



HAL
open science

Nouveaux outils de mesure de la dynamique moléculaire appliqués à l'étude des facteurs de transcription

Marie Fournier

► To cite this version:

Marie Fournier. Nouveaux outils de mesure de la dynamique moléculaire appliqués à l'étude des facteurs de transcription. Physique Médicale [physics.med-ph]. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUR004 . tel-03510376

HAL Id: tel-03510376

<https://theses.hal.science/tel-03510376>

Submitted on 4 Jan 2022

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.

UNIVERSITÉ DE LILLE

Ecole doctorale **ED SMRE**

Unité de recherche **Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM)**

Thèse présentée par

Marie FOURNIER, le 22 janvier 2021

En vue de l'obtention du grade de docteur de l'Université de Lille

Discipline **Physique**

Spécialité **Milieus dilués et optique**

NOUVEAUX OUTILS DE MESURE DE LA DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE APPLIQUÉS À L'ÉTUDE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Thèse dirigée par LAURENT HÉLIOT Directeur de thèse

Composition du jury

<i>Rapporteurs</i>	SANDRINE LEVÊQUE-FORT	ISMO, France
	MATHIEU COPPEY	Institut Curie, France
<i>Examineurs</i>	THORSTEN WOHLAND	NUS, Singapore
	IGNACIO IZEDDIN	Institut Langevin, France
<i>Président</i>	MARC LEFRANC	PhLAM, France

Résumé

L'étude de la dynamique des facteurs de transcription nous aide à comprendre comment l'expression génétique est contrôlée. Dans cette thèse, nous nous sommes focalisés sur le complexe P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b) connu pour jouer un rôle essentiel dans la régulation de la transcription en interagissant avec l'ARN Polymérase II (RNA Pol II) dans les cellules eucaryotes. En microscopie, différentes méthodes sont utilisées pour mesurer cette dynamique ainsi que les interactions moléculaires intra-cellulaires. Nous proposons de combiner deux d'entre elles afin de tirer avantage de leur complémentarité : la FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) et le SPT (Single Particle Tracking). Nous avons observé que les molécules de RNA Pol II avaient deux comportements distincts : une partie des molécules se trouvent fixée en interaction avec la chromatine, tandis que la deuxième présente un comportement sous-diffusif suggérant une surveillance des sites de transcription. Concernant P-TEFb, nous avons montré la présence d'au moins deux populations, dont une diffusant librement, et une autre présentant un comportement anormal en recherche de cibles. L'ajout de deux composés pharmacologiques (JQ1 et Flavopiridol) a permis de comprendre davantage de phénomène de levée de pause transcriptionnelle. Ces expériences ont mis en avant que (1) la molécule Brd4 agit davantage sur la régulation du complexe P-TEFb que sur son recrutement sur RNA Pol II, (2) P-TEFb aurait une dynamique sous forme de concentrateurs locaux spatio-temporels. Afin de combiner SPT et FCS sur le même dispositif de manière plus ergonomique, nous avons développé un module de microscopie destiné à la mesure de dynamique moléculaire en cellules vivantes. Cet outil nous permet d'une part de réaliser une illumination confocale (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy) pour la FCS. Et d'autre part deux illuminations plein champ que sont le TIRFM/HiLo (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy / Highly inclined and laminated optical sheet) et le LSFM (Light Sheet Fluorescence Microscopy) pour les mesures de SPT.

Abstract

The study of transcription factors (TFs) dynamics helps us to understand how genetic expression is controlled. We are focusing on P-TEFb complex (Positive Transcription Elongation Factor b) which is known to play an essential role in the regulation of transcription by interacting with RNA polymerase II (RNA Pol II) in eukaryote cells. In microscopy, different methods are used for molecular dynamics measurements. We propose to combine two of them to take advantage of their complementarity : FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) on one side, and SPT (Single Particle Tracking) on the other side. We observed that RNA Pol II proteins can be classified into two different sub-populations : one fixed suggesting that it interacts with chromatin for transcription process and the other one sub-diffusing and scanning the environment for searching targets. RNA Pol II dynamics seems close to Continuous Time Random Walk model. Concerning P-TEFb, SPT highlighted at least two populations : one diffusing freely, and the other one slower, showing anomaly. The addition of two pharmacological drugs (JQ1 and Flavopiridol) helped to understand the process of transcriptional pause release. The experiments showed that (1) Brd4 molecules operate more on the regulation of P-TEFb than its recruitment on RNA Pol II, and (2) P-TEFb could have a spatio-temporal local hubs dynamic. In order to combine SPT and FCS on the same set-up more ergonomically, we develop a microscopy module “StellarScan” specially designed to perform CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) for FCS on the first side, TIRFM/HiLo (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy / Highly inclined and laminated optical sheet) and LSM (Light Sheet Fluorescence Microscopy) for SPT on the other side.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : Sandrine Levêque-Fort (ISMO), Mathieu Coppey (Curie), Ignacio Izeddin (ESPCI), Thorsten Wohland (NUS Singapore) et Marc Lefranc (PhLAM) pour leur disponibilité. Merci pour l'évaluation de mon travail, vos questionnements et les discussions.

Je remercie également le chef du laboratoire PhLAM, Marc Douay, et notre chef d'équipe Majid Taki. A Christophe Van Brussel, administrateur de l'ED SMRE, pour son aide sur toutes les démarches administratives à effectuer pendant la thèse. Merci à tous les personnels administratifs du laboratoire, en particulier, Nathalie de l'accueil FST, ainsi que Stéphanie, Walter et Marie-T du secrétariat.

J'adresse ensuite un très grand merci à mon directeur de thèse Laurent Héliot. Merci pour votre présence et vos encouragements, merci pour les longues discussions qui m'ont poussé dans mes retranchements et qui m'ont permis de me dépasser, d'aller toujours plus loin dans mes réflexions et mes raisonnements. Merci de m'avoir laissé la liberté d'entreprendre des actions associatives, que ce soit au sein du laboratoire, ou au sein du GDR Imabio. Je suis très fier d'avoir pu développer mes idées, grâce à votre soutien. Merci pour tous les bons moments, joyeux ou moins joyeux, dans ce long processus qui m'a amené à être docteur, mais toujours dans la bienveillance.

Mes pensées vont ensuite à nos partenaires académiques : Ignacio Izeddin (ESPCI), Hugues Berry (INRIA), Aymeric Leray (U Bourgogne) pour les discussions très intéressantes. Merci Jonathan Grimm et Luke Lavis (Janelia Farm, VA, USA) pour les dons de JF dyes. Je remercie également Yannick Coffinier (IEMN) pour son encadrement en salle blanche, j'ai beaucoup appris.

Je remercie également Alessandro Furlan pour son aide précieuse tout au long de ma thèse, spécialement sur la question biologique. Merci d'avoir passé des heures et des heures à relire mes écrits et mes présentations. Merci pour ton énergie, tes

connaissances, ta bienveillance (et les kebabs...). Par contre, je ne te remercie pas pour toutes les discussions évoquant de près ou de loin Sharknado;). Merci à mon co-bureau, Dorian, pour tous les bons moments et les fous rires, tu as égayé mes journées. Merci à Raoul pour le soutien quasi-journalier pendant la rédaction et la préparation de soutenance. Alan, futur docteur de l'équipe, je te souhaite beaucoup de réussite dans la suite de ta thèse. Merci pour tous les dépannages en tout genre : Alan le garagiste, Alan le mécanicien, Alan l'informaticien, et j'en passe. Ma vieille voiture est encore debout grâce à toi. A Diarra, Marion et Pierre les derniers arrivés dans l'équipe, j'ai été ravie de vous rencontrer, je vous souhaite de profiter de l'équipe autant que moi. Une pensée aux anciens de l'équipe Quentin Beaufiles et Florence Agbazahou. Merci également à Gauthier Dekyndt pour son aide précieuse en mécanique. Un grand merci à notre partenaire industriel Errol.

Mes pensées vont ensuite à tous mes collègues du PhLAM avec qui j'ai passé des moments inoubliables : les « copains de l'IRCICA » (et les potes des potes) : Corentin, Florent, Maryna, François, Carlos et les deux Guillaume. Merci pour les sorties, les week-ends passés et ceux à venir. Vous avez été exceptionnels et merci de m'avoir soutenu pendant cette thèse. Merci les « filles du bureau d'à côté » Julie et Laure - et Sylvain - pour les repas partagés et les bons moments. Une pensée à l'équipe Imabio Young Scientists Network n°1, pour ces longs mois à échanger pour la préparation de notre conférence qui a été un petit succès. Merci Laura Caccianini, une belle rencontre à MiFoBio. Une pensée également à l'équipe OSA student chapter de Lille.

Merci à tous mes amis, ceux du lycée, ceux de prépa, ceux de Télécom Physique Strasbourg : vous êtes globalement tous dispersés au quatre coin de monde mais je ne vous oublie pas. Merci d'avoir été patients et d'être toujours présents, même si je n'ai pas pu être très disponible pour vous pendant ces trois ans. Je vais me rattraper, promis.

Enfin je remercie ma famille et mes parents pour le soutien. Une pensée à mon petit frère en plein questionnement sur son orientation. Je te souhaite de choisir une voie qui te rendra heureux et d'avoir le luxe de te réveiller chaque matin en étant content d'aller au travail et de voir tes collègues.

En dernier mot, je dédie cette thèse à mon grand-père, qui me guide depuis des années.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Remerciements	7
Table des matières	11
Liste des abréviations	17
Préambule	20
Contexte général	21
Démarche adoptée	25
I Introduction générale à la dynamique moléculaire en biologie	29
1 Etat de l’art des outils pour la mesure de la dynamique moléculaire en cellule vivante	35
1.1 Les sondes fluorescentes	35
1.1.1 Les protéines fluorescentes	36
1.1.2 Les colorants organiques	38
1.1.3 Les Quantum Dots	39
1.1.4 Conclusion sur les fluorophores	40
1.2 Les modes d’imagerie	41

1.2.1	Le TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) pour le marquage membranaire	41
1.2.2	Le HiLo (<i>Highly inclined Laminated Optical Sheet</i>) et le SPIM (<i>Selective Plane Illumination Microscopy</i>) pour le marquage nucléaire	44
1.2.3	La microscopie confocale	47
1.3	Les capteurs	50
1.4	Les techniques de super-résolution	52
2	Etat de l'art du suivi de molécules uniques	55
2.1	Détection des particules	56
2.2	Reconstruction des trajectoires	59
2.3	Analyse de la diffusion	61
2.3.1	Les techniques basées sur l'étude des MSD	61
2.3.2	Les techniques basées sur les inférences Bayésiennes et les modèles du type chaînes de Markov cachées (<i>HMM - Hidden Markov Models</i>)	70
2.3.3	Les cartes d'inférences ou Inferring Map	72
3	Etat de l'art de la spectroscopie de corrélation par fluorescence	75
3.1	Théorie	75
3.2	Matériel	78
3.3	Méthodes	81
3.3.1	La calibration	81
3.3.2	La mesure	81
3.3.3	L'analyse	82
4	Modèles théoriques de la dynamique moléculaire	85
4.1	Modèles utilisés en FCS	85
4.1.1	Cas d'une diffusion brownienne	85
4.1.2	Cas d'un maillage (ou meshwork)	87
4.1.3	« Traps and domains »	88
4.2	Modèles utilisés en SPT (point de vue du « marcheur aléatoire »)	89
4.2.1	Continuous Time Random Walks (CTRW)	90
4.2.2	Fractional Brownian Motion (fBM)	91

<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	13
4.2.3 Marche aléatoire sur une fractale	92
II Etude de la dynamique moléculaire de P-TEFb	97
1 P-TEFb, un régulateur de la transcription	101
1.1 La levée de pause transcriptionnelle	101
1.1.1 Description du système	101
1.1.2 P-TEFb, responsable de la levée de pause	102
1.1.3 Brd4, catalyseur de la levée de pause	106
1.2 Dysfonctionnement du phénomène de levée de pause	109
1.3 Problématiques	110
2 La dynamique moléculaire des molécules impliquées dans la trans- cription	113
2.1 La diffusion des TFs est impactée par l'organisation nucléaire...	114
2.2 ... ainsi que les interactions faibles TFs-chromatine et TFs-protéines .	116
2.3 Des loci transcriptionnels spécifiques au sein du noyau	118
3 Matériels et méthodes	121
3.1 Matériels	121
3.1.1 Mesures de suivi de particules uniques (SPT)	121
3.1.2 Mesures de spectrométrie par fluctuation de fluorescence (FCS)	122
3.2 Méthodes	122
3.2.1 Protocoles biologiques	122
3.2.2 Traitements informatiques pour les données de SPT	123
4 Analyses des résultats	135
4.1 Etude sur échantillons de référence	135
4.2 Etude de la dynamique moléculaire de CT1	187
4.2.1 Description du protocole d'étude : étude de la dynamique de CT1-wt	188
4.2.2 Analyse de la dynamique moléculaire de CT1 en présence de JQ1, inhibiteur de Brd4	198
4.2.3 Analyse de la dynamique moléculaire de CT1 sous Flavopiridol, inhibiteur de CDK9 et de sa fonction kinase	200

4.2.4	Analyse de la dynamique moléculaire du mutant CT1 Δ (480 – 551)	202
4.2.5	Récapitulatif des analyses	205
4.3	Comportements des trajectoires individuelles	209
4.4	Couplage avec la FCS	215
5	Discussion	217
5.1	Caractérisation des sensibilités de FCS et SPT par échantillons mono-populations	218
5.2	Caractérisation de la sensibilité du SPT pour des échantillons de référence et biologiques à deux populations	220
5.3	Etude de la dynamique moléculaire de CT1	224
III Développement d'un microscope multi-modal pour l'étude de la dynamique moléculaire		229
1	Introduction	231
2	Description du besoin - Cahiers des charges	233
2.1	Description du besoin	233
2.1.1	CLSM : Confocal LASER Scanning Microscopy	233
2.1.2	Feuille de lumière	236
2.1.3	HiLo/TIRF	238
2.2	Cahier des charges - dispositif optique	240
2.2.1	Mode CLSM	240
2.2.2	Mode feuille de lumière	245
2.2.3	Mode TIRF/HiLo	250
2.2.4	Choix des composants techniques	250
2.2.5	Contrainte de dimensions et de poids	252
2.3	Cahier des charges - logiciel de pilotage et d'acquisition du dispositif .	252
2.3.1	Exigence technique : interfaçage prototype/PC	253
2.3.2	Exigence technique : fonctionnement global du logiciel	258
3	Dimensionnement - CAO optique	261
3.1	Dimensionnement du prototype	261

