées sur l'image. L'histogramme des distances $p(z_0)$, établi à partir de la cartographie C_1 , montre que la cellule se situe en moyenne à $\langle p(z_0) \rangle \sim 166$ nm (figure 5.9 D_1). Concernant la cellule en adhésion sur la fibronectine, la distance moyenne est plus grande, $\langle p(z_0) \rangle \sim 223$ nm (figure 5.9 D_2). Les distributions moyennes sur verre et sur fibronectine sont tracées sur la figure 5.10. Les probabilités de densité $P(z_0)$ ont été moyennées à partir d'enregistrements effectués sur 5 cellules sur fibronectine et 12 cellules sur verre. Dans les deux cas, les distributions moyennes ont été ajustées avec une somme de plusieurs Gaussiennes (deux pour le verre et trois pour la fibronectine). Les différents paramètres statistiques extraits de ces distributions sont donnés dans le tableau 5.5.

Dans une deuxième étude, j'ai comparé l'adhésion de cellules MDA-MB 231 sur la fibronectine et sur le collagène de type IV. Après une heure d'incubation, les cellules présentent toutes un profil migratoire, que la surface soit recouverte de fibronectine ou de collagène (figure 5.11). Sur les images topographiques des distances z_0 (figures 5.11 C_1 et C_2), on remarque l'apparition, à de multiples endroits, de zones où la membrane plasmique est très proche de la surface, c'est-à-dire $z_0 \lesssim 50$ nm (zones bleues foncées sur les images). Sur l'image C_1 , ces zones sont majoritairement situées sur la queue de rétractation de la cellule (en haut à droite de l'image), alors que sur l'image C_2 , ces zones de contact apparaissent majoritairement sur le front de la migration, au niveau d'un large lamellipode déployé par la cellule (en haut à gauche de l'image). Ces zones particulières, où $z_0 \lesssim 50$ nm, correspondent vraisemblablement à des points d'adhésion focaux. En effet, ces zones apparaissent aux endroits présumés où les contacts focaux doivent avoir lieu : sur un lamellipode ou sur la queue de rétractation. C'est au niveau des contacts focaux que la membrane plasmique est la plus proche de la surface. De nombreux travaux l'ont déjà révélé. Plusieurs de ces travaux ont même

déterminé que la membrane se situe typiquement entre 20 et 50 nm du support, au niveau d'un point d'adhésion focal [101, 102, 28]. Une manière efficace de corréler nos observations avec la présence effective de contacts focaux serait de réaliser un double marquage fluorescent de la membrane, comme je l'ai fait, et d'une protéine impliquée dans la formation des adh somes, par exemple une intégrine. L'idée serait d'obtenir des lignées stables qui exprimeraient les protéines de fusion avec un marqueur fluorescent. Les protéines fluorescentes de la famille des *Green Fluorescent Proteins* comme la GFP, ou la molécule mCherry seraient bien adaptées pour ce type d'étude.

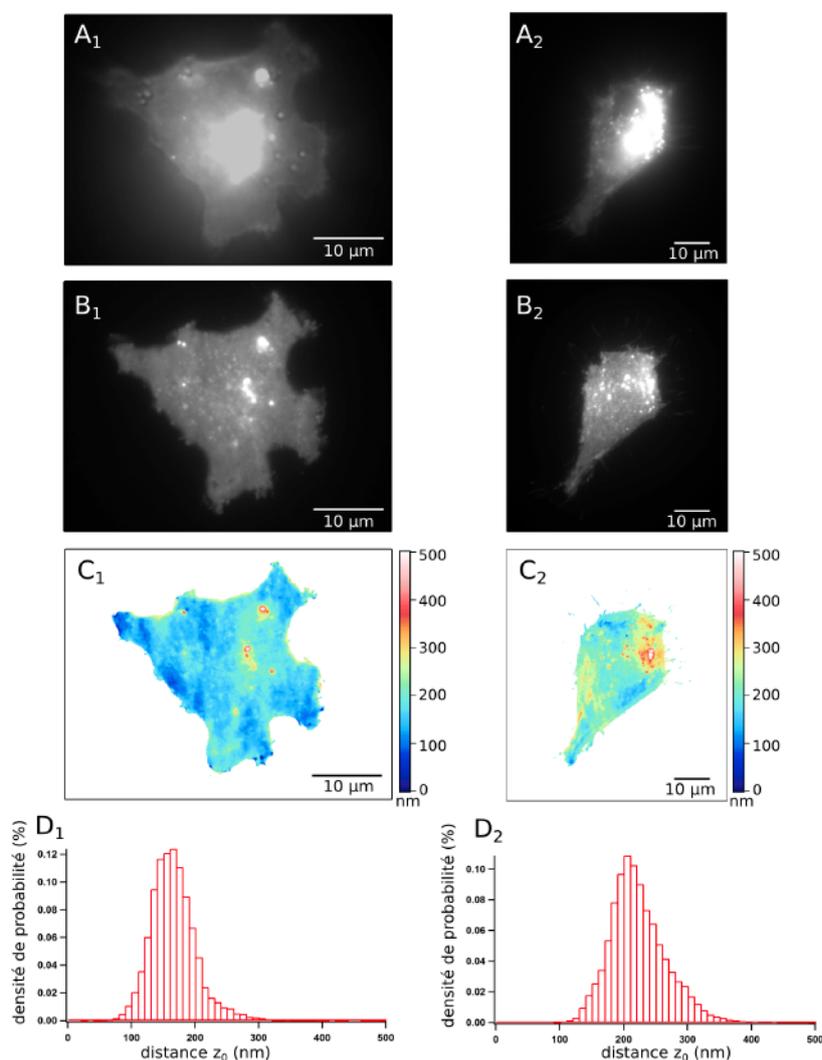


FIGURE 5.9 – Images d'une cellule U-87 MG en adhésion sur du verre (A_1 - D_1) et sur la fibronectine (A_2 - D_2), après une heure d'incubation. (A_i) : Images en épi-fluorescence ($\theta=0^\circ$), (B_i) : en TIRF pour $\theta=63.59^\circ$ en polarisation "s", (C_i) : cartographie des distances membrane/substrat et (D_i) : histogrammes des distances $p(z_0)$ correspondant aux images C_i . Les images A_1 , A_2 , B_1 et B_2 ont été obtenues avec une puissance laser de 5 W/cm^2 et un temps d'acquisition de 100 ms.

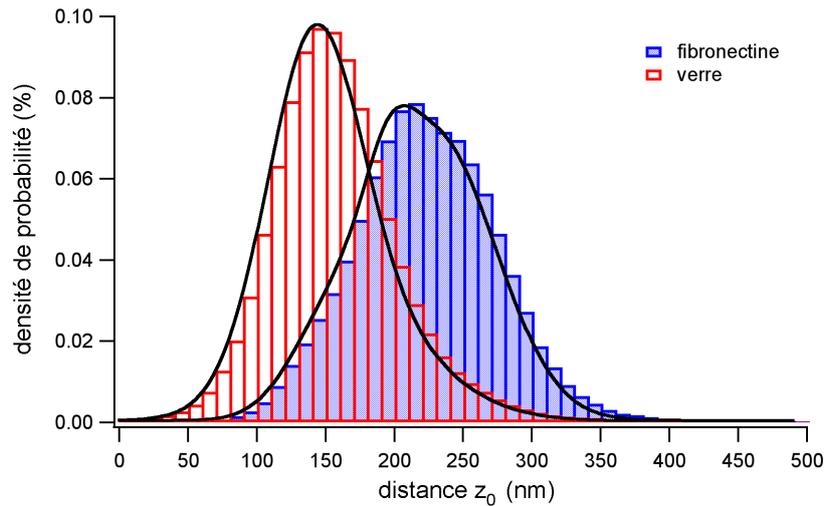


FIGURE 5.10 – Distributions des distances membrane/substrat $P(z_0)$ moyennées sur plusieurs cellules U-87 MG en adhésion sur du verre (rouge) et sur de la fibronectine (bleu). Les histogrammes ont été ajustés à l'aide de deux fonctions Gaussiennes (courbes noires : résultantes des fits).

Les deux images VA-TIRF de la figure 5.11 reflètent l'état d'avancement d'une cellule au cours de son processus de migration. Sur l'image B_1 , la cellule se trouve plutôt dans un stade final du processus migratoire décrit sur la figure 1.3; la translocation du noyau a déjà eu lieu. Sur l'image B_2 , c'est l'inverse : le processus migratoire est en train de s'engager; la cellule vient de déployer un large lamellipode au niveau duquel elle est en train de s'ancrer à la surface (la translocation n'a pas encore eu lieu). Les histogrammes $p_i(z_0)$ correspondant aux images des distances sont tracés sur les figures 5.11 D_1 et D_2 . La distance moyenne $\langle p_i(z_0) \rangle$ entre la membrane et la surface est de 156 nm sur la fibronectine (figure 5.11 D_1) et 173 nm sur le collagène de type IV (figure 5.11 D_2). Afin de comparer le comportement des cellules MDA-MB 231 sur fibronectine et sur collagène de type IV, j'ai là encore moyenné les distributions $P(z_0)$ enregistrées sur 5 à 10 cellules différentes. Les deux distributions moyennes sont tracées sur la figure 5.12. Elles ont été ajustées à l'aide d'une seule Gaussienne, en ce qui concerne la fibronectine, et par la somme de trois Gaussiennes pour le collagène de type IV. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 5.5.