3.1.1	CLSM	261
3.1.2	Feuille de lumière	264
3.1.3	TIRF/HiLo	266
3.2	Modélisation du système	268
3.2.1	Caractérisation du chemin optique CLSM/feuille de lumière	271
3.2.2	Caractérisation du chemin optique TIRF/HiLo	275
3.2.3	Modélisation de système de pré-compensation du pupil-shift	278
4	Réalisations dispositif optique, micro-miroirs et logiciel	281
4.1	Dispositif optique	281
4.2	Développement du système de micro-miroirs à 45° pour le mode feuille de lumière	282
4.3	Réalisation du logiciel de pilotage et d'acquisition	284
5	Caractérisation du système et résultats	289
5.1	Caractérisation des points critiques indépendants	289
5.1.1	Caractérisation du faisceau	290
5.1.2	Caractérisation du pupil-shift	292
5.2	Caractérisation du mode CLSM	294
5.2.1	Caractérisation de la confocalité	294
5.2.2	Images sur échantillons biologiques	295
5.3	Caractérisation du mode LSFM	297
5.3.1	Caractérisation de la divergence du faisceau en BFP de l'objectif fonction de la lentille à focale variable	297
5.3.2	Caractérisation des dimensions de la feuille de lumière	298
5.3.3	Images sur échantillons biologiques	302
5.3.4	Perspectives mode LSFM	303
5.4	Caractérisation du mode HiLo/TIRF	304
5.4.1	Mesure de l'épaisseur de la quasi-feuille de lumière fonction de l'iris variable	304
5.4.2	Images sur échantillons biologiques	305
6	Conclusion et perspectives	309
6.1	Perspectives module optique	309
6.2	Perspectives micro-miroirs	310

<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	16
6.3 Perspectives logiciels	310
Bibliographie	313

Liste des abréviations

Section optique / microscopie / biophysique

- FLIM : Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy
- FRET : Förster Resonance Energy Transfert
- FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching
- FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy
- SPT : Single Particle Tracking
- CLSM : Confocal Laser Scanning Microcopy
- LSFM : Light Sheet Fluorescence Microscopy
- TIRF(M) : Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
- so-SPIM : single-objective Selective Plane Imaging Microscopy
- HiLo : Highly Inclined and Laminated Optical sheet microscopy
- PSF : Point Spread Function
- SNR : Signal-to-Noise Ratio
- BFP : Back Focus Plane

Section biologie

- ARN : Acide Ribonucléique
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- P-TEFb : Positive Transcription Elongation Factor b
- CT1 : Cyclin T1
- BET : Bromodomain and ExtraTerminal Domain
- GFP : Green Fluorescent Protein

Préambule

Contexte général

Les organismes sont constitués de cellules de différents types, assemblées en tissus et organes assurant des fonctions spécifiques (peau, muscle, foie, cerveau,...), Les organismes et leurs cellules sont exposés à différents types de signaux soit environnementaux (variation de température, de pression, composés chimiques...) ou endogènes (aliments, hormones, signaux électriques, variations ioniques, cassures d'ADN, produit métaboliques, horloge circadienne, présence d'espèces réactives de l'oxygène...). Ces signaux induisent une réponse cellulaire afin d'assurer la survie et la préservation de l'organisme au travers de mécanismes de régulation. La modulation de l'activité transcriptionnelle fait partie de ces moyens de régulation permettant d'adapter l'utilisation du patrimoine génétique de la cellule en fonction des besoins. Par exemple cette régulation de la transcription permet d'exprimer ou de réprimer certains gènes en réponse à des stress ou en fonction du cycle circadien pour préparer les phases suivantes (réveil, sommeil, repas,...). Lorsque ce processus est trop fortement perturbé, la régulation n'opère plus et peut engendrer l'apparition de pathologies. Les facteurs de transcription apparaissent donc comme des cibles thérapeutiques, notamment dans le cas des cancers ou d'infections virales (SIDA). Ces facteurs agissent en régulant l'activité des ARN-polymérase le plus souvent par leurs associations dans des complexes de grande taille (gigaDalton). L'étude de leurs mécanismes d'assemblage et désassemblage avec les complexes multiprotéiques comprenant l'ARN polymérase sont donc primordiaux pour comprendre la régulation transcriptionnelle. Dans le groupe Biophotonique Cellulaire Fonctionnelle de l'équipe DySCo (Dynamique des Systèmes Complexes) du laboratoire PhLAM, nous avons choisi de nous concentrer sur les interactions protéiques et la dynamique moléculaire de ces facteurs de transcription, et en particulier le phénomène de levée de pause transcriptionnelle afin de comprendre ces phénomènes de régulation. Ces techniques font intervenir des technologies optiques spécifiques en terme de microscopie et spec-

troscopie.

La microscopie par fluorescence est un outil puissant pour les biologistes. En comparaison avec les autres techniques de microscopie (bright-field, dark-field, Raman, Electronique,...), la microscopie par fluorescence se démarque grâce à son haut contraste spectral, un rapport signal/bruit SNR (signal-to-noise ratio) élevé, l'observation simultanée de plusieurs contrastes (couleurs), sa facilité de mise en œuvre (par rapport au Raman par exemple) et sa sensibilité pouvant aller jusqu'à l'ordre de la molécule unique. Dans les études de la dynamique moléculaire cellulaire, les exigences en terme de qualité des images sont très élevées. L'image est un intermédiaire entre l'échantillon et nos logiciels d'analyse et de quantification. Le constat est simple : plus nos images sont de bonne qualité (haut SNR, sensibilité aux molécules uniques), plus pertinents seront nos résultats et meilleure sera notre interprétation. Depuis plusieurs dizaines d'années, la course à l'innovation dans le domaine de la microscopie photonique est impressionnante, avec l'émergence de nouvelles techniques d'illumination avec des performances remarquables (CLSM, Super Résolution, TIRF, ...).

Pour les mesures de dynamique moléculaire, nous cherchons à quantifier et décrire des mécanismes moléculaires avec une résolution de l'ordre de la micro-seconde pour les plus rapides, et de la seconde pour les plus lents. Il est donc primordial de travailler avec des modes d'imagerie nous permettant de faire des acquisitions rapides tout en gardant un rapport signal-sur-bruit élevé. Les techniques de vidéo-microscopie en champ large utilisées avec des caméras ultra-rapides pouvant acquérir à plus de 100Hz en full-chip permettent un meilleur échantillonnage de la dynamique de nos facteurs de transcription pouvant aller jusque $10\mu\text{m}^2/\text{s}$. Les mesures de la dynamique moléculaire par fluctuations comme la FCS lorsqu'elles sont exécutées en mode mono-point sur un microscope confocal permettent un sur-échantillonnage temporel du signal. Il est alors possible de moyennner dans le temps les mesures (μs -ms) afin de se rapprocher du critère de Shannon. Le désavantage de cette méthode est l'échantillonnage spatial. En effet, le mode mono-point nous permet de récolter le signal de fluorescence d'une dizaine de molécules provenant du waist du laser représentant une surface de $0,25\mu\text{m}^2$, ce qui ne représente qu'une infime portion de la surface cellulaire ($100\mu\text{m}^2$). Nous n'obtenons donc qu'un résultat moyennné d'un locus précis dans la cellule. Comme nous le verrons dans l'état de l'art chaque tech-

nique a des avantages et des inconvénients. La mesure des dynamiques moléculaires dans la cellule vivante reste un défi qui nécessite une réponse intégrant les progrès de différentes disciplines (physique, chimie, biologie, analyse d'image). Il apparait aussi particulièrement intéressant de coupler des techniques de mesures différentes afin d'améliorer la mesure et de disposer de plages de mesures plus grandes. Notre objectif d'étude de la dynamique des facteurs de transcription, nécessite de mesurer des diffusion de 1 à $10\mu\text{m}^2/\text{s}$ dans le noyau. Il existe principalement deux méthodes en microscopie de fluorescence pour réaliser ce type de mesure : suivi de molécules uniques et mesure de fluctuations de fluorescence. Le Single Particle Tracking (SPT) permet d'observer de manière directe le déplacement de nos protéines d'intérêt dans le noyau grâce à la vidéo-microscopie rapide et tirant parti de la grande sensibilité et du faible bruit des caméras sCMOS. Les techniques de fluctuations telles que la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) permet de mesurer la dynamique de population de molécules (5 à 30 molécules marquées) dans le volume focal de l'objectif. La FCS et le SPT sont deux techniques de mesures de la dynamique moléculaire sur des échelles spatio-temporelles très distinctes, comme nous le détaillerons plus en avant. Ce changement de référentiel peut être un avantage afin de comprendre la dynamique des facteurs de transcription, phénomène hautement non-linéaire. Au cours de ce manuscrit je m'attacherai à montrer la complémentarité de ces deux approches.

Nous avons donc eu l'ambition de combiner les mesures de FCS et SPT sur un même dispositif, ce qui revient à fusionner deux méthodes d'illuminations très différentes, pour ne pas dire antinomiques : le champ large et le confocal. Afin de pouvoir adapter notre illumination champ large à nos échantillons, nous avons choisi d'implémenter le HiLo (Highly Inclined Laminated Optical sheet) pour le signal nucléaire, le TIRF (Total Internal Reflexion Fluorescence) pour l'étude de la membrane et le LSFM (Light Sheet Fluorescence Microscopy) pour l'aspect multi-plans. Dans un premier temps j'ai développé la technique de SPT qui n'était pas encore implémentée au laboratoire et je l'ai adaptée à l'étude de la dynamique d'un complexe de régulation de la transcription : P-TEFb. En parallèle j'ai développé une solution instrumentale permettant de coupler les modes de microscopie SPT et confocale et la technique FCS.

Démarche adoptée pendant la thèse

Durant ces trois années de thèse, mon travail s'est articulé autour de deux parties distinctes :

1. l'étude de la dynamique moléculaire d'un des facteurs de transcription impliqués dans la levée de pause transcriptionnelle : P-TEFb. Afin de mener à bien ces études, deux techniques d'analyse de la dynamique moléculaire ont été testées : la FCS et la SPT. Dans un premier temps, il m'a fallu maîtriser et comprendre ces deux techniques aux échelles spatio-temporelles très différentes, leurs différences et leurs similitudes. Puis dans un second temps, la diffusion d'un mutant de CycT1 (une sous-unité de P-TEFb) et la diffusion de CycT1 sous deux drogues inhibitrices des acteurs de la levée de pause ont été analysées par ces techniques. L'interprétation des résultats nous a permis de comprendre davantage l'implication de la diffusion des facteurs de transcription dans le phénomène de levée de pause transcriptionnelle.
2. le développement d'un module de microscopie multi-illuminations, appelé StellarScan. Ce projet d'ingénierie optique a pour vocation de combiner différents types de microscopie que sont le CLSM, le HiLo/TIRFM et le LSFM dans un module compact, low-cost et adaptable à tous les statifs de microscope. Le but final de ce projet est de pouvoir combiner les techniques de SPT et de FCS au minima sur un seul et même set-up, et d'y réaliser différentes analyses complètes et combinées sur un même échantillon biologique. Ma responsabilité dans ce projet a été de mener à bien le développement de ce module, en collaboration avec les partenaires industriels qui avaient été choisis au préalable. Mon rôle a été de piloter le projet, mais aussi de le maîtriser dans son ensemble : des modélisations CAO, à la conception optique du module, à la conception du logiciel de pilotage du module et d'acquisition du signal, à la calibration, en finissant par la phase de test et la métrologie.

C'est donc naturellement que mon mémoire de thèse est décomposé en deux aspects distincts tous deux reliés à la grande thématique qu'est la dynamique moléculaire. Un premier aspect biophysique comprenant l'étude de la dynamique moléculaire de nos facteurs de transcription. Un deuxième aspect d'ingénierie optique décrivant le module de microscopie multi-modal StellarScan pour des applications de dynamique moléculaire. Cette dernière partie sera rédigée sous la forme d'un rapport technique type ingénieur. La dynamique moléculaire étant au centre de ces deux parties, j'ai décidé de faire un état de l'art général de la dynamique moléculaire en amont des deux parties décrites précédemment et contenant les outils, les techniques et les modèles (partie I). Ensuite, nous nous focaliserons sur la dynamique des facteurs de transcription dans la partie II où j'exposerai l'état de l'art sur la question biologique ainsi que mes travaux et résultats. Dans la partie III nous verrons comment j'ai contribué au développement de l'instrument de mesure de la dynamique moléculaire StellarScan.

Première partie

Introduction générale à la dynamique moléculaire en biologie

Introduction

Il existe différentes techniques pour la mesure de la dynamique moléculaire in vitro ou in vivo sur les échantillons biologiques. Les trois méthodes principales sont :

- Le FRAP (Fluorescence Recovery After Photo-bleaching) qui consiste à photoblanchir une zone précise de l'échantillon biologique et de mesurer le temps de retour à l'équilibre. Cette mesure nous informe sur la vitesse de diffusion, et permet d'avoir une certaine idée de la mobilité moléculaire.
- La FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) qui est une technique de mesure des fluctuations de fluorescence. Un LASER focalisé dans l'échantillon biologique excite alors toutes les molécules fluorescentes qui passent à travers le faisceau, la fluorescence émise par ces molécules est alors récoltée et présente des fluctuations dont l'amplitude et la fréquence dépendent du nombre de molécules et de leur vitesse.
- Le SPT (Single Particle Tracking) qui est une technique de mesure directe de la dynamique moléculaire par vidéo-microscopie. En condition de marquage extrêmement faible, on vient faire un film des déplacements moléculaires au sein de l'échantillon biologique. Ensuite vient une étape conséquente de traitements post-acquisitions où l'on vient reconstruire les trajectoires des molécules et les analyser.

Dans cette thèse, nous allons nous concentrer sur deux techniques principalement, à savoir la FCS et le SPT. Ces deux techniques ont chacune des échelles spatio-temporelles intéressantes pour l'étude de nos facteurs de transcription.

La FCS permet d'avoir un échantillonnage temporel très rapide (de l'ordre de la micro-seconde), mais celui-ci est généralement effectué en mono-point, et ne sonde qu'une petite surface ($0,06\mu\text{m}^2$), tandis que le SPT est limité temporellement par la

fréquence d'acquisition de la caméra (de l'ordre de la milliseconde) mais profite d'un champ large (environ $40\mu\text{m}^2$).

Nous allons donc voir dans un premier temps les outils nécessaires à la réalisation de ces deux techniques (préparation échantillon, types d'imagerie, types de détecteurs), puis les états de l'art de chacune des deux méthodes.

Chapitre 1

Etat de l'art des outils pour la mesure de la dynamique moléculaire en cellule vivante

1.1 Les sondes fluorescentes

Pour la mesure de la dynamique moléculaire, un des points critiques est la préparation de l'échantillon, notamment le marquage fluorescent de nos protéines d'intérêt. Les méthodes de mesure de la dynamique moléculaire comme le FRAP ou la FCS nécessitent un marquage fluorescent fort à moyen (environ 5 molécules sur une surface de $0,06 \mu\text{m}^2$), mais le SPT s'utilise en condition de marquage extrêmement faible (1 molécule par μm^2 dans le champ de vision ce qui équivaut à une concentration de sondes fluorescentes de 100-10 pM). Si l'on cherche à se placer dans le régime des molécules uniques, c'est afin de pouvoir distinguer les molécules l'une de l'autre. En effet, nos fluorophores sont considérés comme des émetteurs uniques, et dans un système optique limité par la diffraction, ils apparaissent à la caméra comme la convolution entre leur propre section optique et la réponse impulsionnelle de l'appareil de mesure de la manière suivante :

$$Image(x, y) = objet(x, y) * PSF(x, y)$$

Avec $PSF(x, y)$ qui correspond à la réponse impulsionnelle (ou PSF ; *Point Spread Function*) et qui pour un système optique limité par la diffraction correspond à une tâche d'Airy, de largeur environ égale à $\frac{\lambda}{2ON}$; λ étant la longueur d'onde d'émission

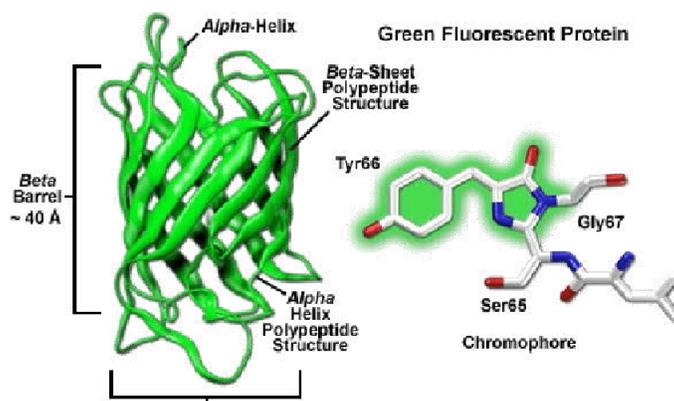
du fluorophore, et *ON* l'ouverture numérique du système optique. De ce fait, nos fluorophores, dont le rayon hydrodynamique apparent (4nm pour une molécule de GFP) est inférieur à la limite de résolution du microscope, apparaissent à la caméra comme une tâche circulaire de diamètre 250 nm environ. Il faut donc que les images de nos molécules soient suffisamment séparées et en nombre suffisamment petit dans notre champ de vision pour pouvoir les analyser indépendamment l'une de l'autre, au cours du temps.

Grâce au développement de la photo-physique, il existe différentes manières de marquer des protéines par des fluorochromes. On peut les répertorier en deux familles distinctes :

- les fluorophores encodés génétiquement, comme les protéines fluorescentes (1.1.1). [109, 63, 34]
- les fluorophores externes venant se greffer spécifiquement à nos molécules d'intérêt par une réaction chimique, comme par exemple les colorants organiques [78, 95, 51, 122, 87, 86, 73]. ou les Quantum Dots [119, 160].

1.1.1 Les protéines fluorescentes

Les marquages génétiquement encodés par protéines fluorescentes (FPs, *Fluorescent Proteins*) sont très souvent utilisés dans le domaine de la mesure de la dynamique moléculaire ou de l'imagerie cellulaire en général [34].



La structure protéique de la « Green Fluorescent Protein » (GFP), de Piston, Campbell et. al.

FIGURE 1.1 – Un exemple de protéines fluorescentes : la protéine fluorescente verte (GFP)

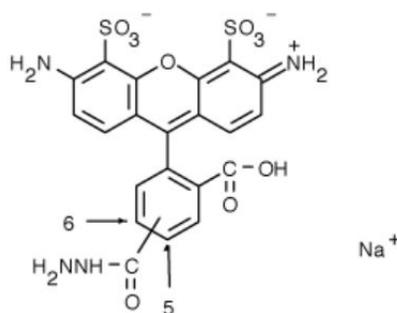
Grâce aux techniques de clonage et de transfection, notre protéine d'intérêt fusionnée à une protéine fluorescente est exprimée de manière endogène par la cellule. Cependant, le niveau de transfection, donc la quantité de protéines marquées, est difficilement maîtrisable et dépend principalement de la quantité de plasmide absorbée par la cellule. Il est cependant possible de contrôler le niveau d'expression en jouant sur la quantité de plasmide, et certaines conditions expérimentales afin de diminuer la variabilité entre les cellules. Pour contourner ce problème et avoir ainsi plus de facilité à contrôler le niveau de fluorescence d'une cellule, les protéines fluorescentes photo-activables (PA-FPs) ont vu le jour dans le début des années 2000 [12, 91]. Contrairement aux FPs classiques, il est possible d'activer de manière stochastique la fluorescence des PA-FPs par irradiation avec un laser UV (405nm). Ainsi sur toute une population de protéines fluorescentes, il est possible d'en activer qu'une fraction en jouant sur l'intensité laser, ce qui rend plus facile la localisation des molécules uniques : c'est le principe de la *Photo-Activated Localization Microscopy* (PALM, prix Nobel de Chimie 2014) [66, 12]. Depuis, toute une palette de PA-FPs a été conçue, représentant une grande partie du spectre visible. On peut les classer en 3 catégories [91] :

- les PA-FPs irréversibles, qui passent d'un état « off » à un état « on » sans un possible retour en arrière. On peut citer *PAGFP*, *PAmCherry1*.
- les FPs photo-convertibles, qui subissent un décalage irréversible de la longueur d'onde d'émission suite à une irradiation par l'UV. Les plus connues sont *Kaede*, *Dendra2*, et *mEos2*.
- les PA-FPs réversibles, qui passent d'un état « off » à un état « on » de manière réversible comme *Dronpa*.

Cependant, l'efficacité des PA-FPs et des protéines fluorescentes à plus large échelle reste limitée. En effet, les FPs sont moins brillantes et dix fois moins photo-stables que les colorants organiques [58]. Une étude réalisée sur la GFP montre que son émission est sujette à des fluctuations importantes dans le temps dues à un *blinking* et à des transitions vers des états non-radiatifs non fluorescents, appelés *dark states* [37]. Le *photo-bleaching* (ou blanchiment) des FPs est également un réel problème pour un suivi dans le temps des molécules, il peut être cependant diminué dans une certaine mesure en jouant sur l'intensité de l'illumination LASER, ou en choisissant un type d'illumination moins concentrée [35].

1.1.2 Les colorants organiques

Un autre moyen de marquer nos protéines d'intérêt est basé sur la « *click-chemistry* » [78]. Ce terme désigne l'ensemble des réactions qui visent à fusionner des bio-molécules à une protéine d'intérêt de manière spécifique et stable. Dans le domaine de la microscopie de fluorescence, on tire profit de la *click chemistry* grâce à des labels de type *HaloTag* [95], *SNAP-tag* [73], ou encore *CLIP-tag* qui une fois fusionnés à nos protéines d'intérêt peuvent se lier de manière covalente à un ligand synthétique fonctionnalisé. Ce ligand synthétique est composé d'une liaison réactive qui va reconnaître son 'tag' et d'un colorant fluorescent. Par exemple, en ce qui concerne la technologie *HaloTag*, le ligand synthétique se compose d'un chloroalkane réactif et d'un colorant organique comme le *TMR*, *Alexa Fluor* (1.1.2), ou *Oregon Green* par exemple.



La formule chimique de la molécule organique fluorescente Alexa Fluor 488, par Ota. et al

FIGURE 1.2 – Un exemple de colorant organique : Alexa Fluor 488

Aujourd'hui, un grand challenge consiste à développer des colorants avec un meilleur rendement quantique, une meilleure brillance et un temps de demi-vie de fluorescence plus long. Ces avancées en ingénierie moléculaire profitent au domaine de l'imagerie. Sans être exhaustifs, nous pouvons également citer d'un côté les *FAST tag* [51, 86, 122, 87] qui permettent un meilleur rapport signal sur bruit (en anglais : *signal-to-noise ratio*, SNR) grâce à un marquage fluorescent 100% spécifique dû à un fluorogène qui ne s'active que lorsqu'il est lié à son ligand. Et de l'autre côté, les *Janelia Farm dyes* (JF dyes) adaptés à la technologie HaloTag qui sont très utilisés dans le domaine du SPT ces dernières années grâce à leur brillance importante, la diversité des couleurs, et un décalage de Stokes plus conséquent que celui des pro-

téines fluorescentes [56]. Les colorants JF permettent un marquage spécifique grâce à une réaction chimique de liaison covalente stable, et les fluorophores non-attachés sont éliminés par un protocole de rinçage, ce qui permet entre autres, un meilleur SNR.

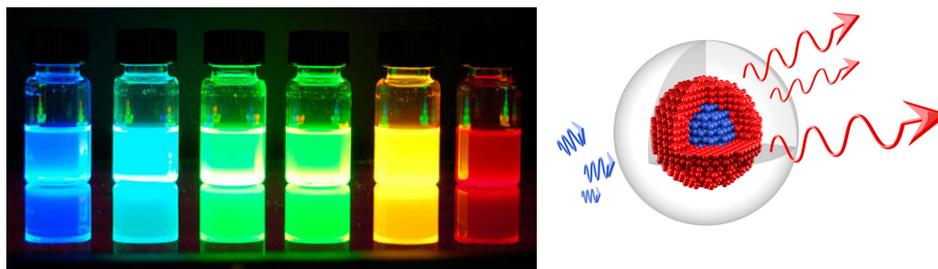
Pour nos applications en SPT, les colorants organiques permettent un meilleur contrôle du nombre de molécules fluorescentes dans le champ de vision. En effet, il est possible d'ajuster le niveau d'expression des protéines marquées par le '*tag*' lors de la transfection, mais il est également possible de jouer sur la concentration des ligands fluorescents dans le milieu de culture. Les techniques de SPT nécessitent un marquage très faible, et pour avoir un nombre de molécules fluorescentes suffisamment petit dans le champ de vision (1-10 molécules), on doit souvent préparer une solution de ligands fluorescents à quelques dizaines de nanomolaires, voire moins.

Cependant les colorants organiques ont aussi leurs désavantages. On peut répertorier différents inconvénients quant à l'utilisation de ces molécules comme une possible toxicité (certaines lignées cellulaires ont du mal à survivre au contact), la non-perméabilité cellulaire face à certaines types de colorants, le marquage résiduel non spécifique, ou leur mauvaise conservation dans le temps.

1.1.3 Les Quantum Dots

Les avancées conséquentes des études sur les semi-conducteurs ont permis la découverte des boîtes quantiques (ou *quantum dots*) dans les années 80. Appelés également 'atomes artificiels', les *quantum dots* sont des semi-conducteurs de 5 à 100 nm de diamètre qui émettent de la lumière par fluorescence lors de la recombinaison paire électron-trou. Les *quantum dots* sont connus pour être les sondes fluorescentes les plus brillantes qui soient (20 fois plus brillantes que les fluorophores organiques)[160], de plus elles ont des propriétés optiques très intéressantes. En effet, la longueur d'onde d'émission des quantum dots dépend directement de leur diamètre. Ainsi, plus la boîte quantique sera volumineuse, plus elle émettra vers le rouge.

L'utilisation des boîtes quantiques pour l'imagerie biologique, et à plus forte raison, cellulaire, ne viendra que plus tardivement [160] vers 2010. Ce genre de fluorophores non organiques peut parfois être néfaste pour les organismes vivants. C'est notamment le cas des bactéries, sur lesquelles les *quantum dots* ont un effet anti-biotique. Sur cellules vivantes, ils ne peuvent malheureusement pas être utilisés



(Gauche) Image d'illustration de différentes solutions de QDots de tailles différentes. La valeur de la longueur d'onde d'émission dépendant du volume des QDots, nous avons de ce fait la solution présentant les QDots de plus petits diamètres dans la solution bleue indigo et de plus gros diamètre dans la solution rouge. (Droite) Image représentant le mode de fonctionnement des QDots, la longueur d'onde d'excitation va interférer avec la couche d'atomes inférieurs (en bleu), qui après excitation et création d'électrons libres, retourne dans son état fondamental en recombinant les paires électrons-trous, trous situées dans la couche supérieure (en rouge). Cette recombinaison dégage un photon moins énergétique que le photon d'excitation car le système a puisé de l'énergie pour recombinaison des paires électrons-trous : la longueur d'onde d'émission sera plus élevée.

FIGURE 1.3 – Les Quantum Dots : dilution de Qdots sous irradiation UV (à droite), structure atomique des QDots (à gauche)

comme tels : afin de les rendre non-cytotoxiques et solubles dans le liquide cellulaire, il est nécessaire de passer par une étape de transformation (coating de peptides) au préalable [24]. En 2004, Chen et al. a été un des pionniers à faire de l'imagerie nucléaire avec un marquage utilisant les Quantum Dots. Les applications en SPT ont suivi quelques années plus tard avec Chang et al [21] sur des glycoprotéines.

1.1.4 Conclusion sur les fluorophores

La diversité des sondes disponibles pour l'imagerie est un grand avantage pour des techniques comme le SPT. La brillance étant un point critique dans la mise en place des protocoles, il est souvent utile d'essayer plusieurs types de sondes avant de trouver le meilleur compromis pour nos applications. Il ne faut pas oublier que passer d'une sonde à une autre demande un travail de biologie moléculaire conséquent, et fait également l'objet d'un certain coût financier.

Afin de récapituler les avantages et inconvénients de chaque type de sonde, voici

un tableau comparatif selon différents critères :

	Photo-bleaching	Brillance	Blinking	λ émission (nm)
FPs	XXX	X	X	450-650
Colorants organiques	XX	XX	X	400-800
QDs	X	XXX	X	400-800

TABLE 1.1 – Comparatif des techniques de marquages fluorescents [104]

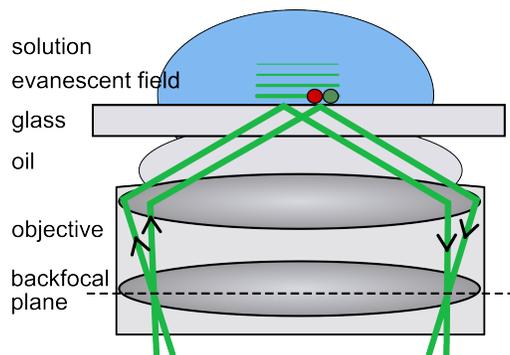
1.2 Les modes d'imagerie

Comme la fluorescence d'un émetteur unique est très faible, leur détection est un point critique et il est important de choisir le bon mode d'illumination afin d'avoir un SNR adéquat et un photo-blanchiment faible de nos fluorophores. En effet, une de nos obsessions principales en imagerie cellulaire pour des applications de dynamique moléculaire est d'augmenter le contraste entre nos molécules fluorescentes et le background cellulaire. Pour cela, une bonne préparation de l'échantillon est nécessaire, mais pas suffisante. Le choix du mode d'illumination est un point important afin de limiter le bruit induit par des molécules hors focus. Naturellement le confocal (en particulier avec balayage laser) est une des solutions pour résoudre ce problème. Cependant il est par nature lent et ne permet pas de suivre le déplacement de molécules. D'autres techniques utilisant des caméras ont été développées depuis les années 2000. Pour éviter les redondances, nous nous concentrons ici uniquement sur l'effet de l'illumination sur l'acquisition du signal, les descriptions optiques des différents modes d'imagerie seront détaillées ultérieurement avec précision.