B Discussion

Pour interpréter ces résultats expérimentaux, je me suis focalisée sur l'analyse des distributions moyennes des distances membrane/substrat. Grâce à ces distributions, il est possible de quantifier l'adhésion en termes d'interactions globales entre un type cellulaire et une surface. Je suis consciente que le nombre de cellules étudiées n'est pas suffisant pour obtenir un comportement représentatif d'une lignée cellulaire. Mes résultats mettent néanmoins en avant l'intérêt de la microscopie VA-TIRF en ce qui concerne l'étude de l'adhésion cellulaire. Par exemple, j'ai observé un comportement

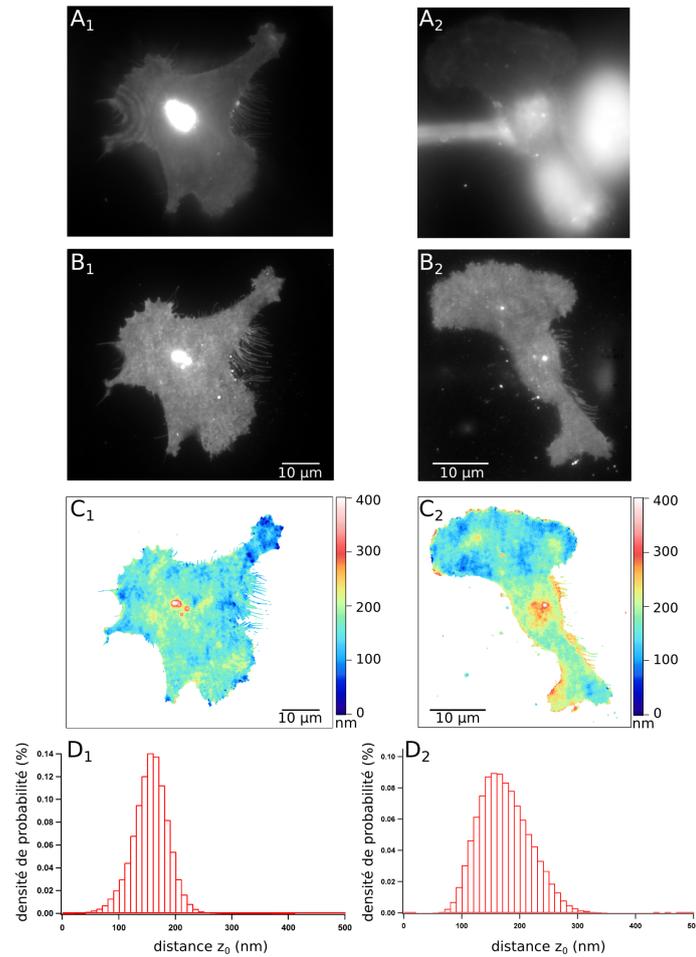


FIGURE 5.11 – Une cellule MDA MB 231 en adhésion sur la fibronectine (A_1 - D_1) et sur le collagène de type IV (A_2 - D_2), après une heure d'incubation. (A_i) : images en épifluorescence ($\theta=0^\circ$), (B_i) : images TIRF pour $\theta=63.59^\circ$ en polarisation "s", (C_i) : cartographie des distances z_0 et (D_i) : histogrammes des distances $p_i(z_0)$ correspondantes. Les images A_1 , A_2 ont été obtenues avec une puissance laser de 5 W/cm^2 et un temps d'acquisition de 100 ms.

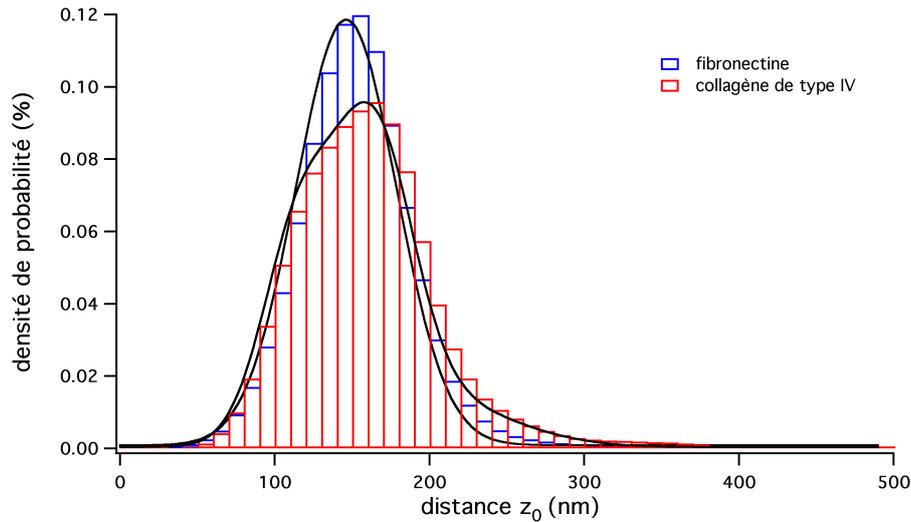


FIGURE 5.12 – Distributions moyennes des distances membrane/substrat ($P(z_0)$) pour des cellules MDA-MB 231 en adhésion sur la fibronectine (bleu) et sur le collagène de type IV (rouge). La courbe noire représente le résultat de l'ajustement réalisé à l'aide d'une ou plusieurs Gaussienne(s).

adhésif inattendu des cellules sur fibronectine et sur collagène : les valeurs moyennes des distances membrane/substrat ($\langle z_0 \rangle$) montrent qu'en adhésion spécifique la membrane se trouve en moyenne plus loin du support qu'en adhésion non spécifique. Par exemple, pour les cellules MDA-MB 231, $\langle z_0 \rangle \sim 112$ nm sur la poly-L-lysine et $\langle z_0 \rangle \sim 160$ nm sur le collagène (tableau 5.5). Les cellules U-87 MG sont connues pour exprimer les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3/\beta_5$ qui reconnaissent spécifiquement la fibronectine [5]. On distingue une nette différence sur les distributions des distances $P(z_0)$ entre ces cellules sur verre et sur fibronectine (figure 5.10). Sur la fibronectine, la membrane est située en moyenne 65 nm plus loin de la surface que sur du verre (tableau 5.5). Nous pouvons alors supposer que cette différence de hauteur reflète l'adaptation du comportement migratoire de la cellule par rapport au substrat. En effet, il est envisageable que les cellules en adhésion spécifique, c'est-à-dire qui développent des contacts d'adhésion focaux avec le substrat, aient tendance à organiser leur cytosquelette de façon à maintenir la membrane relativement loin du substrat pour migrer rapidement. En effet, la lignée U-87 MG (tout comme MDA-MB 231) est bien connue pour son comportement hautement invasif. Cette hypothèse s'appuie sur la morphologie migratoire des cellules observée sur les substrats recouverts de protéines matricielles. Sur la fibronectine, comme sur le collagène de type IV, les cellules MDA-MB 231 ont tendance à développer rapidement (après une heure d'incubation) une morphologie migratoire de type "tear drop", tout comme les cellules U-87 MG. Ce résultat n'est pas surprenant ; cette lignée est connue pour exprimer, elle aussi, des récepteurs capables de reconnaître les deux types de protéines matricielles : les intégrines $\alpha_v\beta_1$ reconnaissent la fibronectine et les intégrines $\alpha_2\beta_1$ reconnaissent quant à elles le collagène de type IV [90]. C'est peut-être pour cette raison que les distributions des distances $P(z_0)$ sont très similaires entre le collagène et la fibronectine (figure 5.12).

5.7 Simulations Monte Carlo

Comme dans le chapitre 4, nous avons souhaité évaluer l'impact des différents paramètres expérimentaux sur l'erreur de calcul de z_0 , à l'aide de simulations Monte Carlo.

5.7.1 Simulation du signal de fluorescence

Comme je l'ai expliqué dans le paragraphe 4.7.1, le signal de fluorescence enregistré en chaque pixel (x_d, y_d) fluctue rapidement au cours du temps. Cette variation du signal est induite par la diffusion de la sonde fluorescente (la DiO) dans la membrane plasmique. L'échelle de temps caractéristique de ces fluctuations d'intensité est la ms (figure 4.25). Afin de simuler une mesure en VA-TIRF, le signal de fluorescence pour un pixel quelconque a été reproduit numériquement suivant la procédure décrite dans le paragraphe 4.7.1. Cette procédure se base sur un tirage au sort, à chaque itération, d'une valeur de fluorescence suivant une loi de probabilité normale. Chaque itération correspond à un temps de diffusion typique de 0.5 à 2 ms [58]. A partir d'une valeur théorique z_0^{th} , on simule les signaux de fluorescence correspondant à la série d'angles d'incidence utilisés dans les expériences (figures 5.13 A₁-A₁₀). On calcule ensuite les signaux totaux $f_{TIRF}(\theta_i)$ intégrés pour les 10 séries d'itérations. Les paramètres $\gamma(\theta_i)$ et $\kappa(\theta_i)$ utilisés dans les simulations sont ceux obtenus expérimentalement (tableaux 5.2 et 5.3). On trace alors $\ln(f_{TIRF}(\theta_i)/\gamma(\theta_i))$ en fonction de $-1/\kappa(\theta_i)$, comme sur la figure 5.13 B. Au final, les points sont ajustés avec l'équation 5.5 et on obtient une valeur simulée de z_0 . La précision du calcul de z_0 est donnée par $\Delta = \frac{|z_0 - z_0^{th}|}{z_0^{th}}$ et l'erreur absolue Δz_0 sur la mesure de z_0 correspond à l'écart-type enregistré sur un ensemble de 10^4 simulations.

5.7.2 Influence du nombre d'itérations et de σ_F

Comme pour la microscopie nTIRF, j'ai voulu évaluer les impacts du temps d'acquisition et des fluctuations du signal de fluorescence (donné par $\sum = \frac{\sigma_F}{\langle F(t) \rangle}$), sur la précision de la mesure. Plusieurs séries de simulations ont été réalisées, en faisant varier le nombre d'itérations de 3 à 1000, ainsi que \sum entre 20 et 50% (z_0^{th} est fixé à 100 nm et I_0 à 10 coups /ms). La figure 5.14 A donne l'évolution de l'erreur relative Δ sur la mesure du z_0 en fonction du nombre d'itérations et de \sum . Comme en microscopie nTIRF, ces simulations montrent que l'erreur Δ augmente avec les fluctuations relatives du signal \sum , mais diminue avec le nombre d'itérations. La concentration de DiO utilisée pour le marquage de la membrane est extrêmement critique dans nos expériences. Si cette concentration est trop élevée, les cellules perdent leur comportement normal : elles ne migrent pas, voire elle désadhèrent rapidement lorsqu'on les excite avec le faisceau laser. De ce fait, j'ai faiblement marqué les cellules. Les fluctuations du signal de fluorescence sont alors importantes à l'échelle de la ms pour un pixel. Elles sont typiquement de l'ordre de 50% sur les cellules. Sachant qu'une itération correspond au temps que met une sonde fluorescente pour diffuser à travers la taille effective d'un pixel (soit ~ 100 nm), 100 itérations correspondent à un temps d'acquisition de 50 à 200 ms. Or,