1.2.1 Le TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) pour le marquage membranaire

Pour l'étude de la dynamique moléculaire de protéines membranaires, il est conseillé d'utiliser le TIRFM[3, 6, 5]. Grâce à la différence d'indices optiques entre le verre de la lame de microscope et le milieu de culture, la lumière qui intercepte l'interface verre-eau à l'angle critique est totalement réfléchi et ne se propage pas dans l'échantillon. Cette réflexion totale interne induit un phénomène d'onde évanescente qui se propage dans l'échantillon suivant l'axe optique sur environ 200nm (fig.1.4). Cette

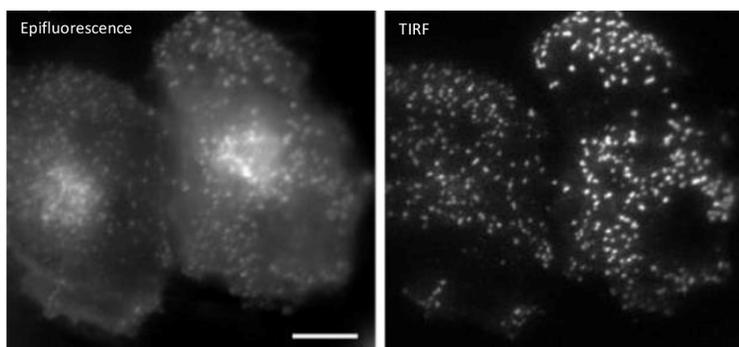
onde évanescente va exciter uniquement les molécules fluorescente se situant à la surface de la lame de microscope réduisant la détection du background intracellulaire (auto-fluorescence ou présence de molécules fluorescentes dans les plans supérieurs) (fig. 1.5). [108]



Source : <https://www.wur.nl>

Cette figure représente le phénomène de réflexion totale interne en mode d'imagerie TIRF à l'interface entre l'objectif et l'échantillon. Le plan focal arrière de l'objectif (Back Focal Plane, BFP) est un plan optique particulier du microscope : La lumière émise d'un point situé à l'infini sera focalisé dans le BFP, si l'objectif est corrigé « à l'infini ». Les objectifs TIRF possèdent une grande ouverture numérique et peuvent récolter les faisceaux dits très inclinés. Le faisceau LASER, ici en vert, est focalisé dans le BFP : il ressortira de l'objectif collimaté. Le fait que l'impact LASER dans le BFP ne soit pas centré sur l'axe optique (centre du BFP), va provoquer une inclinaison du faisceau en sortie d'objectif : plus on se décale de l'axe dans le plan du BFP, plus le faisceau s'incline à la sortie de l'objectif. Comme il y a un changement d'indice optique entre le verre de la lamelle et le milieu aqueux de l'échantillon, on a une réfraction du faisceau lumineux selon la loi de Snell-Descartes. Passé un certain angle d'incidence sur la lamelle, le faisceau va donc totalement se réfléchir à l'interface, dû à la différence d'indice optique entre l'eau et le verre. Cette réflexion crée une onde stationnaire évanescente qui va exciter les fluorophores présents sur les 200 premiers nanomètres.

FIGURE 1.4 – Microscopie TIRF



Clathrine-GFP dans des cellules HeLa : à gauche avec une illumination en épifluorescence et à droite avec une illumination TIRF

FIGURE 1.5 – Marquage membranaire : épifluorescence vs TIRF[108]

D'un point de vue instrumentation, l'illumination TIRF peut être implémentée de deux façons différentes :

- L'illumination TIRF à l'aide d'un prisme (« *prism-based TIRF* ») [5] qui requiert un prisme attaché à la lame de microscope. Ce prisme a pour but de rediriger la lumière de manière à ce qu'elle intercepte l'interface verre-eau à l'angle critique, afin d'induire le phénomène d'onde évanescente. Cette méthode décorrèle les chemins optiques de l'excitation (qui passe par le prisme de manière latérale) et de l'émission fluorescente des fluorophores (qui est récoltée par un objectif et projetée sur une caméra).
- L'autre méthode est basée sur l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique ($ON=1,45$) comme décrit figure 1.4. Ici, l'excitation et l'émission de fluorescence passent par les mêmes optiques et sont séparées l'une de l'autre par un filtre dichroïque, afin de projeter l'émission de fluorescence sur une caméra. Grâce à la grande ouverture numérique des objectifs « TIRF », il est possible d'obtenir une incidence LASER à l'angle critique sur l'échantillon, en écartant la position de l'incidence LASER de son axe optique dans la pupille arrière (en anglais : *back focus plane* BFP voir fig. 1.4) de l'objectif. Cette méthode est la plus utilisée, car elle permet d'ajuster l'angle critique de manière plus simple. Cependant, les objectifs « TIRF » sont assez coûteux.

L'épaisseur d'une membrane est d'environ 7,5nm, les protéines membranaires sont donc considérées comme ayant une diffusion en deux dimensions, car confinées dans le plan d'observation (200nm au dessus de la lamelle). Ceci rend l'analyse de la

diffusion plus simple à appréhender qu'en trois dimensions.

1.2.2 Le HiLo (*Highly inclined Laminated Optical Sheet*) et le SPIM (*Selective Plane Illumination Microscopy*) pour le marquage nucléaire

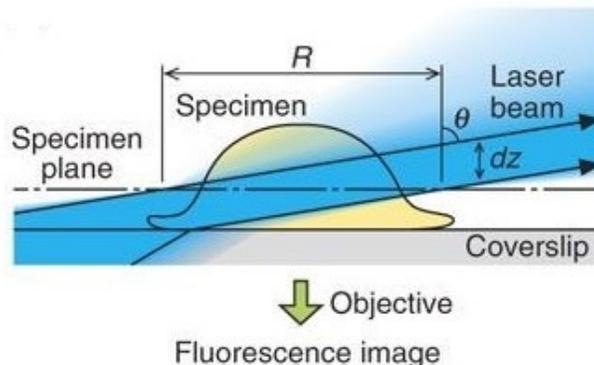
Dans le noyau cellulaire (diamètre $\sim 10\text{-}20\ \mu\text{m}$), les protéines solubles diffusent en 3D dans l'environnement encombré et compact qu'est la chromatine, et cela nous pose deux problématiques :

1. Il nous faut un mode d'imagerie avec lequel on peut choisir le plan d'illumination sur une zone de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$, avec une bonne sélection spatiale afin d'éviter d'exciter les fluorophores situés sur les plans hors-focus. En effet, lorsque l'illumination n'est pas spatialement sélective, comme c'est le cas de l'épifluorescence, toutes les molécules sont excitées, y compris celles qui ne font pas partie du plan focal. La fluorescence émise par ces molécules hors plan d'imagerie participe au signal détecté, créant de la sorte un signal résiduel diminuant le SNR. Cela est d'autant plus vrai lorsque nous travaillons en suivi de molécules uniques. En effet, les molécules rapides diffusant en 3D, entrant et sortant du volume focal apparaissent à l'image comme une PSF déformée en forme de comète. Aussi les molécules dites défocalisées, c'est-à-dire qui se situent légèrement au-dessous ou au-dessus du plan d'imagerie apparaissent comme un halo de lumière à l'image. Il est donc impératif de diminuer au maximum l'épaisseur du volume d'excitation des fluorophores dans la direction parallèle à l'axe optique afin de limiter l'émission fluorescente des éléments se situant hors du plan d'imagerie.
2. La profondeur de champ de l'objectif, étant de dimension inférieure à la dimension de la zone libre de diffusion, pose un problème quant à la détection des particules fluorescentes, qui peuvent sortir et rentrer dans le plan focal de façon indécidable, ce qui peut fausser les analyses et l'interprétation des données.

Pour le premier point, il est possible d'utiliser des technologies d'illumination à feuille de lumière ou quasi-feuille de lumière, telles que le HiLo (*Highly inclined Laminated Optical Sheet*) ou le SPIM (*Selective Plane Illumination Microscopy*).

Le HiLo est une illumination dérivée du TIRF [147], en effet, basée sur les mêmes configurations que le TIRF par objectif à grande ouverture numérique, elle permet

d'incliner très fortement l'incidence LASER θ en sortie d'objectif sans dépasser l'angle critique, pour ainsi créer localement une quasi-feuille de lumière d'épaisseur dz de $6\mu\text{m}$ en moyenne (fig. 1.6). R correspond à la section entre le faisceau incliné et le plan focal, ce qui constitue notre champ d'observation. Il est ajustable, notamment par variation de la taille de faisceau dans un plan conjugué au plan d'imagerie.

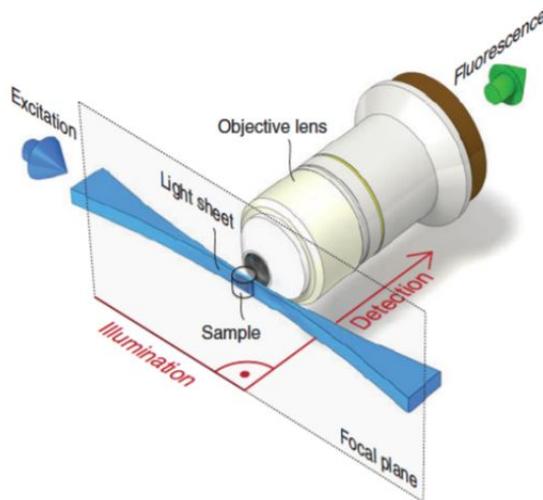


Cette figure montre l'inclinaison du faisceau en sortie d'objectif : le faisceau LASER d'épaisseur dz , se retrouve incliné d'un angle θ . Le champ d'illumination de dimension R correspond donc à l'intersection entre le faisceau et le plan d'imagerie de l'objectif.

FIGURE 1.6 – Description de l'illumination HiLo [147]

Le SPIM représente les techniques de microscopie à feuille de lumière (*Light Sheet Fluorescence Microscopy*, LSFM) qui nous permettent de sélectionner un seul plan d'illumination perpendiculairement à l'axe optique. Historiquement, le LSFM est réalisé grâce à deux objectifs placés à 90° l'un de l'autre (fig. 1.7). Le premier objectif exécute la feuille de lumière, grâce à la mise en place d'une lentille cylindrique, dont le but est de focaliser le faisceau gaussien en sortie d'objectif dans une direction sans changer l'autre, réalisant ainsi localement une feuille de lumière dans le plan de focalisation. Cette feuille de lumière d'excitation a des dimensions qui sont modulables selon les caractéristiques du système optique, mais on peut citer un ordre de grandeur de $10\mu\text{m}$ pour l'épaisseur. Le deuxième objectif est alors utilisé pour collecter la fluorescence et projeter l'image sur une caméra. [90]

Vers 2010, de nombreuses variantes de la microscopie SPIM ont émergé, avec notamment le *lattice light sheet* de E. Betzig (2014) qui nécessite l'utilisation de



Principe général de l'illumination en feuille de lumière : l'excitation ici en bleue vient sectionner optiquement l'échantillon sur la portion du LASER où le waist est le plus fin. La collection des photons (en vert) se fait de manière orthogonale à l'illumination par l'objectif.

source : Huisken J. & Stainier D., 2007

FIGURE 1.7 – Description du SPIM à deux objectifs orthogonaux [90]

faisceau de Bessel. Le profil du faisceau de Bessel n'est pas gaussien, mais une fonction de Bessel de première espèce. C'est un faisceau qui théoriquement ne diffracte pas, il se propage en gardant les mêmes propriétés spatiales, ce qui est très intéressant pour des applications de feuilles de lumière. Cependant la présence de deux objectifs (un d'excitation, un d'observation) rend ces dispositifs très encombrants et non-adaptés aux dimensions cellulaires. En 2015, Galland et al. [50] a développé le so-SPIM (*single-objective Selective Plane Illumination Microscopy*) qui pour la première fois et à l'aide d'un système de micro-miroirs intégré à l'échantillon, réalise un éclairage à feuille de lumière par la tranche nécessitant un seul et unique objectif. Cette technique permet de réaliser des feuilles de lumière de fine épaisseur (jusque $2\mu\text{m}$ environ) limitant au maximum l'excitation des plans hors focus.

1.2.3 La microscopie confocale

Le microscope confocal a été inventé par Minsky et breveté en 1957. Son principe se repose sur deux principes :

1. L'éclairage ponctuel du spécimen, grâce à un faisceau lumineux focalisé.
2. La fluorescence émise par le spécimen est spatialement filtrée à l'aide d'un diaphragme afin d'éliminer toute lumière parasite située hors du plan focal.

A l'époque, la source lumineuse (source blanche) était focalisée sur l'échantillon par le biais d'une lentille ou d'un objectif : le champ éclairé était donc un mono-point. Ainsi, le seul moyen d'obtenir une section optique d'un échantillon était de translater l'échantillon à l'aide d'une platine. L'autre caractéristique de la microscopie confocale consiste en sa sélection spatiale et sa résolution supérieure à la microscopie conventionnelle. En effet, le faisceau est focalisé sur l'échantillon grâce à l'objectif, mais cependant, il n'excite pas uniquement les fluorophores situés dans le plan optique de l'échantillon : si l'on récupère tous les photons issus du phénomène de fluorescence qui a lieu également de part et d'autre du plan optique, nous allons reconstituer une image floue. C'est pour cela que Minsky en 1957 a eu l'idée de sélectionner spatialement les photons émis dans le plan de l'échantillon en insérant un pinhole dans un des plans conjugués au plan de l'échantillon, souvent juste avant la récupération des photons. Cela permet une résolution spatiale réduite dans toutes les directions :

$$r_{latérale} = 0,4 \frac{\lambda}{NA}$$

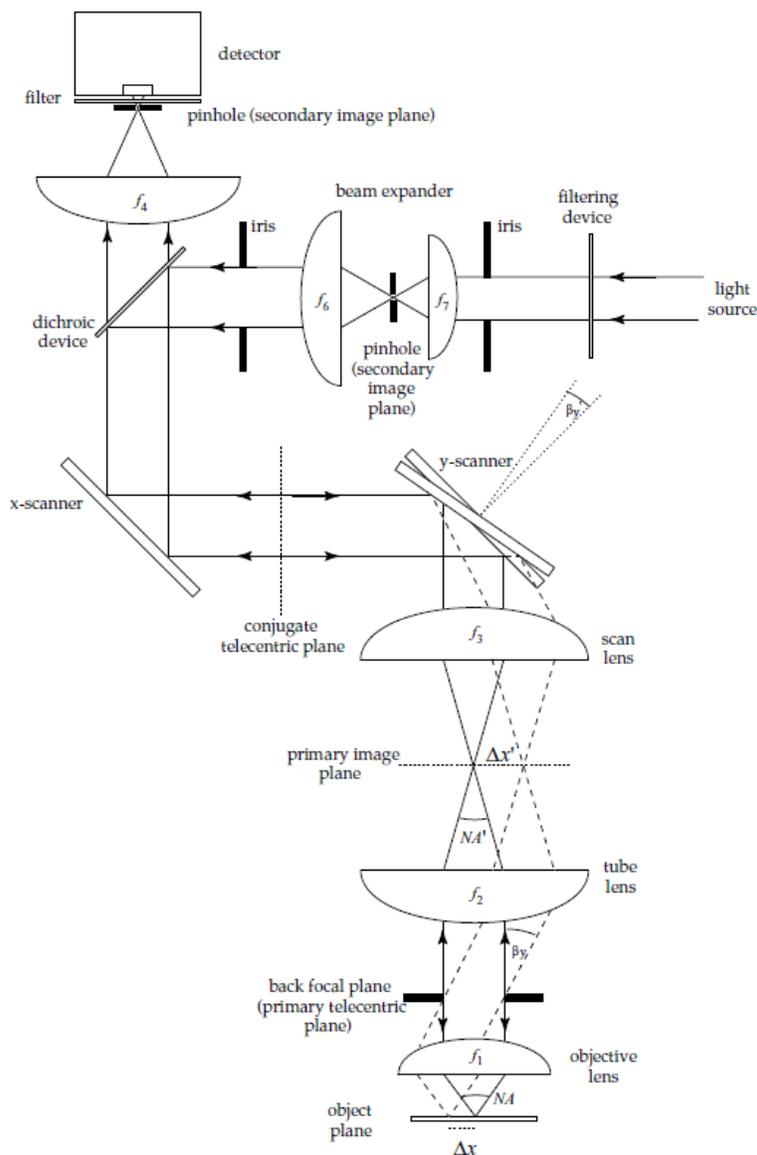
$$r_{axiale} = 1,4 \frac{\lambda}{NA^2}$$

Afin de travailler avec des résolutions spatiales les plus faibles possibles en sortie d'objectif, il faut se placer à la limite de la diffraction. Pour cela, l'ouverture numérique de l'objectif doit être totalement illuminée par le faisceau LASER. Negrean et al. [116] nous propose un critère instrumental pour se placer correctement à la limite de la diffraction : il faut que le diamètre de la pupille arrière de l'objectif soit semblable au diamètre du faisceau à $1/e^2$.