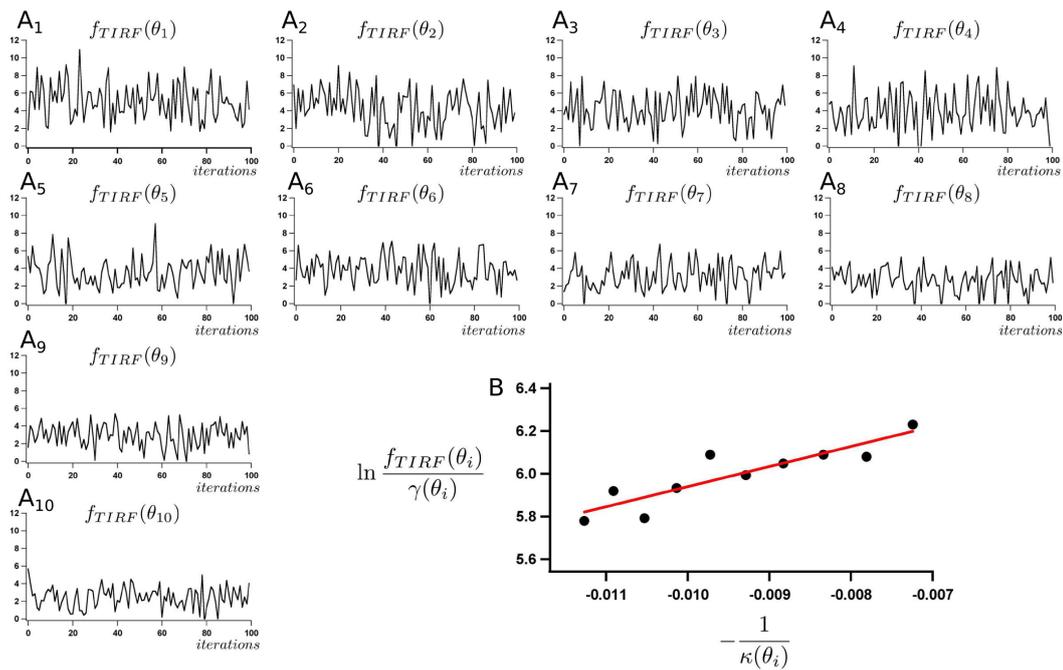


FIGURE 5.13 – (A₁-A₁₀) : Simulation des signaux de fluorescence correspondant aux dix angles de la série donnée dans le tableau 5.2. Les paramètres de la simulation sont $I_0=10$ coups/ms, $\Sigma=50\%$, $z_0^{th}=100$ nm et le nombre d'itérations est fixé à 100. (B) Evolution de $\ln(f_{TIRF}(\theta_i)/\gamma(\theta_i))$ en fonction de $-1/\kappa(\theta_i)$. Les valeurs de $\kappa(\theta_i)$ et $\gamma(\theta_i)$ sont celles données dans les tableaux 5.2 et 5.4. Les points ont été ajustés à l'aide de l'équation 5.5 : on obtient alors $z_0=93.7$ nm.

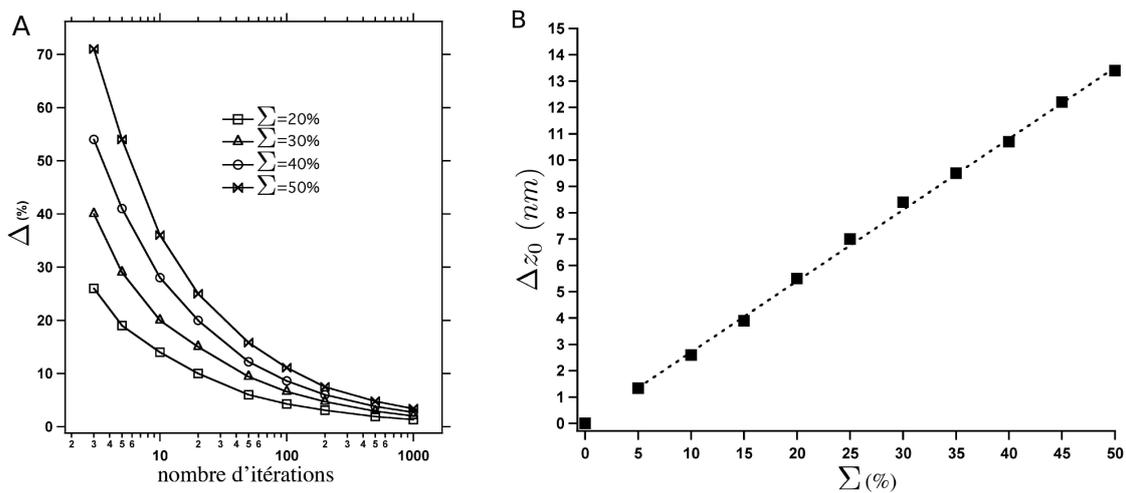


FIGURE 5.14 – (A) Evolution de l'erreur Δ sur le calcul de z_0 en fonction de Σ et du nombre d'itérations. (B) Evolution de l'erreur absolue Δz_0 en fonction de Σ .

toutes les expériences VA-TIRF que j'ai présentées ont été réalisées avec un temps d'acquisition fixe de 100 ms. Nous pouvons remarquer sur la figure 5.14 A, que Δ est typiquement de 10% pour 100 itérations, ce qui est tout à fait acceptable. Augmenter le temps d'acquisition à 200 ou 300 ms nous permettrait de diminuer d'un facteur 2 l'erreur ; or nous avons constaté qu'à partir de 200 ms de temps d'acquisition, les effets du photoblanchiment commençaient à apparaître.

5.7.3 Erreur absolue Δz_0

Il est également possible d'évaluer l'erreur absolue Δz_0 à l'aide de nos simulations Monte Carlo. Tout comme en microscopie nTIRF, j'ai vérifié que Δz_0 ne variait pas avec la position z_0^{th} de la membrane, ce qui signifie que l'incertitude sur le calcul de Δz_0 est indépendante de la position axiale de la membrane. De plus, j'ai calculé la variation de Δz_0 en fonction de Σ (figure 5.14 B). Pour ce calcul $I_0=10$ cps/ms, z_0^{th} a été fixé à 100 nm et le nombre d'itérations à 100. Comme en microscopie nTIRF, on peut constater que l'erreur Δz_0 évolue linéairement en fonction des fluctuations relatives Σ . Cette simulation révèle que l'erreur Δz_0 induite par les fluctuations du signal de fluorescence en VA-TIRF est plus importante qu'en nTIRF. Pour $\Sigma=50\%$, l'erreur absolue est d'environ 14 nm. Néanmoins, ce résultat ne signifie pas que l'erreur Δz_0 est plus grande en VA-TIRF qu'en nTIRF. En effet, il n'y a pas de facteur de correction du bruit de fond (β) en VA-TIRF, et l'erreur sur les termes $\gamma(\theta_i)$ se trouve fortement atténuée par la procédure qui consiste à réaliser une régression linéaire sur les dix valeurs de $f_{TIRF}(\theta_i)$. Par conséquent, la façon la plus simple d'évaluer l'erreur absolue Δz_0 sur la mesure de la distance membrane/substrat, est d'extraire à partir des régressions linéaires effectuées en chaque pixel de l'image, la valeur de l'incertitude chiffrée par le logiciel. La méthode utilisée pour l'ajustement linéaire est la méthode des "moindres carrés". Cette dernière permet d'obtenir une très bonne estimation de l'erreur absolue sur le coefficient directeur de la droite (z_0). A partir de nos résultats expérimentaux, il est possible de représenter en plus de l'image des distances z_0 , une autre image qui donne en chaque pixel l'erreur absolue Δz_0 . La figure 5.15 A₂ donne un exemple de ce type de représentation. L'histogramme des valeurs de Δz_0 permet d'affirmer que l'erreur sur le calcul de z_0 n'excède pas 40 nm et qu'en moyenne elle vaut ≈ 17 nm (figure 5.15 B₂). Si on reproduit cette analyse sur plusieurs cellules, on peut chiffrer l'erreur moyenne $\langle \Delta z_0 \rangle$ à environ 16 nm, ce qui est très proche de la valeur estimée à l'aide des simulations Monte Carlo, lorsqu'on ne considère que l'influence des fluctuations de fluorescence. En d'autres termes, la résolution axiale en VA-TIRF est majoritairement corrélée aux fluctuations instantanées du signal de fluorescence.

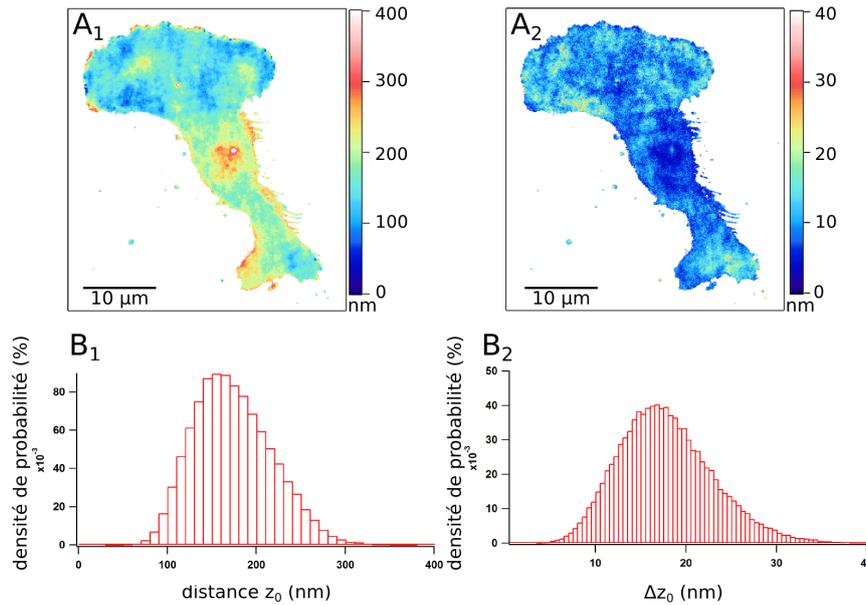


FIGURE 5.15 – Cellules MDA MB 231 en adhésion sur le collagène de type IV. (A_1) : cartographie des distances z_0 et (B_1) : histogramme des distances z_0 ($p(z_0)$). (A_2) : image de l'erreur absolue Δz_0 extraite des ajustements en chaque pixel et (B_2) : histogramme des erreurs Δz_0 .

5.8 Conclusion

J'ai mis en place un banc expérimental qui permet de faire de la microscopie TIRF à angle variable (VA-TIRF). Cette technique consiste à enregistrer une série d'images de fluorescence à différents angles d'incidence, tous supérieurs à l'angle critique. En marquant la membrane plasmique des cellules vivantes avec la DiO, j'ai montré qu'il était possible, à partir de la série d'images, de cartographier avec une très grande précision la distance qui sépare la membrane du support. La résolution axiale de notre dispositif est typiquement de ≈ 15 nm. Grâce à la microscopie VA-TIRF, nous avons pu mettre en évidence le comportement adhésif de deux types cellulaires différents : lorsque l'adhésion est spécifique (à l'aide de substrats recouverts de protéines de la MEC) et non spécifique (lorsque l'adhésion est gouvernée par les interactions électrostatiques).