Depuis les années 90, les capacités de mémoire et de calculs des ordinateurs sont telles que nous pouvons enregistrer et traiter un large nombre d'image, en très peu de temps. De plus, la microscopie confocale se fait de manière dynamique : c'est

le faisceau LASER qui vient balayer l'échantillon en deux dimensions, et non une platine qui se translate, ce qui change considérablement le temps de construction de l'image : c'est le Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).

Les techniques actuelles de microscopie confocale consistent donc en un balayage LASER en 2 dimensions sur l'échantillon grâce à des miroirs galvanométriques (200Hz-2kHz). Ces miroirs, aussi appelés scanners (et souvent appariés par deux, un pour balayer l'axe X et l'autre pour balayer l'axe Y) sont placés dans un plan télécentrique conjugué au plan focal arrière de l'objectif (BFP - Back Focal Plane). De cette manière, le faisceau collimaté effectue une rotation autour de l'axe optique dans le BFP de l'objectif : cela a pour conséquence de déplacer le point focal en (X-Y) dans le plan de l'échantillon. Le signal de fluorescence, récupéré par un capteur mono-point de type photodiode est ensuite redécoupé dans le temps afin de reconstruire point par point l'image en temps réel (voir fig.1.8) .



La lumière entre dans le montage confocal par la droite. Un dispositif de filtrage sélectionne au moins une longueur d'onde pour l'excitation des fluorophores dans l'échantillon, et permet d'atténuer l'intensité lumineuse. Un beam expander utilisé pour ajuster la taille du diamètre du faisceau dans le plan focal arrière de l'objectif.

Un miroir dichroïque dévie la voie d'excitation vers la paire de scanners.

Idéalement, les deux scanners sont positionnés au centre des plans conjugués télécentriques. En inclinant le scanner y d'un angle β'_y , le spot laser est décalé de $\Delta x'$ dans le plan image primaire du microscope. La lentille de tube et l'objectif de microscope forment une image du spot laser dans le plan focal objet. La fluorescence détectée suit le même chemin, en inverse, et est descannée en passant par les scanners. La fluorescence passe au travers du dichroïque et est focalisée dans le pinhole afin de filtrer spatialement le signal. Le filtre spectral devant le détecteur laisse passer uniquement la longueur d'onde émise par les fluorophores.

FIGURE 1.8 – Schéma classique d'un Confocal Laser Scanning Microscope [143]

1.3 Les capteurs

Pour détecter nos molécules fluorescentes en mouvement avec des techniques d'illumination champ-large (comme le TIRFM, le HiLo ou le SPIM), nous ne pouvons pas acquérir notre signal sur n'importe quel type de caméra : nous avons besoin de caméras ultra-sensibles, avec une très grande efficacité quantique, un faible bruit de lecture (*readout noise*) et une vitesse d'acquisition élevée. Pour cela, nous avons globalement le choix entre deux types de capteurs :

- Les caméras type EMCCD (Electron Multiplying Charge-Coupled Device) développées pour la première fois par la société Andor dans les années 2000. Ces caméras emploient une technologie qui amplifie « *on-chip* » le signal : les photo-électrons générés par l'aspect CCD sont ensuite multipliés grâce à un mécanisme appelé « *Impact Ionization* ». Cette technologie est reconnue pour être utilisée en condition de faible lumière, et permet un bruit de lecture très faible (<1 électron). Cela dit, l'inconvénient avec les capteurs EMCCD c'est que leur vitesse d'acquisition est anti-corrélée avec le champ de vision et le bruit de lecture. Autrement dit : plus on veut acquérir rapidement, plus le champ de vision doit être petit et plus on aura de bruit. Ceci est la conséquence du mode de lecture des EMCCD en « *global shutter* ». En effet, une caméra CCD va lire l'intégralité de la matrice de pixels en une seule fois : ce qui est assez chronophage car le shutter de la caméra est fermé, pendant la lecture de toute la matrice. Avec les caméras EMCCD, il est possible de choisir le gain multiplicatif (EM gain), afin d'augmenter le signal. Cependant, il faut être très précautionneux car en augmentant le gain, on rajoute également un bruit multiplicatif. Les caméras EMCCD sont d'excellentes caméras pour des applications de microscopie à faible intensité lumineuse, car elles ont un rendement quantique parmi les plus élevés du marché (90%).
- Les caméras type sCMOS (*scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*) développées en 2009 par les grands industriels du domaine : Andor, Fairchild Imaging et PCO Imaging. Cette technologie permet une vitesse d'acquisition (ou *frame rate*) plus rapide grâce à une lecture ligne par ligne appelée *rolling shutter*, un plus grand champ de vue et de plus petits pixels en comparaison avec la technologie EMCCD. Cependant, le bruit de lecture est plus élevé par rapport aux EMCCD, même si les caméras sCMOS ne provoquent aucun

bruit multiplicatif car elles ne possèdent pas de gain. Les caméras sCMOS sont souvent moins chères que les EMCCD et tout à fait adaptées à l'imagerie de molécules uniques. Leur rendement quantique historiquement autour de 60 à 70 % reste nettement plus faible que celui des EMCCD, mais la dernière génération de sCMOS rattrape ce retard avec des rendements de 95% (ORCA-FusionBT, Hamamatsu).

Il est important que nos caméras soient capables d'acquérir le signal avec une fréquence élevée (jusqu'à environ 100Hz). En effet, les facteurs de transcription (TFs) nucléaires diffusant assez rapidement par rapport à des protéines membranaires ($1 - 10\mu\text{m}^2/s$ pour les TFs nucléaires contre $10^{-2}\mu\text{m}^2/s$ pour des protéines membranaires), il faut pouvoir acquérir rapidement le mouvement des molécules. Pour l'étude des facteurs de transcription les conditions optimales sont actuellement autour de 1-10ms [69] afin d'avoir une vitesse d'acquisition assez rapide, mais également un champ d'observation assez grand. Il serait possible de diminuer le temps entre deux images, notamment avec les caméras sCMOS qui peuvent employer un *frame rate* plus élevé. Cela dit, on perdrait en qualité du signal : le temps ne serait pas assez long pour collecter assez de photons d'un émetteur unique. L'échantillonnage temporel a aussi un impact sur la dimension spatiale. En effet, nos facteurs de transcription étant des molécules dites « rapides », entre deux images la particule bouge suffisamment pour apparaître comme une comète : on appelle cela le « flou de bougé ». Ce phénomène est à proscrire car les particules sujettes au flou de bougé auront tendance à ne pas être détectées par les algorithmes de traitement. Une illumination stroboscopique qui illuminerait l'échantillon sur un temps plus court que le temps d'exposition de la caméra permet de diminuer le flou de bougé. Par exemple : si mon illumination ne dure qu'une milliseconde, sur un temps d'exposition de 10ms, la fluorescence captée par le détecteur ne proviendra que de la particule durant 1 ms. Pendant les 9 ms restantes, la particule aura bougé mais il n'y aura pas de fluorescence émise. [40]

Autre point important à ne pas oublier lors de la conception du système optique : l'échantillonnage spatial. En effet, suivant le grandissement de notre objectif, nous devons choisir une caméra avec des pixels suffisamment petits pour échantillonner correctement la PSF, mais aussi suffisamment gros pour ne pas sur-échantillonner et « étaler » les photons. Prenons un exemple : notre objectif a un grandissement $G_{obj} = 100$, $ON=1$, avec une lentille de tube devant la caméra correspondant au standard de l'objectif, alors la taille de mes particules projetées sur la caméra sera

donc égale à :

$$G_{obj} \cdot PSF = G_{obj} \cdot \frac{\lambda}{2ON} \approx 25\mu\text{m}$$

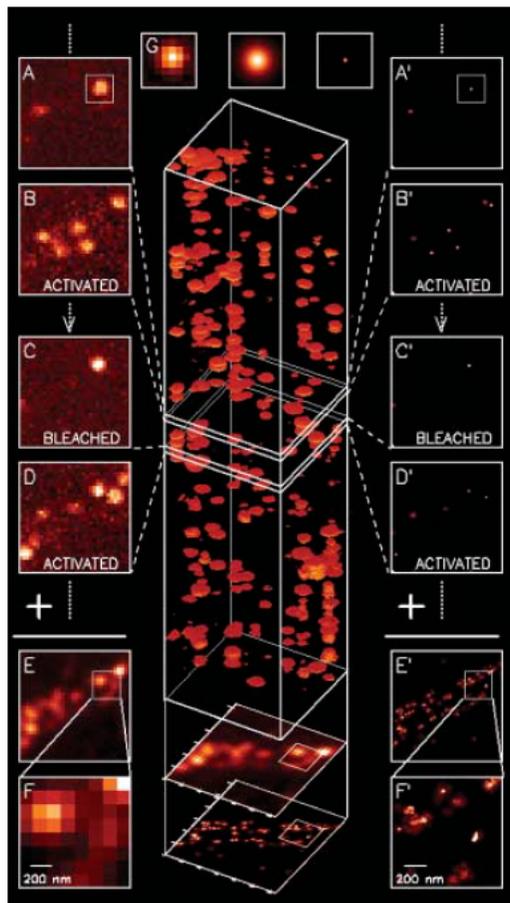
Si l'on considère d'après le théorème de Nyquist qu'il faut minimum 3 par 3 pixels pour échantillonner correctement notre PSF, cela impose que nos pixels caméra aient une taille de 8,3 μm maximum.

1.4 Les techniques de super-résolution

Grâce à toutes ces avancées d'un point de vue technique, nous avons pu voir l'émergence des techniques de super-résolution ces dernières années, et dont les principaux inventeurs William Moerner, Stefan Hell et Eric Betzig ont été récompensés par le prix Nobel de chimie 2014. Les trois techniques de super-résolution récompensées étant les techniques de *Photo-Activated Localization Microscopy* (PALM) ainsi que le *STochastic Optical Reconstruction Microscopy* (STORM) issues des travaux de Moerner et Betzig, ainsi que le Stimulated Emission Depletion Microscopy (STED) par Stefan Hell.

La technique de PALM est utilisée comme technique de super-résolution sur des échantillons fixés. Le qualificatif « super-résolution » vient du fait que l'on arrive à localiser précisément la position d'une molécule fluorescente, connaissant les statistiques de photons d'un émetteur unique. La technique de PALM utilise les propriétés des protéines photo-activables pour n'activer à un instant t qu'une faible proportion des molécules fluorescentes, et ensuite les détecter par une caméra et les localiser avec une précision de 20nm grâce à des logiciels spécifiques. Ensuite les molécules de par leurs propriétés photochimiques vont photo-blanchir, une nouvelle excitation à 405 nm permet de photoconvertir quelques autres fluorophores, qui vont être localisés etc... L'opération est ainsi répétée autant de fois que nécessaire jusqu'à reconstruction complète de l'objet (fig. 1.9 et 1.10) [12, 66].

Le STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy) est une technique alternative permettant le même type de mesures avec des fluorophores de nature différente. En effet, cette technique repose sur le blinking des molécules fluorescentes, qui vont osciller entre un état « dark » et un état d'émission grâce à une activation LASER stochastique, et ce jusqu'au photo-blanchiment. De la même manière que le PALM, cette technique permet d'isoler les molécules une à une, de les détecter, les

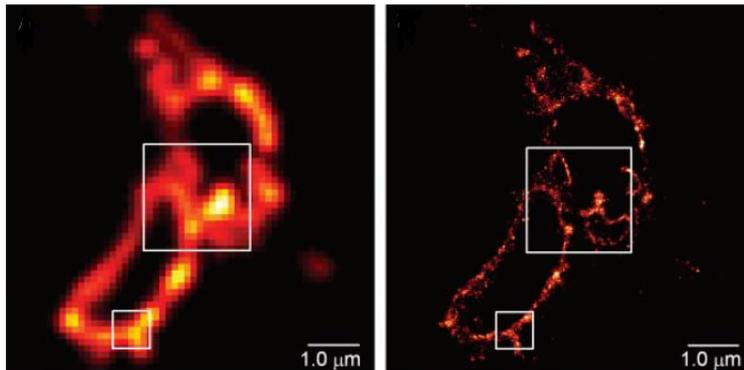


Les protéines d'intérêt fixées ont été marquées avec des protéines photo-convertibles. A-B correspond à l'étape d'activation où l'échantillon est illuminé avec $\lambda = 405\text{nm}$ pour activation stochastique, et ensuite illuminé avec $\lambda = 561\text{nm}$ pour l'imagerie jusqu'au blanchiment des molécules activées. Cette séquence est répétée autant de fois que nécessaire (C-D) jusqu'à blanchiment complet de l'échantillon. E représente la somme de toutes les images en mode « limité par la diffraction ». Les indices A'-F' à gauche correspondent aux images traitées en mode super-résolution : le but étant de repérer le centre de chaque PSF détectée sur chaque image et de les sommer pour reconstruire l'image finale en F'.

FIGURE 1.9 – Principe de PALM (Photo-Activated Localization Microscopy) [12]

localiser et de reconstruire l'objet avec une précision de localisation allant jusqu'à 20 nm sur échantillon fixé.[130]

Les microscopies PALM et STORM sont des techniques de super-résolution basées sur la localisation des molécules grâce à certaines propriétés photo-chimiques des



Protéine transmembranaire CD63 marqué avec la PA-FP Kaede sur cellule COS-7 en microscopie TIRF (à gauche) et en super-résolution PALM (à droite) [12]

FIGURE 1.10 – Microscopie classique (TIRF) vs PALM sur un même échantillon

protéines fluorescentes. Dans la famille de la microscopie de super-résolution, on peut également faire référence aux microscopies SIM (Structured Illumination Microscopy) ([88] et STED (Stimulated Emission Depletion) [64, 76] basées sur une structuration particulière de l'illumination (non développées dans ce mémoire).

En 2008, Manley et al. [100] tire profit de l'activation stochastique des PA-FPs pour étudier la dynamique de molécules : c'est le début de la technique spt-PALM (single-particle tracking Photo-Activated Localization Microscopy). Cette technique permet de diminuer le nombre de protéines fluorescentes actives dans un échantillon, afin de pouvoir se placer en régime de molécules uniques nécessaires pour les techniques de dynamique moléculaire comme le SPT.

Chapitre 2

Etat de l'art du suivi de molécules uniques

Les prémices du Single Particle Tracking (SPT) ont pris place en 1987 dans l'équipe de Geerts [52, 53] à Londres (pour caractériser la dynamique intracellulaire de particules d'or colloïdales). Depuis, le SPT est devenu une méthode puissante pour étudier la diffusion des molécules en cellules vivantes [94]. Le SPT peut être utilisé de différentes manières, soit en ciblant directement la molécule d'intérêt comme Fusco et al. [49] qui pour la première fois, étudie la dynamique moléculaire d'ARN messagers, ou alors, il peut être utilisé de manière « indirecte » avec des sondes inertes comme l'a fait Bancaud et al. [8] en 2009 pour mesurer la structure du nucléoplasme.

Le principe des expériences du SPT est assez intuitif : il consiste à faire un film des déplacements de nos molécules d'intérêt, de détecter les particules sur chaque image, de reconstruire leurs trajectoires, puis d'analyser la structure de leur déplacement au sein de leur milieu. Bien que la logique de la technique soit facilement intelligible, cela ne veut pas dire que ce soit une méthode simple et rapide, les étapes clés nécessitant un réglage fin à chaque étape du processus : la préparation de l'échantillon, la sélection du mode d'imagerie (système optique et enregistrement de données), la détection des particules, la reconstruction des trajectoires, puis enfin l'analyse de la diffusion.

Il existe différentes manières d'analyser les données de SPT, mais les premières étapes sont souvent identiques : en premier lieu la détection des molécules sur les images, la reconstruction des trajectoires et l'analyse

2.1 Détection des particules

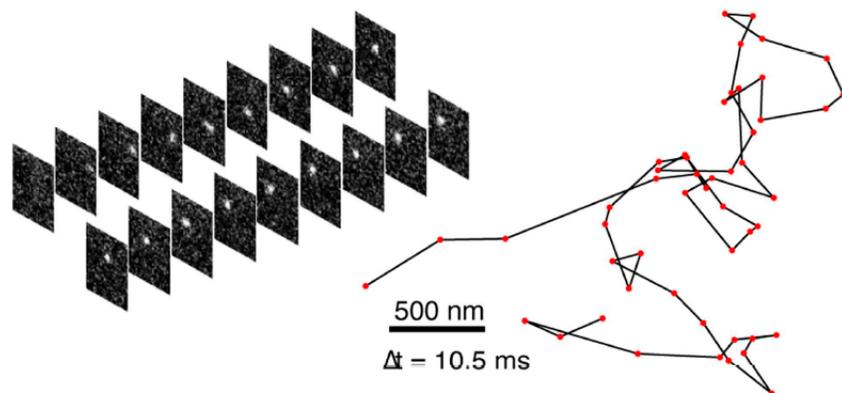


Image d'illustration décrivant le principe du Single Particle Tracking tirée de Izeddin et al. eLife 2014. A gauche est décrit une trajectoire de molécule Dendra2 diffusant librement dans le noyau de cellule U2OS, échantillonnée toutes les 10ms. A droite est représentée la trajectoire reconstruite dans le temps après traitement informatique.

FIGURE 2.1 – Détection et reconstruction des trajectoires [69]

Il existe une grande variété de logiciels permettant le tracking de molécules uniques, que ce soit des logiciels en accès libre sur *Fiji* comme TrackMate [146], *U-Track* [71] ou encore *MOSAIC* [135] ou alors des logiciels home-made développés sur MATLAB ou Python. Jusqu'à présent, il n'y a pas encore de consensus concernant la meilleure méthode pour la détection de molécules uniques. Selon le type de data (2D, 3D...) et la qualité des images, chacun a sa méthode. Cependant nous pouvons tirer un schéma commun à ces différentes méthodes d'analyse. Dans un premier temps, la détection est souvent précédée par une étape de filtrage afin de supprimer le bruit haute fréquence (par exemple à l'aide du filtre gaussien) (voir fig. 2.2 et 2.3). En pratique, il est souvent nécessaire de vérifier que l'utilisation d'un quelconque filtrage ait un intérêt. En effet, dans certaines conditions d'imagerie, le filtrage peut être à l'origine d'un background résiduel qui peut desservir l'étape de détection.

Ensuite vient une étape de segmentation où l'on cherche à récupérer les pixels candidats en appliquant un seuil correspondant à une valeur de niveau de gris. La segmentation est une opération en traitement du signal dont le but est de rassembler les pixels suivant certains critères : pour notre application il s'agit du niveau de gris.

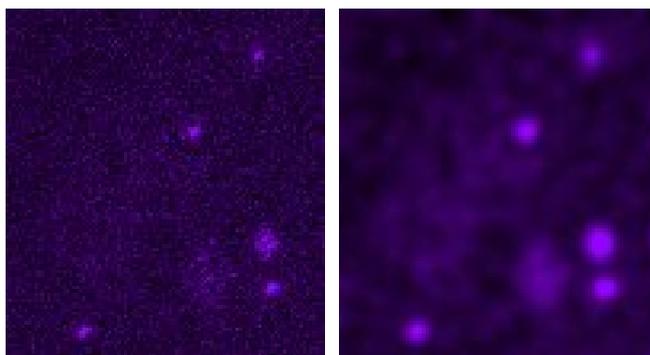


Image représentant des molécules de RPB1-Halo marquée avec les ligands fluorescents JF 549 dans le noyau de cellules U2OS, en régime de molécules uniques. Les images ont été prises sur une sCMOS PCO EDGE 4,2 à 100 images/seconde.

FIGURE 2.2 – Image SPT brute (à gauche), et avec filtre gaussien (à droite)

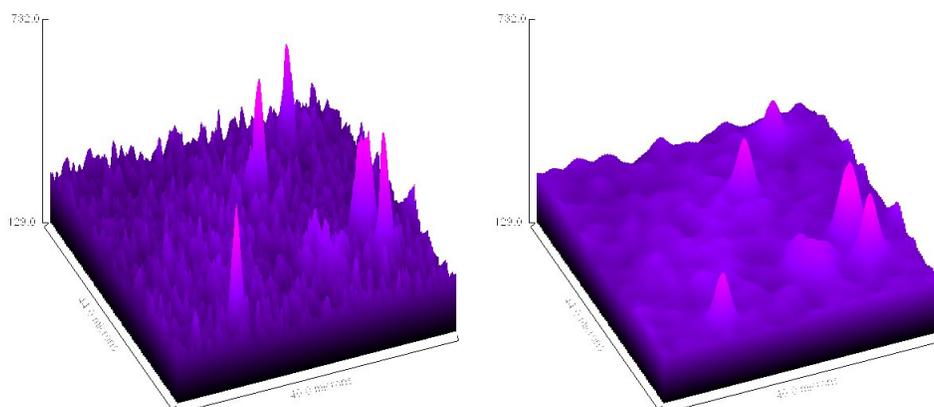


Image représentant des molécules de RPB1-Halo marquées avec les ligands fluorescents JF 549 dans le noyau de cellules U2OS, en régime de molécules uniques. Les images ont été prises sur une sCMOS PCO EDGE 4,2 à 100 images/seconde. En z est codé le niveau de gris.

FIGURE 2.3 – Représentation 3D d'une image brute (à gauche) et filtrée (à droite).

L'objectif final étant de distinguer les objets les plus brillants, donc nos molécules fluorescentes, du fond de l'image.

Les pixels candidats sont ensuite regroupés en cluster pour définir une forme. Cette forme va être testée pour savoir si elle correspond à des conditions de taille et de symétrie particulière définie par la PSF théorique : une première sélection a lieu. Ensuite, il faut définir la position de l'objet segmenté, et pour cela différentes

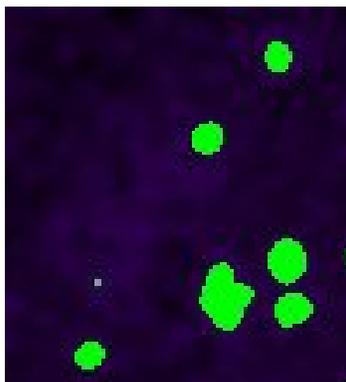


Image d'illustration pour expliciter le principe de la segmentation (ici réalisée sur Image J) sur l'image de RPB1 précédente. Seuls sont considérés comme candidats les pixels dont le niveau de gris est supérieur à un certain « seuil » défini par l'utilisateur.

FIGURE 2.4 – Image filtrée, puis segmentée (les pixels candidats sont colorés en vert)

méthodes ont été proposées : soit on va directement essayer d'ajuster une gaussienne 2D avec les caractéristiques de la PSF attendue à nos formes candidates avec des algorithmes comme celui de Levenberg-Marquardt [2, 137] ou alors on va calculer le centre de masse de cette forme sans chercher à ajuster un modèle [82, 55]. De nombreux scientifiques ont voulu comparer la pertinence de ces différentes méthodes [23, 131]. Cependant, il est difficile de mettre en avant une méthode par rapport à une autre : l'efficacité des méthodes dépendant surtout de la qualité de l'image, de ces conditions d'imageries (2D ou 3D par ex) mais aussi de l'échantillon lui-même. Par exemple, pour l'étude de facteurs de transcription dits « rapides » (jusqu'à $10\mu\text{m}^2/\text{s}$), un flou de bougé peut apparaître sur les images [69]. Les molécules apparaissent alors comme des comètes, allongées dans une direction. Si l'on cherche à ajuster un modèle gaussien 2D, certaines formes seront rejetées. Pour éviter d'avoir des faux négatifs, il est préférable dans ce cas précis, de calculer le centre de masse des molécules.

D'autres méthodes de détection des molécules sont également disponibles, on peut citer les méthodes de corrélation [54], ou la méthode de la « somme des valeurs absolues » [16] moins utilisées pour nos applications.

Une fois nos formes candidates sélectionnées et leurs positions calculées sur chaque image du film (fig. 2.5), les données sont répertoriées dans un tableau.

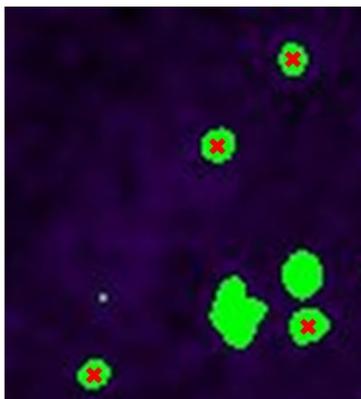


Image d'illustration explicitant le principe de détection des molécules uniques : le centroïde (en rouge) de chaque forme sélectionnée (en vert) est calculé et enregistré.

FIGURE 2.5 – Détection des molécules uniques

2.2 Reconstruction des trajectoires

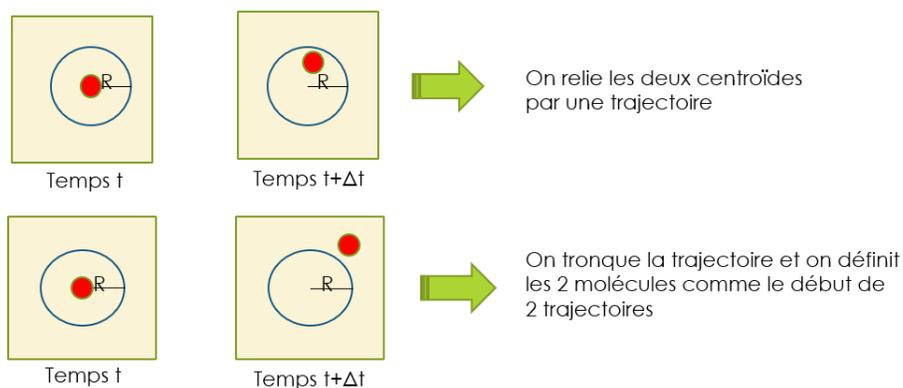
Les particules de chaque image détectées, il faut reconstruire les trajectoires en identifiant la position d'une même molécule dans les images prises à des temps différents. Et pour cela il existe également plusieurs méthodes toutes décrites dans l'article de Chenouard et al. [25] qui ne seront pas toutes explicitées ici. On peut les regrouper en trois diverses catégories :

- Les algorithmes de traçages (plus communément appelé *tracking* par abus de langage) basés sur la méthode du « *plus proche voisin* ».
- Les algorithmes plus élaborés qui prennent en compte un coefficient de diffusion attendu, ou maximum.
- Et d'autres algorithmes plus exotiques... [25]

1. Les algorithmes de traçage basés sur la méthode du « *plus proche voisin* » sont relativement intuitifs. En effet, si j'identifie une particule i de coordonnées (x_i, y_i) sur l'image N , je dois chercher dans l'image $N + 1$ la particule la plus proche de la position (x_i, y_i) et je les relie ensemble. Cette méthode simpliste fonctionne bien sur des images à faible densité de molécules, dont les déplacements sont lents et où les croisements entre particules sont peu fréquents. Dans notre cas, la densité des molécules fluorescentes est relativement élevée (plus d'une molécule par μm^2) et parfois même inhomogène dans le champ de vision ce qui augmente la probabilité de croisements entre particules. De plus, leurs

coefficients de diffusion peuvent être élevés (jusqu'à $10\mu\text{m}^2/\text{s}$) ce qui fait que la distance entre chaque « pas » peut être relativement grande, c'est pour cela que nous avons tendance à utiliser des algorithmes plus complexes.

2. Les algorithmes de tracking basés sur un coefficient de diffusion maximum attendu (ou algorithmes basés sur des prédictions) sont souvent utilisés. De manière schématique, ils s'appuient sur les principes suivants (fig. 2.6) :



Deux cas de figures possibles : soit la molécule au temps $t + \Delta t$ est dans le cercle de rayon R et de centre la position de la molécule au temps t , et dans ce cas on relie les deux positions des molécules pour former la trajectoire. Soit la molécule à l'instant $t + \Delta t$ n'est pas dans le cercle précédemment décrit et alors on tronque la trajectoire au temps t pour en commencer une nouvelle au temps $t + \Delta t$.

FIGURE 2.6 – Reconstruction des trajectoires par des algorithmes basés sur des prédictions

L'utilisateur donne au logiciel de tracking une prédiction quant au coefficient de diffusion attendu (ou de manière analogue, le rayon R qui définit le cercle dans lequel l'algorithme doit chercher la particule à $t + 1$). Le logiciel prend donc comme référence la particule i de coordonnées (x_i, y_i) sur l'image N . Sur l'image $N + 1$, il sonde dans le cercle de centre (x_i, y_i) et de rayon R , s'il y a présence ou non de particules. Si une particule est trouvée, le logiciel considère qu'il s'agit de la particule i qui s'est déplacée : il relie donc les positions et les répertorie comme une seule trajectoire. S'il n'y a pas de particule dans ce cercle, l'algorithme s'arrête et considère une autre particule. Si deux molécules se trouvent dans ce cercle, l'algorithme ne peut décider : il choisit donc de définir les deux molécules comme le début de deux nouvelles trajectoires.

Dans cette thèse, le traçage des molécules a été réalisé avec un algorithme appelé MTT pour *Multiple Target Tracing* [138]. Il appartient à la même famille que les algorithmes basés sur les prédictions, mais il est plus élaboré. En effet, avec cet algorithme, les étapes de détection et de reconnection des particules ne sont pas décorréelées : le logiciel permet une détection, une localisation et un tracking combinés, avec des boucles de rétroaction afin de relier des particules qui n'auraient pas trouvé de trajectoire à laquelle se rattacher. Les particularités et l'optimisation de l'utilisation du logiciel MTT seront développés dans la section 3.2.2.1.