Les études d'adhésion non spécifique sur poly-L-lysine d'une part, et BSA ou β -caséine d'autre part, ont mis en évidence que la distance moyenne $\langle z_0 \rangle$ est directement corrélée aux interactions électrostatiques entre la membrane et la surface, comme dans le cas des vésicules (chapitre 4). L'étalement membranaire conséquent des cellules sur la poly-L-lysine confirme d'ailleurs l'existence d'une force d'attraction importante sur cette surface (figure 5.7 A_1 - A_3). L'impact des forces d'attraction ou de répulsion électrostatique sur la distance $\langle z_0 \rangle$ est néanmoins beaucoup moins prononcé sur les cellules que dans le cas des vésicules. Dans le cas des cellules, j'ai observé que la position moyenne de la membrane est repoussée de 35 nm sur une surface recouverte de β -caséine par rapport à la

poly-L-lysine. Dans le cas des vésicules, ce décalage est de 265 nm. L'origine de cette différence de comportement entre les cellules et les vésicules s'explique par le fait que la membrane des cellules ne peut pas être considérée comme un simple système passif : son organisation est finement contrôlée par le cytosquelette de la cellule. Même si l'impact du cytosquelette est difficile à estimer, il est raisonnable de penser qu'une cellule adhérente crée, par l'intermédiaire de son cytosquelette, une force de contre-réaction pour réguler son adhésion [14]. De plus, à ce stade des expériences, il est difficile d'expliquer la différence de distance moyenne $\langle z_0 \rangle$ enregistrée sur BSA et β -caséine. Il est tout aussi difficile d'expliquer la topographie très hétérogène de la membrane sur ces surfaces (figure 5.7 D_2). Cette hétérogénéité pourrait signifier que les cellules seraient capables de déplacer, via les forces qu'elles exercent sur le substrat, les molécules liées à la surface de manière non covalente (comme c'est le cas avec la BSA et la β -caséine). Afin de confirmer cette hypothèse, il serait judicieux d'étudier l'adhésion cellulaire de façon dynamique. Les étapes très précoces de l'adhésion pourraient nous aider à comprendre ce phénomène. Il suffirait pour cela d'enregistrer des images toutes les 10 minutes durant la première heure d'incubation. D'ailleurs, un suivi dynamique du processus d'adhésion pourrait être réalisé sur tous les types de surface. Ces résultats permettraient de décrire l'adaptation du comportement adhésif des cellules sur les différents substrats.

En ce qui concerne l'adhésion spécifique, j'ai étudié le comportement des cellules sur des surfaces recouvertes de fibronectine et de collagène de type IV. Le comportement est le même pour les cellules U-87 MG et MDA-MB 231 : la distance membrane/substrat est en moyenne plus grande lorsque l'adhésion est spécifique, en comparaison avec une adhésion non spécifique. Par exemple, $\langle z_0 \rangle = 224$ nm sur la fibronectine pour les U-87 MG, alors que $\langle z_0 \rangle = 159$ nm sur le verre. De même, $\langle z_0 \rangle = 154$ nm sur la fibronectine et 160 nm sur le collagène pour les cellules MDA-MB 231, alors que $\langle z_0 \rangle = 112$ nm sur la poly-L-lysine. Sur les surfaces recouvertes de BSA et β -caséine, les cellules subissent une force de répulsion, d'origine électrostatique, relativement importante. D'ailleurs, sur ces surfaces, l'étalement membranaire est très faible (figure 5.7 C_2). Par conséquent, on ne peut pas affirmer que les cellules soient réellement adhérentes sur ces surfaces. C'est la raison pour laquelle quasiment aucune cellule ne reste fixée sur une surface recouverte de BSA ou de la β -caséine, lors des tests de rinçage.

Une perspective intéressante de ce travail serait d'étudier l'adhésion de lignées U-87 MG sur-exprimant et sous-exprimant les intégrines $\alpha_5\beta_1$. L'expression de ce récepteur spécifique de la fibronectine dans les cellules cancéreuses est étroitement associée au comportement métastatique des cellules. Ainsi, l'enjeu d'une telle étude serait de corrélérer l'état d'adhésion avec les vitesses de migration de ces lignées sur des surfaces recouvertes de fibronectine. Le Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie de Strasbourg (UMR CNRS 7213) développe et étudie également le rôle de molécules inhibant la reconnaissance entre l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ et la fibronectine. Il est alors envisageable d'étudier l'impact de ces molécules sur le processus d'adhésion des lignées U-87 MG.

Les distributions $P(z_0)$ enregistrées pour les cellules MDA-MB 231 en adhésion sur des surfaces recouvertes de collagène et de fibronectine ne sont pas très différentes (figure 5.12). Cette ressem-

blance est probablement due au fait que la lignée MDA-MB 231 exprime à la fois les récepteurs spécifiques de la fibronectine et ceux du collagène de type IV. Cependant, les cellules MDA-MB 231 sont également capables d'adhérer sur le collagène de type I [90]. Il nous est donc apparu intéressant d'étudier l'adhésion des cellules sur ce collagène. A ce jour, nous ne sommes pas parvenus à déposer de façon contrôlée une couche d'épaisseur nanométrique de collagène de type I sur les lamelles de verre. Néanmoins, nous avons tout de même observé des comportements intéressants en TIRF sur des couches d'épaisseur d'environ 50 nm. J'ai pu notamment distinguer ce qui semblerait être des points d'adhésion cellule-matrice beaucoup plus prononcés que ceux identifiés sur la fibronectine ou alors sur le collagène de type IV. L'analyse de ces premiers résultats s'avère très complexe, car l'épaisseur de la couche de ce collagène n'est pas homogène sur l'échantillon. L'équipe travaille actuellement sur l'optimisation du protocole de fonctionnalisation de surface afin d'obtenir des couches d'épaisseur nanométrique de collagène de type I.

Conclusion

L'objectif de mon travail de thèse a été de développer deux techniques de nanoscopie de fluorescence basées sur l'utilisation des ondes évanescentes et dédiées à l'étude de l'adhésion. La mesure d'adhésion repose sur la détermination des distances qui séparent la membrane du substrat. L'un des défis de ce travail a été de trouver des solutions optimales, du point de vue de l'instrumentation et du traitement des données, afin de rendre les techniques adaptables quel que soit le microscope. Le montage expérimental que j'ai réalisé est très polyvalent. Il m'a permis d'analyser l'adhésion des vésicules géantes par microscopie nTIRF et des cellules vivantes par microscopie VA-TIRF. Ces deux types de microscopie offrent la possibilité d'étudier la topographie d'une membrane en adhésion sur une surface, avec une résolution axiale nanométrique, typiquement de l'ordre de 20 nm. Ce projet de nanoscopie de fluorescence a été initié au laboratoire au moment où j'ai commencé ma thèse. Il s'est donc enrichi au fur et à mesure que nous progressions dans les développements expérimentaux.

La maîtrise de certains paramètres expérimentaux a constitué une étape décisive de mon travail. Le facteur le plus crucial est l'angle d'incidence θ du faisceau laser sur l'interface de l'échantillon. La connaissance de l'angle d'incidence θ est indispensable pour évaluer la profondeur d'atténuation de l'onde évanescente κ , elle-même nécessaire au calcul des distances membrane/surface. Pour cette raison, nous avons établi un protocole de calibration de l'angle θ qui consiste à observer le signal émis par une monocouche de QDots dans le plan focal arrière de l'objectif. Associée à l'utilisation d'une platine de rotation de grande précision, notre procédure de calibration permet de contrôler l'angle d'incidence avec une précision de $\Delta\theta=0.04^\circ$ en régime évanescent. Une telle résolution angulaire est nécessaire pour adapter notre technique à un dispositif TIRF commercial. Le deuxième point essentiel consiste à minimiser la translation de la zone d'éclairage sur l'échantillon lorsqu'on augmente l'angle d'incidence. Malheureusement, il m'a été difficile de m'affranchir complètement de cet effet. L'objectif Olympus utilisé au cours de ma thèse serait vraisemblablement à l'origine de certaines aberrations impossibles à compenser. La translation induit une erreur (de l'ordre de 10%) sur le facteur de correction d'irradiance laser γ . Or, l'optimisation de ce paramètre expérimental permettrait de gagner quelques nanomètres sur la résolution axiale. Dans cette perspective, nous avons testé récemment un objectif TIRF de la marque Zeiss. L'utilisation de ce dernier a permis de faire disparaître intégralement le décalage de la zone d'éclairage.

A l'aide de mon montage expérimental, j'ai tout d'abord étudié l'adhésion de vésicules géantes par microscopie nTIRF. Les vésicules constituent un parfait modèle biomimétique pour comprendre les mécanismes physico-chimiques de l'adhésion membranaire. Notre approche se base sur la normalisation de l'image TIRF par une seconde image enregistrée en épi-fluorescence (i.e. $\theta=0^\circ$). Dans un premier temps, j'ai étudié l'adhésion non spécifique : les vésicules sont déposées sur des surfaces chargées négativement (β -caséine ou SiOH) et sur des surfaces chargées positivement (PDDA, NH_2 -PEG, poly-L-lysine...). Le comportement des vésicules sur ces surfaces m'a permis de prouver la prédominance des interactions électrostatiques au cours du processus d'adhésion. Sur les surfaces chargées négativement, j'ai observé une forte répulsion électrostatique : la membrane des GUVs est repoussée à plus de 150 nm de l'interface, bien au delà de la valeur prédite par les fluctuations thermodynamiques de la membrane. En revanche, sur les surfaces chargées positivement, les GUVs subissent une forte attraction électrostatique qui contrebalance la force de répulsion d'Helfrich. La membrane se trouve alors à moins de 100 nm de l'interface. Dans le cas de surfaces fonctionnalisées avec de la poly-L-lysine et des aminosilanes, l'attraction est tellement importante qu'elle provoque la lyse des vésicules sur la surface. Mes résultats ont mis en évidence le lien entre l'amplitude de la force électrostatique induite par la surface sur la vésicule et la distance membrane-surface. J'ai également étudié l'adhésion spécifique de vésicules biotinylées sur un substrat recouvert de streptavidine. Le but de cette étude a été de mimer les conditions d'adhésion cellulaire lorsque celle-ci est gouvernée par des interactions protéine-protéine. Les liaisons biotine-streptavidine ont pour conséquence la formation de plaques d'adhésion qui modélisent les points focaux d'adhésion développés entre la cellule et la MEC. Notre étude montre que la membrane se situe en moyenne à ~ 34 nm de la surface au niveau des zones d'adhésion. Une perspective serait d'approfondir ces connaissances sur l'adhésion spécifique des vésicules géantes, en recréant des conditions plus réalistes. Par exemple, il serait intéressant d'étudier les liaisons entre les récepteurs matriciels (les intégrines) ajoutés dans la membrane phospholipidique, et les ligands de la matrice extracellulaire déposés sur une surface. Couplé à un système microfluidique, ce type d'étude permettrait de déterminer les forces d'adhésion qui résultent des interactions ligand-récepteur.