2.3 Analyse de la diffusion

Une fois que le logiciel a reconstruit les trajectoires, et les a référencé dans un tableau, il faut pouvoir analyser le mouvement des molécules et en retirer des informations. Pour cela il existe différentes techniques très différentes les unes des autres :

- Les techniques basées sur l'étude des MSD (*Mean Square Displacement*) [124, 112, 93, 111, 18, 60, 114]
- Les techniques basées sur les inférences Bayésiennes et les modèles du type chaînes de Markov cachées (*HMM - Hidden Markov Models*)[113, 141, 140, 14, 121]
- Les cartes d'inférence (Inferring Maps) des coefficients de diffusions[105, 106, 39, 45]

Dans cette thèse, nous utiliserons les techniques d'analyse par l'étude des MSD, c'est pourquoi elles seront davantage explicitées dans ce paragraphe. Nous avons choisi cette technique, car nous souhaitons pouvoir comparer les résultats issus des techniques de *Single Particule Tracking* et de la *Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Pour cela, nous devons avoir des paramètres de mesures comparables, comme nous allons le voir dans la suite.

2.3.1 Les techniques basées sur l'étude des MSD

Premièrement, pour comprendre et mieux se représenter les techniques d'analyses de trajectoires, commençons par prendre l'exemple de diffusion le plus simple que l'on connaisse, à savoir la diffusion brownienne. La diffusion brownienne (ou diffusion libre), découverte en 1827 par le botaniste Brown pendant qu'il observait des

particules de pollen au microscope, qualifie un mouvement aléatoire, où les molécules ne sont soumises à aucune force d'interaction, mis à part les chocs qu'elles subissent entre elles ou au contact d'une paroi. C'est un modèle qui sert à décrire le comportement des gaz par exemple. Le mouvement Brownien dans son état le plus basique peut-être entièrement décrit par D , son coefficient de diffusion. Le coefficient correspond à la zone « visitée » par la molécule par unité de temps : elle est homogène à des m^2/s . D'ailleurs l'équation de Stokes-Einstein appliquée à un mouvement brownien nous donne la valeur théorique de D pour une particule modélisée comme étant sphérique de rayon r_i diffusant librement dans un milieu liquide de viscosité μ_j , grâce à la formule :

$$D_{i,j} = \frac{kT}{6\pi r_i \mu_j} [m^2/s] \quad (2.1)$$

avec k la constante de Boltzmann, et T la température en Kelvin.

La diffusion brownienne est probablement la diffusion la plus étudiée et la plus référencée. Pour que l'on puisse caractériser une diffusion inconnue de « libre » ou « brownienne », différentes méthodes existent mais la plus connue est la méthode par calcul du MSD. Le MSD (*Mean Square Displacement*) est une mesure de la déviation de la position de la particule au cours du temps, par rapport à une position de référence. De manière plus imagée, on peut considérer le MSD comme une mesure de la surface de l'environnement qui est explorée par la particule pour un laps de temps donné.

Considérons une trajectoire comptant au total N points de mesure. Soit $\vec{r}_i = (x_i, y_i)$ la position de la particule à un instant $t = i.\Delta t$, Δt étant le délai entre chaque acquisition, et $i = 1, \dots, N$, N étant le nombre de point au total dans la trajectoire. La définition la plus répandue du MSD est donnée par [111] :

$$TA - MSD(n\Delta t) = \bar{\rho}_n = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} (\vec{r}_{i+n} - \vec{r}_i)^2, n = 1, \dots, N-1 \quad (2.2)$$

Cette définition du MSD est appelée « Time-Averaged MSD » ou TA-MSD, car elle définit une valeur de MSD pour chaque $n\Delta t$ pour une seule et unique trajectoire. Prenons l'exemple d'une trajectoire de 10 points : le $MSD(1\Delta t)$ est une moyenne de 9 distances, le $MSD(2\Delta t)$ est une moyenne sur 8 distances et ainsi de suite jusque $MSD(9\Delta t)$ qui est la distance entre la première et la dixième position. D'un point

de vue statistique, l'erreur standard est croissante : c'est à dire que les valeurs de MSD sont de moins en moins précises pour des valeurs élevées de $n\Delta t$. [111]

Il existe une autre définition du MSD, appelée « Ensemble-Average MSD » ou EA-MSD, qui elle s'applique à toute une population de trajectoire. Dans ce cas, le MSD n'est pas une moyenne temporelle sur les $n\Delta t$, mais une moyenne spatiale sur l'ensemble N_{traj} d'une population à un instant $t = n\Delta t$ donné.

$$EA - MSD(n\Delta t) = \frac{1}{N_{traj}} \sum_{j=1}^{N_{traj}} \left(\overrightarrow{r_j(n\Delta t)} - \overrightarrow{r_j(0)} \right)^2, j = 1, \dots, N_{traj} \quad (2.3)$$

Le EA-MSD est souvent utilisé pour caractériser des gaz par exemple, notamment pour décrire des expériences qui évoluent dans le temps, comme dans le cas d'une diffusion de gaz dans une enceinte close, ou des processus de diffusion irréversibles en général.

Lorsque le TA-MSD est égal au EA-MSD, on dit que le système est ergodique. Cela veut dire que la moyenne statistique d'une grandeur mesurée à un instant donné et égale à la moyenne d'un grand nombre de mesures prises au cours du temps. Le système peut donc être étudié de manière identique soit en suivant une molécule au cours du temps pendant $n\Delta t$, soit en étudiant n molécules à un seul instant t .

Le TEA-MSD (Time-Ensemble-Averaged MSD) est la combinaison du EA-MSD et du TA-MSD. Il correspond à la moyenne des TA-MSD sur l'ensemble des trajectoires calculée pour chaque $n\Delta t$. Il se définit de la façon suivante :

$$TEA - MSD = \frac{1}{N_{traj} \cdot (N - n)} \sum_{j=1}^{N_{traj}} \sum_{i=1}^{N-n} \left(\overrightarrow{r_{i+n}^{(j)}} - \overrightarrow{r_i^{(j)}} \right)^2 \quad (2.4)$$

Pour la diffusion brownienne, on a :

$$TA - MSD = 4Dt \quad (2.5)$$

$$EA - MSD = 4Dt \quad (2.6)$$

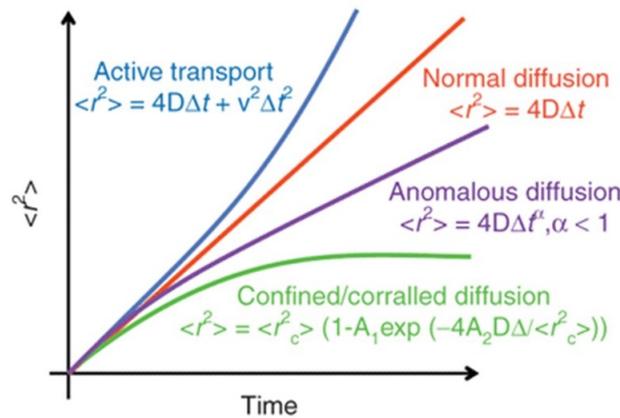
Cela veut dire que la diffusion brownienne est un processus ergodique. De plus, on remarque le TA-MSD et le EA-MSD sont proportionnels au temps, et la pente de la droite nous donne directement le coefficient de diffusion D. Le calcul du MSD

nous permet donc d'identifier rapidement une diffusion brownienne, et de retrouver D le coefficient de diffusion.

Cependant, dans des milieux complexes tels que le milieu cellulaire, on remarque que les protéines ne diffusent pas de manière brownienne [67][17, 155]. En effet, le MSD nous donne une courbe sous forme de fonction puissance telle que :

$$MSD(t) = 4Dt^\alpha, 0 \leq \alpha \leq 1 \quad (2.7)$$

Une diffusion dite anormale correspond à une diffusion qui n'est pas libre ou brownienne. Cela dit, il existe différents types de comportements anormaux qui ont été identifiés, on peut citer le transport actif ou encore la diffusion confinée (voir fig. 2.7).



Description des différents types de diffusions possibles en biologie : le transport actif (par exemple : protéines moteurs sur actine), la diffusion libre, la diffusion anormale qui correspond à un mouvement contraint, et la diffusion confinée (par exemple : une protéine qui est « piégée » ou lors d'une réaction)

FIGURE 2.7 – MSD selon différents types de diffusion

Le transport actif peut représenter le mouvement d'une protéine moteur sur des micro-tubules par exemple : il s'agit là généralement d'une diffusion dirigée et à laquelle on apporte de l'énergie. Une diffusion confinée représente par exemple la diffusion d'une protéine qui est piégée dans une certaine zone.

Il existe différentes explications au phénomène d'anomalité [134, 132, 133] [110, 67] et différents modèles d'interprétation que nous verrons dans la partie 4.2.

Mais revenons à notre courbe de MSD. Il existe diverses manières d'exploiter la courbe de MSD. Le TEA-MSD nous permet d'avoir une idée du comportement moyen de l'ensemble de nos trajectoires. De plus, la courbe de MSD d'une particule pouvant être très bruitée ou imprécise, dû au faible nombre de points dans une trajectoire, faire la moyenne sur un ensemble de molécules nous permet d'avoir une courbe plus lisse et donc plus facile à ajuster par un modèle mathématique. Cela dit, avoir un comportement moyen d'un ensemble de molécule peut paraître anti-nomique de l'étude en molécules uniques, qui justement nous permet d'avoir l'accès aux informations de chaque trajectoire. En 2010, Michalet et al. [111, 112] publie une méthodologie pour exploiter correctement les MSD des molécules uniques et obtenir la meilleure évaluation de D pour chaque molécule étudiée malgré les imprécisions sur les MSD pour $n\Delta t$ élevé. Michalet nous informe sur l'importance d'intégrer l'incertitude de localisation dans les résultats d'une analyse par MSD. Premièrement en SPT, il faut différencier l'incertitude de localisation statique et l'incertitude de localisation dynamique. La différence entre les deux est que la première considère l'erreur sur la localisation d'une particule fixée, et la deuxième celle d'une particule en mouvement. L'incertitude de localisation statique d'une détection est défini par :

$$\sigma_0 = \frac{s_0}{\sqrt{N}} \quad (2.8)$$

Avec s_0 paramètre spatial de la PSF, tel que $2\sqrt{2\ln 2}.s_0$ est la largeur à mi-hauteur de la gaussienne 2D, et N étant le nombre de photons enregistrés dans la PSF, qui peut aussi être calculé par :

$$N = 2\pi \left(\frac{s_0}{a}\right)^2 I_0 \quad (2.9)$$

Avec a la dimension du pixel, et I_0 l'intensité maximale de la gaussienne.

L'incertitude de localisation statique est toujours plus faible que la dynamique. En effet, une particule en mouvement va être détectée avec moins d'intensité, car les photons qu'elle émet seront étalés sur une plus grande zone, dû à la diffusion. La formule théorique de l'incertitude de localisation dynamique est donnée par :

$$\sigma = \sigma_0 \sqrt{1 + \frac{Dt_E}{s_0^2}} \quad (2.10)$$

Avec D , le coefficient de diffusion de la molécule, et t_E le temps d'exposition.

Si l'on introduit l'erreur de localisation dynamique dans la probabilité de distribution de déplacement qui décrit la diffusion d'une molécule, on retrouve une expression du MSD modifiée telle que :

$$MSD(t) = \epsilon + 4Dt \quad (2.11)$$

$$\epsilon = 4\sigma^2 \quad (2.12)$$

Cela veut dire que l'erreur de localisation introduit un *offset* dans la courbe de MSD : l'ordonnée à l'origine de la courbe de MSD nous donne donc de manière rapide l'erreur de localisation dynamique. Un autre moyen de calculer ϵ , c'est de passer par σ_0 en estimant l'erreur de localisation sur des particules fixées, puis de calculer σ par la formule (10).

Pour déterminer D , le coefficient de diffusion, il faut donc ajuster la courbe avec une droite affine de type $y = ax + b$, mais la question est : sur combien de points de ma courbe j'ajuste la droite affine ? En effet, les points de la courbe de MSD peuvent être très bruités, surtout en début de courbe ($MSD(1\Delta t), MSD(2\Delta t)$) et en fin de courbe en fonction du nombre de points dans la trajectoire. Michalet nous propose une valeur discriminante p_{min} qui détermine le nombre de points minimal à considérer pour l'ajustement par un modèle linéaire, telle que :

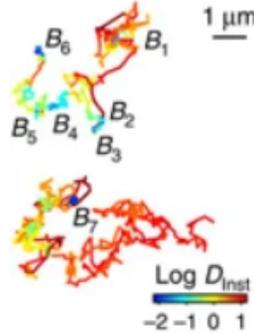
$$p_{min} = E(2 + 2, 7x^{0,5}) \quad (2.13)$$

Avec l'erreur de localisation réduite :

$$x = \frac{\sigma^2}{D\Delta t} \quad (2.14)$$

Par exemple, pour une erreur de localisation dynamique de 70nm, un coefficient de diffusion de $10\mu\text{m}^2/\text{s}$ et un temps d'acquisition de 10ms, nous obtenons un p_{min} de 2 points. Sachant qu'il est plus prudent d'éviter de considérer les 2 premiers points de la courbe de MSD car ils sont sujets au bruit, cela nous donne une indication précise : il faut ajuster le modèle linéaire sur au moins les 4 premiers points de la courbe de MSD (jusque $MSD(4\Delta t)$). Le coefficient de diffusion D calculé de cette manière est souvent appelé $D_{instantané}$ car il ne considère que le début de la courbe de MSD. Michalet propose également une méthode de calcul de $D_{instantané}$ sur une fenêtre glissante tout le long de la trajectoire, afin d'avoir une idée du coefficient de

diffusion en chaque point de la trace. Cela est intéressant pour l'étude de molécules complexes aux comportements non linéaires comme celles que l'on étudie. [111, 118]



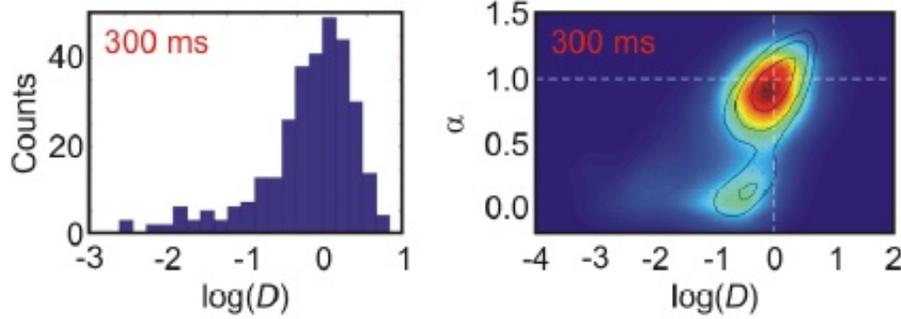
Certains logiciels peuvent calculer le coefficient de diffusion (ici D_{inst}) sur une fenêtre temporelle glissante. Cela est utile lorsque les trajectoires sont très longues, pour caractériser les différents comportements de la molécule au cours du temps.