Dans une deuxième phase, j'ai mis en œuvre un dispositif expérimental adapté à l'étude de l'adhésion des cellules vivantes par microscopie VA-TIRF. Cette technique consiste à enregistrer une série d'images TIRF à différents angles d'incidence. La résolution axiale d'environ 15 nm du dispositif s'est avérée bien adaptée à l'étude des cellules. Cependant, la technique gagnerait en sensibilité si cette résolution était optimisée. Nous avons déjà identifié quelques pistes d'amélioration. L'ajustement linéaire en chaque pixel pourrait être perfectionné en attribuant un poids à chaque point correspondant à l'incertitude de la mesure. Nous pourrions également enregistrer une série de 15 à 20 images TIRF (au lieu de 10), en utilisant un objectif de plus grande ouverture numérique. Olympus propose à l'heure actuelle des objectifs TIRF standard avec une $\text{ON}=1.49$. Avec un tel composant optique, θ_{max} est $\sim 6^\circ$ plus grand qu'avec un objectif de 1.45 d'ouverture numérique. La même société propose également un objectif TIRF d' $\text{ON}=1.7$.

Dans nos études, nous avons accordé une grande importance à l'état physiologique des cellules. Pour cela, au lieu d'effectuer un marquage immunohistochimique, nous avons préféré marquer simplement la membrane plasmique à l'aide d'une sonde membranaire. Nous avons ainsi réussi à cartographier avec une très grande précision la distance qui sépare la membrane du support. De façon analogue aux vésicules, les comportements adhésifs non spécifique et spécifique de deux lignées cellulaires (U-87 MG et MDA-MB 231) ont pu être mis en évidence. Par exemple, les études d'adhésion non spécifique sur poly-L-lysine, BSA et β -caséine ont révélé que la distance membrane/-substrat reflète la nature électrostatique des interactions entre la membrane et la surface. Que ces interactions créent une force d'attraction ou de répulsion, l'impact de cette force sur la position de la membrane est moins important que dans le cas des vésicules. Ce résultat n'est pas surprenant. En effet, il est fort probable que la cellule exerce une force sur le substrat qui s'oppose à celle induite par la surface, sur la membrane. Dans le but de vérifier cette hypothèse, l'équipe NanoBiophotonique du LNIO travaille actuellement sur la dynamique du processus d'adhésion cellulaire. Les phases précoces de l'adhésion cellulaire seront suivies afin de comprendre le comportement des cellules sur les différents substrats (les images seront enregistrées toutes les deux minutes). De la même façon, il est envisageable d'étudier en dynamique le processus de migration cellulaire. Ceci permettrait d'obtenir un aperçu sur la réorganisation de la topographie membranaire au cours des différents stades de migration.

En ce qui concerne l'adhésion spécifique, j'ai étudié le comportement des cellules sur des surfaces recouvertes de fibronectine et de collagène de type IV. J'ai ainsi constaté que le comportement des deux lignées cellulaires est très similaire sur ces substrats matriciels. De plus, la distance membrane/substrat semble être plus importante lorsque l'adhésion est spécifique que lorsqu'elle est non spécifique. Sachant que les cellules présentent une morphologie migratoire de type "*tear drop*" lorsqu'elles sont en adhésion spécifique, ce qui n'est pas le cas en adhésion non spécifique, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette différence de hauteur reflète l'adaptation du comportement de la cellule par rapport au substrat. En effet, il est envisageable que ces deux lignées hautement invasives, réorganisent leur cytosquelette de façon à maintenir la membrane relativement loin du substrat pour migrer efficacement. Une mesure de vitesse de migration sur nos substrats nous permettrait de confirmer cette hypothèse.

Références bibliographiques

- [1] L. Möckl, D. C. Lamb, and C. Bräuchle. Super-resolved Fluorescence Microscopy : Nobel Prize in Chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William Moerner. *Angewandte Chemie International Edition*, 53 :13972–13977, 2014.
- [2] D. Axelrod. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of Cell Biology*, 89(1) :141–145, 1981.
- [3] D. Axelrod. Total internal reflection fluorescence. In Joseph R. Lakowicz, editor, *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, volume 3, pages 289–343. Plenum Press, 1984.
- [4] J. S. Burmeister, L. Olivier, W. M. Reichert, and G. Truskey. Application of total internal reflection fluorescence microscopy to study cell adhesion to biomaterials. *Biomaterials*, 19(4-5) :307–25, 1998.
- [5] A. M. Ray, F. Schaffner, H. Janouskova, F. Noulet, D. Rognan, I. Lelong-Rebel, L. Choulier, A. F. Blandin, M. Lehmann, S. Martin, T. Kapp, S. Neubauer, F. Rechenmacher, H. Kessler, and M. Dontenwill. Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic $\alpha 5\beta 1$ or $\alpha v\beta 3/\beta 5$ integrin antagonists in U87MG glioma cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(9) :2978–87, 2014.
- [6] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of The Cell*. Lakowicz, J. R., 2007.
- [7] C. Taylor. Attachment and spreading of cells in culture. *Experimental Cell Research*, 8 :154–173, 1961.
- [8] J. Bereiter-Hahn and M. Luck. Spreading of trypsinized cells : cytoskeletal dynamics and energy requirements. *Journal of cell science*, 96 :171–188, 1990.
- [9] J. A. Jackman, J. Choi, V. P. Zhdanov, and N. J. Cho. Influence of Osmotic Pressure on Adhesion of Lipid Vesicles to Solid Supports. *Langmuir*, 29 :11375–11384, 2013.
- [10] R. A. Badley, A. Woods, and D. Rees. Cooperativity of concanavalin A patching and its influence on cytoskeleton changes in fibroblast rounding and detachment. *Journal of cell science*, 47 :349–363, 1981.
- [11] S. Yumura, H. Mori, and Y. Fukui. Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence. *The Journal of cell biology*, 99 :894–899, 1984.

- [12] H. Seppa, G. Grotendorst, S. Seppa, E. Schiffmann, and G. R. Martin. Platelet-derived Growth Factor Is Chemotactic for Fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 92 :584–488, 1982.
- [13] Z. Yin, D. Noren, C. J. Wang, R. Hang, and A. Levchenko. Analysis of pairwise cell interactions using an integrated dielectrophoretic-microfluidic system. *Molecular systems biology*, 4(232) :232, 2008.
- [14] J. T. Parsons, A. R. Horwitz, and M. Schwartz. Cell adhesion : integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(9) :633–43, 2010.
- [15] O. Roure, A. Saez, A. Buguin, R. H. Austin, P. Chavrier, P. Silberzan, and B. Ladoux. Force mapping in epithelial cell migration. *PNAS*, 102 :2390–2395, 2005.
- [16] M. Abercrombie, J. Heaysman, and S. Pegrum. The locomotion of fibroblasts in culture. *Experimental Cell Research*, 60 :437–444, 1970.
- [17] I. Magee, N. A. Lytton, and F. M. Watt. Calcium-Induced Changes in Cytoskeleton and Motility Cultured Human Keratinocytes. *Experimental Cell Research*, 172 :43–53, 1987.
- [18] D. J. Solecki, N. Trivedi, E. E. Govek, R. Kerekes, S. S. Gleason, and M. E. Hatten. Myosin II motors and F-actin dynamics drive the coordinated movement of the centrosome and soma during CNS glial-guided neuronal migration. *Neuron*, 63(1) :63–80, 2009.
- [19] B. T. Schaar and S. K. McConnell. Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38) :13652–7, 2005.
- [20] J. C. Adams. Cell-matrix contact structures. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58 :371–392, 2001.
- [21] A. J. Ridley, M. Schwartz, K. Burridge, R. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz. Cell migration : integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651) :1704–9, 2003.
- [22] M. S. Bretscher and C. Aguado-Velasco. Membrane traffic during cell locomotion. *Current Opinion in Cell Biology*, 10 :537–541, 1998.
- [23] D. Lauffenburger and A. F. Horwitz. Cell Migration : A Physically Integrated Molecular Process. *Cell*, 84(3) :359–369, February 1996.
- [24] S. P. Palecek, J. C. Loftus, M. H. Ginsberg, D. A. Lauffenburger, and A. F. Horwitz. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385(6) :537–540, 1997.
- [25] A. Ganguly, H. Yang, R. Sharma, K. D. Patel, and F. Cabral. The role of microtubules and their dynamics in cell migration. *The Journal of biological chemistry*, 287(52) :43359–69, December 2012.
- [26] B. Geiger, J. P. Spatz, and A. D. Bershadsky. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(1) :21–33, 2009.

- [27] R. Zaidel-Bar and B. Geiger. The switchable integrin adhesome. *Journal of cell science*, 123(Pt 9) :1385–8, 2010.
- [28] P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, and C. M. Waterman. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323) :580–4, 2010.
- [29] J. Vitte, A. M. Benoliel, P. Eymeric, P. Bongrand, and A. Pierres. β -1 integrin-mediated adhesion may be initiated by multiple incomplete bonds, thus accounting for the functional importance of receptor clustering. *Biophysical journal*, 86(6) :4059–74, 2004.
- [30] J. A. Malinski, E. M. Zera, J. K. Angleson, and T. G. Wensel. High Affinity Interactions of GTPgamma S with the Heterotrimeric G Protein, Transducin. Evidence at high and low protein concentrations. *Journal of Biological Chemistry*, 271(22) :12919–12924, 1996.
- [31] A. Taubenberger, D. Cisneros, J. Friedrichs, P. H. Puech, D. J. Muller, and C. M Franz. Revealing early steps of α 2 β 1 integrin-mediated adhesion to collagen type I by using single-cell force spectroscopy. *Molecular biology of the cell*, 18(5) :1634–44, 2007.
- [32] T. Iskratsch, H. Wolfenson, and M. P. Sheetz. Appreciating force and shape — the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12) :825–833, 2014.
- [33] A. Nicolas and S. Safran. Limitation of cell adhesion by the elasticity of the extracellular matrix. *Biophysical journal*, 91(1) :61–73, 2006.
- [34] M Ghibardo, A Saez, L Trichet, A Xayaphoummine, J Browaeys, P Silberzan, A. Buguin, and B. Ladoux. Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions. *Soft Matter*, 4(9) :1836, 2008.
- [35] M. E. Davis, P. C. H. Hsieh, A. J. Grodzinsky, and R. T. Lee. Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials. *Circulation research*, 97(1) :8–15, 2005.
- [36] J. Fallas, L. E. R. O’Leary, and J. D. Hartgerink. Synthetic collagen mimics : self-assembly of homotrimers, heterotrimers and higher order structures. *Chemical Society reviews*, 39(9) :3510–27, 2010.
- [37] D. Stopak and A. K. Harris. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. *Developmental Biology*, 90(2) :383–398, 1982.
- [38] H. P. Ehrlich and J. M. Rajaratnam. Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction : an in vitro model of wound contraction. *Tissue and Cell*, 22(4) :407–417, 1990.
- [39] J. K. Mouw, G. Ou, and V. M. Weaver. Extracellular matrix assembly : a multiscale deconstruction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(12) :771–785, 2014.
- [40] M. Gao and D. Craig. Structure and functional significance of mechanically unfolded fibronectin type III₁ intermediates. *PNAS*, 100 :14784–14789, 2003.

- [41] V. R. Babaev, F. Porro, M. F. Linton, S. Fazio, E. Francisco, and A. F. Muro. Absence of regulated splicing of fibronectin EDA exon reduces atherosclerosis in mice. *Atherosclerosis*, 197(2) :534–540, 2009.
- [42] A. K. Chauhan, J. Kisucka, M. R. Cozzi, M. T. Walsh, F. Moretti, M. Battiston, M. Mazzucato, L. De Marco, F. E. Baralle, D. D. Wagner, and A. F. Muro. Prothrombotic effects of fibronectin isoforms containing the EDA domain. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(2) :296–301, 2008.
- [43] A. Villa, E. Trachsel, M. Kaspar, C. Schliemann, R. Sommariva, J. N. Rybak, C. Rösli, L. Borsi, and D. Neri. A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature in vivo. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 122(11) :2405–13, 2008.
- [44] M. D. Pierschbacher and E. Ruoslahti. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309 :30–33, 1984.
- [45] E. Ruoslahti. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology*, 12 :697–715, 1996.
- [46] J. Thundimadathil. Cancer treatment using peptides : current therapies and future prospects. *Journal of amino acids*, 2012 :967347, 2012.
- [47] E. Martinkova, A. Maglott, D. Y. Leger, D. Bonnet, M. Stiborova, K. Takeda, S. Martin, and M. Dontenwill. $\alpha 5\beta 1$ Integrin Antagonists Reduce Chemotherapy-Induced Premature Senescence and Facilitate Apoptosis in Human Glioblastoma Cells. *International Journal of Cancer*, 127 :1240–1248, 2010.
- [48] R. Pytela, M. D. Pierschbacher, and E. Ruoslahti. A 125 / 115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Cell Biology*, 82 :5766–5770, 1985.
- [49] J. A. Eble, R. Golbik, K. Mann, and K. Kuhn. The $\alpha 1\beta 1$ integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule. *The EMBO Journal*, 12(12) :4795–4802, 1993.
- [50] C. G. Knight, L. F. Morton, D. J. Onley, A. R. Peachey, A. J. Messent, P. Smethurst, D. S. Tuckwell, R. W. Farndale, and M. J. Barnes. Identification in collagen type I of an integrin $\alpha 2\beta 1$ -binding site containing an essential GER sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 273(50) :33287–33294, 1998.
- [51] R. Zaidel-Bar, M. Cohen, L. Addadi, and B. Geiger. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society transactions*, 32 :416–20, 2004.
- [52] M. Edidin. Lipids on the frontier : a century of cell-membrane bilayers. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4 :414–418, 2003.
- [53] Y. Fujiki, S. Fowler, H. Shio, A. L. Hubbard, and P. B. Lazarow. Polypeptide and Phospholipid Composition of the Membrane of Rat Liver Peroxisomes : Comparison with Endoplasmic

- Reticulum and Mitochondrial Membranes Membranes. *The Journal of cell biology*, 93 :103–110, 1982.
- [54] W. Stoerkenius and D. M. Engelman. Current models for the structure of biological membranes. *The Journal of cell biology*, 42 :613–646, 1969.
- [55] P. Winckler, L. Lartigue, G. Giannone, F. De Giorgi, F. Ichas, J. B. Sibarita, B. Lounis, and L. Cognet. Identification and super-resolution imaging of ligand-activated receptor dimers in live cells. *Scientific reports*, 3 :2387, 2013.
- [56] G. Giannone, E. Hosy, F. Levet, A. Constals, K. Schulze, A. Sobolevsky, M. P. Rosconi, E. Gouaux, R. Tampe, D. Choquet, and L. Cognet. Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophysical Journal*, 99 :1303–1310, 2010.
- [57] C. Boutin, Y. Roche, C. Millot, R. Deturche, P. Royer, M. Manfait, J. Plain, P. Jeannesson, J. M. Millot, and R. Jaffiol. High heterogeneity of plasma membrane microfluidity in multidrug-resistant cancer cells. *Journal of biomedical optics*, 14(3) :034030, 2009.
- [58] P. Winckler, A. Cailler, R. Deturche, P. Jeannesson, H. Morjani, and R. Jaffiol. Microfluidity mapping using fluorescence correlation spectroscopy : a new way to investigate plasma membrane microorganization of living cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1818(11) :2477–85, November 2012.
- [59] G. Lindblom and G. Orädd. Lipid lateral diffusion and membrane heterogeneity. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(1) :234–44, 2009.
- [60] F. Kamp, D. Zakim, F. Zhang, N. Noy, and J. Hamilton. Fatty Acid Flip-Flop in Phospholipid Bilayers Is Extremely Fast. *Biochemistry*, 34(37) :11928–11937, 1995.
- [61] L. K. Tamm and H. M. McConnell. Solid supported lipid bilayers : From biophysical studies to sensor design. *Biophysical journal*, 47 :105–113, 1985.
- [62] S. J. Singer and G. L. Nicolson. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, 175(4023) :720–731, 1972.
- [63] K. Simons and G. Van Meers. Lipid Sorting in Epithelial Cells. *Biochemistry*, 27(17) :6197–6202, 1988.
- [64] K. Simons and E. Ikonen. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387 :569–572, 1997.
- [65] R. Schlegel and P. Williamson. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell death and differentiation*, 8(6) :551–63, 2001.
- [66] E. H. Eylar, M. A. Madoff, O. V. Brody, and J. L. Oncley. The Contribution of Sialic Acid to the Surface Charge of the Erythrocyte. *The Journal of biological chemistry*, 237 :1992–2000, 1962.
- [67] M. Gouy. Sur la constitution de la charge électrique à la surface d’un électrolyte. *Journal de Physique*, pages 457–468, 1910.

- [68] D. L. Chapman. A contribution to the theory of electrocapillarity. *Philosophical Magazine*, 25(148) :475–481, 1913.
- [69] S. McLaughlin. The Electrostatic Properties Of Membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 18(1) :113–136, 1989.
- [70] R. Schoch, J. Han, and P. Renaud. Transport phenomena in nanofluidics. *Reviews of Modern Physics*, 80(3) :839–883, 2008.
- [71] R. Charmas, W. Piasecki, and W. Rudzinski. Four Layer Complexation Model for Ion Adsorption at Electrolyte/Oxide Interface : Theoretical Foundations. *Langmuir*, 11(8) :3199–3210, 1995.
- [72] O. V. Bondar and D. V. Saifullina. Monitoring of the zeta potential of human cells upon reduction in their viability and interaction with polymers. *Acta naturae*, 4(12) :78–81, 2012.
- [73] K. Cai, M. Frant, J. Bossert, G. Hildebrand, K. Liefelth, and K. D. Jandt. Surface functionalized titanium thin films : ζ potential, protein adsorption and cell proliferation. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 50(1) :1–8, 2006.
- [74] H. P. Fernandes, C. L. Cesar, and M. D. L. Barjas-Castro. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 33(4) :297–301, 2011.
- [75] Y. Zhang, M. Yang, N. G. Portney, D. Cui, G. Budak, E. Ozbay, M. Ozkan, and C. S. Ozkan. ζ potential : a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical microdevices*, 10(2) :321–8, 2008.
- [76] G. M. W. Cook and W. Jacobson. The electrophoretic mobility of normal and leukaemic cells of mice. *Biochem. J*, 107 :549–557, 1968.
- [77] E. M. Adkins, D. J. Samuvel, J. U. Fog, J. Eriksen, L. D. Jayanthi, C. B. Vaegter, S. Ramamoorthy, and U. Gether. Membrane mobility and microdomain association of the dopamine transporter studied with fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry*, 46(37) :10484–97, 2007.
- [78] A. M. Trunfio-Sfarghiu, Y. Berthier, M. H. Meurisse, and J. P. Rieu. Role of nanomechanical properties in the tribological performance of phospholipid biomimetic surfaces. *Langmuir*, 24(19) :8765–8771, 2008.
- [79] B. Cross, F. Ronzon, B. Roux, and J. P. Rieu. Measurement of the anchorage force between GPI-anchored alkaline phosphatase and supported membranes by AFM force spectroscopy. *Langmuir*, 21(13) :5149–5153, 2005.
- [80] E. Sackmann. Supported Membranes : Scientific and Practical Applications. *Science*, 271(January) :43–48, 1996.
- [81] F. M. Menger and M. I. Angelova. Giant Vesicles : Imitating the Cytological Processes of Cell Membranes. *Accounts of Chemical Research*, 31(12) :789–797, 1998.

- [82] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov. Liposome Electroformation. *Farraday Discuss. Chem. Soc.*, 81 :303–311, 1986.
- [83] U. Geissler and U. Hempel. Collagen type I, coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51 :752–760, 2000.
- [84] G. S. Grant, D. S. Koktysh, B. Yun, R. L. Matts, and N. A. Kotov. Layer-By-Layer Assembly of Collagen Thin Films : Controlled Thickness and Biocompatibility. *Biomedical Microdevices*, 4 :301–306, 2001.
- [85] R. M. Shelton, A. C. Rasmussen, and J. E. Davies. Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts. *Biomaterials*, 9 :24–29, 1988.
- [86] P. B. van Wachem, A. H. Hogt, T. Beugeling, A. Bantjes, and W. van Aken. Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomaterials*, 8 :323–328, 1987.
- [87] N. G. Maroudas. Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *Journal of theoretical Biology*, 49 :417–424, 1975.
- [88] J. L. Dewez, A. Doren, Y. J. Schneider, and P. G. Rouxhet. Competitive adsorption of proteins : Key of the relationship between substratum surface properties and adhesion of epithelial cells. *Biomaterials*, 20(6) :547–559, 1999.
- [89] R. Hooke. Micrographia, or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon. *Courier Dover Publications*, page 113, 1665.
- [90] G. Said, M. Guilbert, H. Morjani, R. Garnotel, P. Jeannesson, and H. El Btaouri. Extracellular matrix proteins modulate antimigratory and apoptotic effects of Doxorubicin. *Chemotherapy research and practice*, 2012 :268681, 2012.
- [91] J. S. Harunaga and K. M. Yamada. Cell-matrix adhesions in 3D. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 30(7-8) :363–8, 2011.
- [92] K. E. Kubow and A. R. Horwitz. Reducing background fluorescence reveals adhesions in 3D matrices. *Nature cell biology*, 13(1) :3–5 ; author reply 5–7, 2011.
- [93] S. I. Fraley, Y. Feng, D. Wirtz, and G. D. Longmore. Reply : reducing background fluorescence reveals adhesions in 3D matrices. *Nature Cell Biology*, 13(1) :5–7, 2011.
- [94] W. M. Petroll and L. Ma. Direct, dynamic assessment of cell-matrix interactions inside fibrillar collagen lattices. *Cell motility and the cytoskeleton*, 55 :254–264, 2003.
- [95] L. Limozin and K. Sengupta. Quantitative reflection interference contrast microscopy (RICM) in soft matter and cell adhesion. *Chemphyschem*, 10(16) :2752–68, 2009.
- [96] E. Sackmann and J. Radler. Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces. *Physics Abstracts*, 3 :727–748, 1993.

- [97] S. Franziska Fenz, A. S. Smith, R. Merkel, and K. Sengupta. Inter-membrane adhesion mediated by mobile linkers : Effect of receptor shortage. *Soft Matter*, 7(3) :952, 2011.
- [98] P. T. Lakkakorpi, M. H. Helfrich, M. A. Horton, H. K. Väänänen, and S. Bartholomew. Spatial organization of microfilaments and vitronectin receptor, $\alpha v \beta 3$, in osteoclasts. A study using confocal laser scanning microscopy. *Journal of cell science*, 104 :663–670, 1993.
- [99] D. Gingell, I. Todd, and J. Bailey. Topography of Cell-Glass Apposition Revealed by Total Internal Reflection Fluorescence of Volume Markers. *Journal of cell biology*, 100 :1334–1338, 1985.
- [100] I. Todd, J. S. Mellor, and D. Gingell. Mapping cell-glass contacts of Dictyostelium amoebae by total internal reflection aqueous fluorescence overcomes a basic ambiguity of interference reflection microscopy. *Journal of cell science*, 89 :107–114, 1988.
- [101] F. Lanni, S. Waggoner, and D. L. Taylor. Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy. *The Journal of cell biology*, 100(4) :1091–102, 1985.
- [102] G. A. Truskey, J. S. Burmeister, E. Grapa, and W. M. Reichert. Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) II. Topographical mapping of relative cell/substratum separation distances. *Journal of cell science*, 103 :491–499, 1992.
- [103] O. Rossier, V. Oceau, J. B. Sibarita, C. Leduc, B. Tessier, D. Nair, V. Gatterdam, O. Destaing, C. Albigès-Rizo, R. Tampé, L. Cognet, D. Choquet, B. Lounis, and G. Giannone. Integrins $\beta 1$ and $\beta 3$ exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nature Cell Biology*, 14(10) :1057–1067, 2012.
- [104] S. Cho, J. Jang, C. Song, H. Lee, P. Ganesan, T. Y. Yoon, M. W. Kim, M. C. Choi, H. Ihee, W. D. Heo, and Y. Park. Simple super-resolution live-cell imaging based on diffusion-assisted Forster resonance energy transfer. *Scientific reports*, 3 :1208, 2013.
- [105] P. Winckler, R. Jaffiol, J. Plain, and P. Royer. Nonradiative Excitation Fluorescence : Probing Volumes Down to the Attoliter Range. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 1(16) :2451–2454, 2010.
- [106] A. Honigsmann, V. Mueller, S. W. Hell, and C. Eggeling. STED microscopy detects and quantifies liquid phase separation in lipid membranes using a new far-red emitting fluorescent phosphoglycerolipid analogue. *Faraday Discussions*, 161 :77, 2013.
- [107] U. V. Nagerl, K. I. Willig, B. Hein, S. W. Hell, and T. Bonhoeffer. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *PNAS*, 105 :18982–18987, 2008.
- [108] R. Rajaraman, D. E. Rounds, S. P. S. Yen, and A. Rembaum. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Experimental Cell Research*, 88 :327–339, 1974.
- [109] M. J. Humphries. Cell-substrate adhesion assays. *Current Protocols in Cell Biology*, page chapter 9, 1998.

- [110] P. C. Brooks, S. Strömblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley, and D. A. Cheresh. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha v\beta 3$. *Cell*, 85 :683–693, 1996.
- [111] D. F. Kucik. Measurement of Adhesion Under Flow Conditions. *Current Protocols in Cell Biology*, chapter 9 :9.6.1–9.6.10, 2003.
- [112] C. Vézy, G. Massiera, and A. Viallat. Adhesion induced non-planar and asynchronous flow of a giant vesicle membrane in an external shear flow. *Soft Matter*, 3 :844–851, 2007.
- [113] H. Lu, L. Y. Koo, W. M. Wang, D. Lauffenburger, L. G. Griffith, and K. F. Jensen. Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion. *Analytical chemistry*, 76(18) :5257–64, 2004.
- [114] J. V. Forrester and J. M. Lackie. Adhesion of neutrophil leucocytes under conditions of flow. *Journal of cell science*, 70 :93–110, 1984.
- [115] E. Evans, K. Ritchie, and R. Merkel. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophysical Journal*, 68 :2580–2587, 1995.
- [116] A. V. Taubenberger, D. W. Hutmacher, and D. J. Muller. Single-cell force spectroscopy, an emerging tool to quantify cell adhesion to biomaterials. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 20(1) :40–55, 2014.
- [117] F. Li, S. D. Redick, H. P. Erickson, and V. T. Moy. Force Measurements of the $\alpha 5\beta 1$ Integrin-Fibronectin Interaction. *Biophysical journal*, 84 :1252–1262, 2003.
- [118] S. B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante. Overstretching B-DNA : The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. *Science*, 271 :795–799, 1996.
- [119] R. I. Litvinov, H. Shuman, J. S. Bennett, and J. W. Weisel. Binding strength and activation state of single fibrinogen-integrin pairs on living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11) :7426–31, 2002.
- [120] K. Mandal, M. Balland, and L. Bureau. Thermoresponsive micropatterned substrates for single cell studies. *PloS one*, 7(5) :e37548, 2012.
- [121] Q. Tseng, E. Duchemin-Pelletier, A. Deshiere, M. Balland, H. Guillou, O. Filhol, and M. Théry. Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell-cell junction positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5) :1506–11, 2012.
- [122] Q. Tseng, I. Wang, E. Duchemin-Pelletier, A. Azioune, N. Carpi, J. Gao, O. Filhol, M. Piel, M. Théry, and M. Balland. A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels. *Lab on a Chip*, 11(13) :2231, 2011.
- [123] A. Jablonski. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature*, 131 :839–840, 1933.
- [124] D. E. Wolf. *Fundamentals of fluorescence and fluorescence microscopy.*, volume 114. Elsevier Inc., 4 edition, 2007.

- [125] K. Suhling, P. M. W. French, and D. Phillips. Time-resolved fluorescence microscopy. *The Royal Society of Chemistry and Owner Societies*, 4(1) :13–22, 2005.
- [126] M. G. Honig and R. I. Hume. Dil and diO : versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends in neurosciences*, 12 :333–341, 1989.
- [127] D. Axelrod. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarisation. *Biophysical journal*, 26 :557–573, 1979.
- [128] L. M. Loew and L. L. Simpson. Charge-shift probes of membrane potential. A probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer. *Biophysical journal*, 34 :353–365, 1981.
- [129] R. Sjoback, J. Nygren, and M. Kubista. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A*, 51 :L7–L21, 1995.
- [130] M. Arik, N. Çelebi, and Y. Onganer. Fluorescence quenching of fluorescein with molecular oxygen in solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 170(2) :105–111, 2005.
- [131] A. Valizadeh, H. Mikaeili, M. Samiei, S. M. Farkhani, N. Zarghami, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, and S. Davaran. Quantum dots : synthesis, bioapplications, and toxicity. *Nanoscale research letters*, 7(1) :480, 2012.
- [132] X. Brokmann, L. Coolen, M. Dahan, and J. P. Hermier. Measurement of the radiative and non-radiative decay rates of single CdSe nanocrystals through controlled modification of their spontaneous emission. *Physical Review Letters*, 93, 2004.
- [133] W. Lukosz and R. E. Kunz. Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane interface I . Total radiated power. *Journal of Optical Society of America*, 67 :1607–1615, 1977.
- [134] W. Lukosz and R. E. Kunz. Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane dielectric interface. II. Radiation patterns of perpendicular oriented dipoles. *Journal of Optical Society of America*, 67 :1615–1619, 1977.
- [135] W. Lukosz. Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane dielectric interface III . Radiation patterns of dipoles with arbitrary orientation. *Journal of Optical Society of America*, 69 :1495–1503, 1979.
- [136] D. Axelrod, E. Hellen, and R. Fulbright. Total internal reflection fluorescence. In Joseph R. Lakowicz, editor, *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, volume 3, pages 289–343. Plenum Press, 1992.
- [137] F. Goos and H. Hanchen. Ein neuer fundamentaler Versuch zur Totalreflexion. *Ann. Physik*, 436 :333–346, 1947.
- [138] D. Axelrod. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. In *Methods in Cell Biology*, volume 30, pages 245–270. Academic Press, 1992.

- [139] W. N. Hansen. Electric Fields Produced by the Propagation of Plane Coherent Electromagnetic Radiation in a Stratified Medium. *Journal of the Optical Society of America*, 58(3) :380, 1968.
- [140] A. Cotton and H. Mouton. Les Objets Ultramicroscopiques. *Revue Generale des Sciences pures et appliquees*, 14 :1184–1191, 1903.
- [141] E. J. Ambrose. A Surface Contact Microscope for the study of Cell Movements. *Nature*, 178 :1194, 1956.
- [142] C. Roman-Vendrell, M. Chevalier, A. M. Acevedo-Canabal, F. Delgado-Peraza, J. Flores-Otero, and G. Yudowski. Imaging of kiss-and-run exocytosis of surface receptors in neuronal cultures. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8 :363, 2014.
- [143] K. M. Mayle, A. M. Le, and D. T. Kamei. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(3) :264–81, 2012.
- [144] B. Lassen and M. Malmsten. Competitive Protein Adsorption Studied with TIRF and Ellipsometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(2) :470–477, 1996.
- [145] S. L. Reck-Peterson, N. D. Derr, and N. Stuurman. Imaging single molecules using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Cold Spring Harbor protocols*, 2010(3) :pdb.top73, 2010.
- [146] J. S. Burmeister, G. A. Truskey, and W. M. Reichert. Quantitative analysis of variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy (VA-TIRFM) of cell/substrate contacts. *Journal of microscopy*, 173 :39–51, 1994.
- [147] K. Stock, R. Sailer, W. L. S. Strauss, M. Lyttek, R. Steiner, and H. Schneckenburger. Variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy (VA-TIRFM) : realization and application of a compact illumination device. *Journal of microscopy*, 211 :19–29, 2003.
- [148] J. E. Shaw, J. Oreopoulos, D. Wong, J. C. Y. Hsu, and C. M. Yip. Coupling evanescent-wave fluorescence imaging and spectroscopy with scanning probe microscopy : challenges and insights from TIRF–AFM. *Surface and Interface Analysis*, 38(11) :1459–1471, 2006.
- [149] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313 :1642–1646, 2006.
- [150] T. J. Gould, J. R. Myers, and J. Bewersdorf. Total internal reflection STED microscopy. *Optics Express*, 19(14) :13351–13357, 2011.
- [151] S. J. Holden, S. Uphoff, J. Hohlbein, D. Yadin, L. Le Reste, O. J. Britton, and A. N. Kapanidis. Defining the limits of single-molecule FRET resolution in TIRF microscopy. *Biophysical journal*, 99(9) :3102–11, 2010.
- [152] A. Hassanzadeh, S. Armstrong, S. J. Dixon, and S. Mittler. Multimode waveguide evanescent field fluorescence microscopy : Measurement of cell-substratum separation distance. *Applied Physics Letters*, 94(3) :033503, 2009.

- [153] A. Hassanzadeh, M. Nitsche, S. Mittler, S. Armstrong, J. Dixon, and U. Langbein. Waveguide evanescent field fluorescence microscopy : Thin film fluorescence intensities and its application in cell biology. *Applied Physics Letters*, 92(23) :233503, 2008.
- [154] N. I. Cade, G. O. Fruhwirth, T. Ng, and D. Richards. Plasmon-Assisted Super-Resolution Axial Distance Sensitivity in Fluorescence Cell Imaging. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4(20) :3402–3406, 2013.
- [155] A. I. Chizhik, J. Rother, I. Gregor, A. Janshoff, and J. Enderlein. Metal-induced energy transfer for live cell nanoscopy. *Nature Photonics*, 8(2) :124–127, 2014.
- [156] D. Meyerhofer. Characteristics of resist films produced by spinning. *Journal of Applied Physics*, 49 :3993–3997, 1978.
- [157] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics*. Cambridge University Press, 1959.
- [158] Y. Shimizu and H. Takenaka. *Microscope objective design*, volume 14. Advances in Optical and Electron Microscopy, 1994.
- [159] H. El-Kashef. The necessary requirements imposed on polar dielectric laser dye solvents. *Physica B : Condensed Matter*, 279(4) :295–301, May 2000.
- [160] Glycerine Producers Association. *Physical properties of glycerine and its solutions*. Glycerine Producers Association, 1963.
- [161] L. K. Wu, K. Y. Chen, S. Y. Cheng, B. S. Lee, and C. M. Shu. Thermal decomposition of hydrogen peroxide in the presence of sulfuric acid. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93 :115–120, 2008.
- [162] R. N. Wenzel. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial and Engineering Chemistry*, 28 :988–994, 1936.
- [163] J. Mertz. *Introduction to Optical Microscopy*. Roberts and Company Publishers, 2010.
- [164] W. L. Barnes. Fluorescence near interfaces : the role of photonic mode density. *Journal of Modern Optics*, 45 :661–699, 1998.
- [165] W. M. Reichert. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy I. Modeling cell contact region fluorescence. *Journal of cell science*, 96 :219–230, 1990.
- [166] D. Gingell, O. S. Heavens, and J. S. Mellor. General electromagnetic theory of total internal reflection fluorescence : the quantitative basis for mapping cell-substratum topography. *Journal of cell science*, 87 (Pt 5) :677–93, 1987.
- [167] W. M. Haynes. *Handbook of Chemistry and Physics, 94th edition*. CRC Press, 2013-2014.
- [168] M. Abkarian and A. Viallat. Dynamics of vesicles in a wall-bounded shear flow. *Biophysical journal*, 89(August) :1055–1066, 2005.
- [169] P. Winckler. *Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence : fluidité membranaire et détection de molécule unique en solution concentrée*. PhD thesis, Université de Technologie de Troyes, 2011.

- [170] S. Marx, J. Schilling, E. Sackmann, and R. Bruinsma. Helfrich repulsion and dynamical phase separation of multicomponent lipid bilayers. *Physical review letters*, 88 :138102, 2002.
- [171] H. Zen-Hong, G. Massiera, L. Limozin, P. Boullanger, Valignat M. P., and A. Viallat. Sensitive detection of ultra-weak adhesion states of vesicles by interferometric microscopy. 2010.
- [172] W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, and E. Evans. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical journal*, 79 :328–339, 2000.
- [173] G. H. Bogush, M. A. Tracy, and C. F. Zukoski. Preparation of monodisperse silica particles : control of size and mass fraction. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 104 :95–106, 1988.
- [174] R. Bruinsma, A. Behrisch, and E. Sackmann. Adhesive switching of membranes : experiment and theory. *Physical review E*, 61(4) :4253–4267, 2000.
- [175] M. J. Sarmiento, M. Prieto, and F. Fernandes. Reorganization of lipid domain distribution in giant unilamellar vesicles upon immobilization with different membrane tethers. *Biochimica et biophysica acta*, 2012.
- [176] E. Sackmann and R. F. Bruinsma. Cell adhesion as wetting transition? *ChemPhysChem*, 3 :262–269, 2002.
- [177] L. Limozin and K. Sengupta. Modulation of vesicle adhesion and spreading kinetics by hyaluronan cushions. *Biophysical journal*, 93(9) :3300–13, 2007.
- [178] D. Cuvelier, C. Vézy, A. Viallat, P. Bassereau, and P. Nassoy. Mimicking cell/extracellular matrix adhesion with lipid membranes and solid substrates : requirements, pitfalls and proposals. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 16(26) :S2427–S2437, 2004.
- [179] G. H. Cross, A. A. Reeves, S. Brand, J. F. Popplewell, L. L. Peel, M. J. Swann, and N. J. Freeman. A new quantitative optical biosensor for protein characterisation. *Biosensors and Bioelectronics*, 19 :383–390, 2003.
- [180] A. M. Edwards, S. A. Darst, S. A. Hemming, Y. Li, and R. D. Kornberg. Epitaxial growth of protein crystals on lipid layers. *Nature Structural and Molecular Biology*, 1 :195–197, 1994.
- [181] R. Cailleau, R. Young, M. Olivé, and W. J. Reeves. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(3) :661–674, 1974.
- [182] A. B. Awad, H. Williams, and C. S. Fink. Phytosterols Reduce In Vitro Metastatic Ability of MDA- MB-231 Human Breast Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 40 :157–164, 2009.
- [183] G. P. H. Gui, J. R. Puddefoot, G. P. Vinson, C. A. Wells, and R. Carpenter. In vitro regulation of human breast cancer cell adhesion and invasion via integrin receptors to the extracellular matrix. *British Journal of Surgery*, 82 :1192–1196, 1995.
- [184] J. E. Bartsch, E. D. Staren, and H. E. Appert. Adhesion and migration of extracellular matrix-stimulated breast cancer. *Journal of Surgical Research*, 110 :287–294, 2003.
- [185] J. Pontén and E. H. Macintyre. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, 74 :465–486, 1968.

- [186] D. S. Johnson, R. Toledo-Crow, A. L. Mattheyses, and S. M. Simon. Polarization-controlled TIRFM with focal drift and spatial field intensity correction. *Biophysical journal*, 106(5) :1008–19, 2014.
- [187] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, and K. Kobayashi. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein engineering*, 12(6) :439–446, 1999.
- [188] K. Toth, G. Vuye, H. Vainer, Gy. Ronto, and D. Aslanian. Ellipsometric Studies of Biological Macromolecules. *Le Journal de Physique Colloques*, 44 :C10–521–C10–523, 1983.

Marcelina CARDOSO DOS SANTOS

Doctorat : Optique et Nanotechnologies

Année 2015

Etude de l'adhésion de vésicules géantes et de cellules vivantes par nanoscopie de fluorescence

L'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser l'adhésion de vésicules géantes lipidiques et de cellules vivantes. Dans le but d'obtenir des informations quantitatives sur l'adhésion, j'ai développé deux techniques de nanoscopie de fluorescence basées sur la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence). Cette technique repose sur la création d'une onde évanescente à proximité d'une interface. J'ai développé pour cela un montage optique, qui permet de contrôler finement les caractéristiques de l'onde évanescente (longueur d'atténuation, état de polarisation, etc.). L'adhésion des vésicules a été étudiée par nTIRF (TIRF normalisé) : les images TIRF sont normalisées par des images en épi-fluorescence. J'ai pu ainsi caractériser l'adhésion non spécifique (interaction électrostatique) et spécifique (interaction biotine-streptavidine) de vésicules sur différentes surfaces fonctionnalisées. Pour quantifier l'adhésion des cellules, j'ai utilisé l'approche VA-TIRF (TIRF à angle variable). Cette dernière consiste à enregistrer une série d'images en régime évanescent à différents angles d'incidence. Ceci nous a permis d'établir une cartographie des distances entre la membrane ventrale d'une cellule et la surface pour différents comportements d'adhésion initiés sur divers substrats : chimiques ou protéiques. Ces deux techniques permettent de mesurer la distance membrane-surface avec une précision nanométrique, $\approx 20\text{nm}$, ce qui est particulièrement adapté à l'étude du processus d'adhésion.

Mots clés : nanophotonique - biophysique - microscopie de fluorescence - cellules-adhésivité - membrane cellulaire.

Adhesion Studies of Giant Unilamellar Vesicles and Living Cells by Fluorescence Nanoscopy

The aim of my thesis was to characterize the adhesion of Giant Unilamellar Vesicles and living cells. In order to obtain a quantitative information about the state of the adhesion, I developed two fluorescence nanoscopy techniques based on microscopy TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence). This technique consists of creating an evanescent wave in the vicinity of an interface. I developed the experimental setup, which allows an accurate control of characteristics of the evanescent wave (penetration depth, polarization state, etc.). The vesicles adhesion was studied by nTIRF (normalized TIRF). TIRF images are normalized by epi-fluorescence images. I was able to characterize the nonspecific adhesion (electrostatic interaction) and specific adhesion (biotin-streptavidin interaction) of vesicles on different functionalized surfaces. To quantify the adhesion of cells, I used the VA-TIRF approach (variable angle TIRF). The latter is to record a series of images at different angles of incidence in the evanescent regime. This allowed us to map the distances between the ventral membrane of a cell and the surface for different adhesion behaviors initiated on various substrates: chemical or protein. These two techniques permit to measure the membrane surface-distance with the nanometer precision $\approx 20\text{nm}$, which is particularly suitable for the study of the adhesion process.

Keywords: nanophotonics - biophysics - fluorescence microscopy - cell adhesion - cell membranes.

Thèse réalisée en partenariat entre :