FIGURE 2.8 – Calcul du $D_{instantané}$ sur une fenêtre temporelle glissante [118]

Il existe différentes manières de représenter les données extraites de ce type d'analyse par MSD. Dans cette thèse, nous allons nous inspirer des travaux de D. Normanno [118] et F. Etoc [41] à savoir une représentation sous forme d'histogramme de $\log D_{instantané}$. Dans le cas de diffusion type anomal, le MSD est donc sous la forme $MSD(n\Delta t) = \epsilon + 4Dt^\alpha$, nous pouvons suivre la procédure suivante pour récupérer les paramètres de diffusion [118][41] :

- Pour le coefficient de diffusion $D_{instantané}$, nous pouvons procéder de la même manière que dans le cas brownien, à savoir un ajustement par une droite affine sur minimum 4 points de la courbe de MSD.
- Pour l'erreur de localisation ϵ , il suffit de récupérer l'ordonnée à l'origine qui est égal à 4σ .
- Pour le coefficient d'anomalie α , nous pouvons dans un premier temps passer l'équation $MSD(n\Delta t) = \epsilon + 4Dt^\alpha$ sous forme logarithmique. Ainsi, d'une courbe fonction puissance, nous passons à une courbe linéaire de pente α . La déviation standard augmentant pour les $n\Delta t$ croissants, nous savons que la fin de la courbe $\log MSD$ est très bruitée. Pour éviter des erreurs, nous pouvons ajuster un modèle linéaire sur le premier tiers de la courbe du $\log MSD$ et récupérer la pente qui nous donne α . [41, 118]

Ainsi nous pouvons représenter $D_{instantané}$ et α sous forme d'histogrammes ou encore sous forme de nuage de points α fonction de $\log D_{instantané}$ (fig. 2.9)



Figures tirées de Etoc et al. Nat. Met. 2018. Représentent les modes de représentation des paramètres D et α utilisés, et qui seront repris dans cette thèse.

FIGURE 2.9 – Mode de représentation de $D_{instantané}$ et α : à gauche représentation des histogrammes des $\log D$ et à droite nuage de points α vs $\log D$ [41]

Il existe d'autres méthodes d'analyses basées sur le MSD, notamment le logiciel *Spot On* [60] qui permet une solution clé-en-main de l'analyse de nos trajectoires, avec l'avantage de pouvoir traiter différents types de formats d'entrée. *Spot On* est un logiciel basé sur le calcul et l'analyse de la distribution des déplacements des molécules, ce qui est une variante proche du MSD (sans aspect de moyennage, sans mise au carré).

Dans l'hypothèse d'une diffusion brownienne, la probabilité qu'une particule commence sa course à l'origine et finisse à la position $r = (x, y)$, est définie par :

$$P(r, \Delta\tau) = \frac{r}{2(D\Delta\tau + \sigma^2)} e^{\frac{-r^2}{4(D\Delta\tau + \sigma^2)}} \quad (2.15)$$

avec $\Delta\tau = n\Delta t$ multiple de l'intervalle de temps entre deux images.

L'idée du logiciel *Spot On* consiste à analyser la distribution des déplacements de l'ensemble des particules, et d'ajuster des modèles afin de récupérer les informations relatives à la diffusion de plusieurs populations décrites par leurs coefficients de diffusion (D) et leurs fractions (F) respectives (la somme des fractions vaut 1). Le logiciel nous donne le choix entre deux modèles (voir fig. 2.10) :

1. Un modèle incluant deux populations : une libre et une fixée

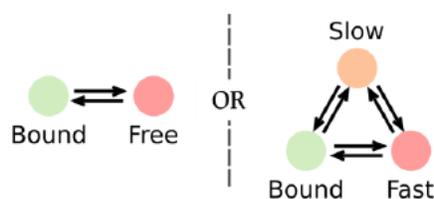
$$\begin{aligned}
 P_2(r, \Delta\tau) = & F_{BOUND} \frac{r}{2(D_{BOUND}\Delta\tau + \sigma^2)} e^{\frac{-r^2}{4(D_{BOUND}\Delta\tau + \sigma^2)}} \\
 & + Z_{CORR}(1 - F_{BOUND}) \frac{r}{2(D_{FREE}\Delta\tau + \sigma^2)} e^{\frac{-r^2}{4(D_{FREE}\Delta\tau + \sigma^2)}}
 \end{aligned} \tag{2.16}$$

avec Z_{CORR} une fonction qui a pour but de corriger le biais induit par l'effet de sortie du plan focal qui mène à une sur-estimation des molécules qui sortent définitivement : en effet une probabilité importante des molécules entrent, sortent et réentrent dans le plan focal. *Spot On* propose une méthode basée sur des simulations et un système d'abaque pour différents coefficients de diffusion afin de corriger ce phénomène.

2. Un modèle incluant trois populations : une libre rapide, une libre lente, et une fixée

$$\begin{aligned}
 P_3(r, \Delta\tau) = & F_{BOUND} \frac{r}{2(D_{BOUND}\Delta\tau + \sigma^2)} e^{\frac{-r^2}{4(D_{BOUND}\Delta\tau + \sigma^2)}} \\
 & + Z_{CORR_{SLOW}} F_{SLOW} \frac{r}{2(D_{SLOW}\Delta\tau + \sigma^2)} e^{\frac{-r^2}{4(D_{SLOW}\Delta\tau + \sigma^2)}} \\
 & + Z_{CORR_{FAST}} (1 - F_{BOUND} - F_{SLOW}) \frac{r}{2(D_{FAST}\Delta\tau + \sigma^2)} e^{\frac{-r^2}{4(D_{FAST}\Delta\tau + \sigma^2)}}
 \end{aligned} \tag{2.17}$$

Le logiciel *Spot On* fait donc l'hypothèse que les différentes populations ont respectivement une diffusion de type brownienne. Ici, l'anomalie de la diffusion des populations individuelles n'est pas considérée, ce qui est un parti pris. *Spot On* a été développé spécialement pour l'étude des facteurs de transcription qui possèdent au



Deux choix disponibles pour l'ajustement des données sur *Spot On*. Soit libre/fixé ou libre rapide/libre lent/fixé.

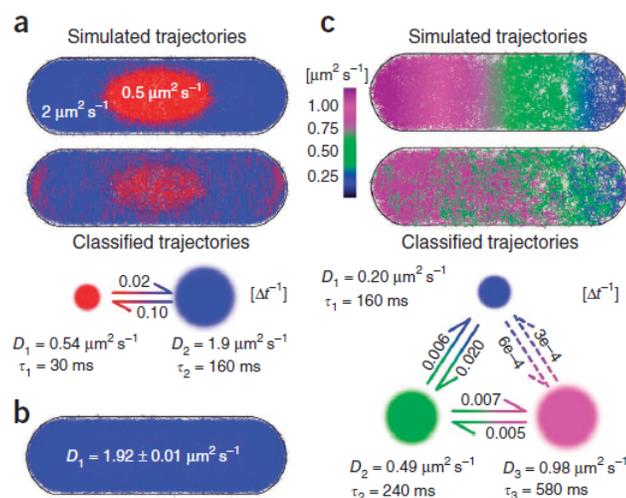
FIGURE 2.10 – Modèles disponibles sur le logiciel d'analyse *Spot On* [60]

minimum deux états : un état fixé qui peut correspondre à une molécule en interaction, et un ou deux états libres. Les facteurs de transcription sont reconnus pour avoir une diffusion rapide, ce qui cause parfois des biais dans l'analyse par SPT : le logiciel *Spot On* permet de corriger les biais de mesures dus aux allées et venues dans le plan focal qui donnent lieu à des trajectoires incomplètes, et cela grâce à des abaques basées sur des modélisations.

2.3.2 Les techniques basées sur les inférences Bayésiennes et les modèles du type chaînes de Markov cachées (*HMM - Hidden Markov Models*)

Une autre branche de l'analyse des trajectoires consiste à utiliser les inférences Bayésiennes. Les Chaînes de Markov décrivent un système à multiples états (par exemple états A et B) et les transitions pour passer d'un état à un autre (A vers B, B vers A) ou d'un état sur lui même (A vers A, et B vers B), avec une condition très importante : la transition à un instant t ne dépend pas de la transition à l'état $t - 1$ (le système n'a pas de mémoire). Il serait possible de décrire une trajectoire en la découpant en un certain nombre d'états et une probabilité de transitions entre chacun d'entre d'eux : par exemple, je peux décrire ma trajectoire comme étant libre à 80% du temps avec un certain coefficient de diffusion D_{free} et fixée à 20% du temps avec un coefficient de diffusion D_{bound} . Les Chaînes de Markov *Cachées* décrivent un système à multiples états ainsi que leurs transitions pour passer d'un état à un autre sauf que les états et les transitions ne sont pas connus. Nous n'avons accès qu'aux observables qui répondent à ces chaînes de Markov. Afin de retrouver les états ainsi que les transitions qui régissent ce modèle, on utilise les inférences Bayésiennes. La

statistique Bayésienne nous permet de calculer la probabilité des causes à partir des observables : c'est pour cela qu'elle est particulièrement bien adaptée aux Chaînes de Markov Cachées. Les mathématiques complexes qui se cachent derrière ces algorithmes ne seront pas explicités dans cette thèse, car ils ne sont pas essentiels à la compréhension des mes travaux. Cela dit, on peut citer les travaux de Persson [121] qui a développé un algorithme d'inférence bayésienne pour des traitements de Chaînes de Markov Cachées, nommé *vbSPT*, afin d'identifier le nombre d'états et le nombre de transitions associées de trajectoire issues du SPT. La théorie de cette méthode repose sur le fait qu'une particule peut avoir plusieurs états le long de sa trajectoire. Les problématiques qui se posent sont donc : combien d'états peut prétendre prendre une particule au cours de sa trajectoire ? et dans le cas des trajectoires courtes (par exemple pour un marquage nucléaire) est-il possible de voir les transitions ? Dans la plupart des algorithmes, c'est l'utilisateur qui teste les modèles (2 ou 3 populations, anomalie ou pas etc...) et qui juge souvent grâce à un critère mathématique comme le BIC (Bayesian Information Criterion) ou le AIC (Akaike Information Criterion) la pertinence du modèle, comme c'est le cas avec *Spot On* [60] par exemple. *vbSPT* de son côté permet de calculer le meilleur modèle possible avec un autre critère appelé le « *maximum evidence criterion* », et cette technique montre une grande robustesse notamment pour classifier des états dont les propriétés diffusives sont assez proches (voir fig.2.11). Cela dit ce genre de techniques nécessite des trajectoires assez longues pour pouvoir observer les transitions, ce qui est un facteur limitant.



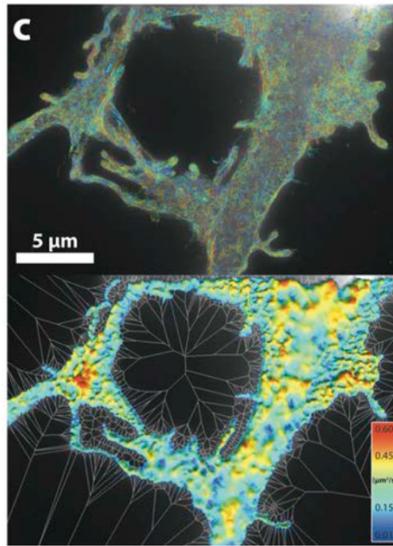
Les variations spatiales des coefficients de diffusion initiaux sont différentes pour les trois cas : en (a) les coefficients lents ($D=0,5\mu\text{m}^2/\text{s}$) sont contenus dans une structure semblable à un noyau, les coefficients plus rapides ($2\mu\text{m}^2/\text{s}$) étant localisés en périphérie. En (b) est représenté le cas (a) sans région nucléaire. En (c) l'auteur a représenté un dégradé de coefficient de diffusion allant de $1\mu\text{m}^2/\text{s}$ à $0,25\mu\text{m}^2/\text{s}$.

Nous remarquons que les trajectoires classifiées par l'algorithme vbSPT sont relativement proches de la modélisation de base.

FIGURE 2.11 – vbSPT : une méthode d'analyse des trajectoires par inférences bayésiennes [121]

2.3.3 Les cartes d'inférences ou Inferring Map

Les mathématiques qui se cachent derrière les cartes d'inférences sont semblables à ce qui a été décrit précédemment pour les inférences bayésiennes. Cela dit c'est le mode de représentation qui change : on vient reconstruire notre image de départ et on cartographie les régions de la cellule selon le coefficient de diffusion par exemple. On ne pouvait pas terminer ce paragraphe sans citer les travaux de El Beheiry avec InferenceMAP [39] (voir fig.2.12) ou encore Lvet avec son algorithme SR-Tesseler [85]. Ces techniques sont intéressantes car elles permettent de localiser dans l'échantillon les comportements des molécules : cela nous donne de précieuses informations quant à la structure locale de l'environnement cellulaire en fonction de nos protéines d'intérêt. Cette technique est un parfait complément aux techniques d'analyses basées sur les MSD par exemple car elle apporte une vision spatiale du phénomène au sein de la cellule.



(Haut) Carte des interactions potentielles calculée par le logiciel InferenceMAP des récepteurs glycine dans une cellule COS-7. (Bas) Représentation 3D de l'amplitude des forces à la membrane de la cellule.

FIGURE 2.12 – InferenceMAP : une cartographie spatiale des paramètres dynamiques mesurés dans une cellule [39]

Chapitre 3

Etat de l'art de la spectroscopie de corrélation par fluorescence

Le principe de la FCS implémentée en microscopie repose sur l'auto-correlation temporelle des fluctuations du signal émanant des molécules fluorescentes diffusant dans le volume focal. Cette technique permet d'investiger de nombreux domaines d'études tels que la photophysique, la photochimie, la diffusion ou le transport de molécules fluorescentes [153]. Etudiée depuis les années 70 [97, 98] après des travaux sur la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering - DLS*) [11], cette technique de mesure de la dynamique moléculaire permet de sonder le nombre de molécules dans le volume focal ($0,1\mu\text{m}^3$ ou 0,1 femtolitre), et déterminer le temps moyen τ_D que mettent les molécules pour traverser le volume focal défini par la focalisation du LASER dans l'échantillon.

3.1 Théorie

Le principe de la FCS repose sur deux présupposés concernant le phénomène observé et la géométrie de la zone d'observation. [44]

- le phénomène observé doit être stationnaire, c'est-à-dire que la durée totale de la mesure T_{tot} doit être très supérieure à la durée caractéristique de la fluctuation τ_f . [145]
- la géométrie du volume d'observation c'est à dire la PSF du microscope confocal (gaussienne 3D), pour un objectif à grande ouverture numérique (généra-

lement $ON=1,2$) est de la forme :

$$PSF(x, y, z) = I_0 \exp \left[-2 \left(\frac{x^2 + y^2}{w_{xy}^2} + \frac{z^2}{w_z^2} \right) \right] \quad (3.1)$$

et par définition de volume efficace de cette distribution est :

$$V_{eff} = \pi^{3/2} w_{xy}^2 w_z \quad (3.2)$$

avec w_{xy} dimension du waist du laser en $x - y$ et w_z dimension en z , avec $s = w_{xy}/w_z$

Considérons donc un volume d'observation 3D dont les sections $x - y$ et $y - z$ sont des fonctions gaussiennes [156], où les molécules fluorescentes diffusent librement. Dans notre contexte, cela représente une mesure de dynamique en noyau par exemple. Il est possible de faire de la FCS sur une diffusion 2D, pour une mesure de dynamique de molécules membranaires.

La figure 3.1 montre la variation d'intensité détectée dans le volume focal au cours du temps. Cette variation est directement liée au mouvement de molécules dans le volume focal. On observe d'une part une valeur moyenne du signal $\langle I(t) \rangle$ et d'autre part une fluctuation autour de la moyenne $\delta I(t)$. Considérant donc l'intensité telle que : $I(t) = \langle I \rangle + \delta I(t)$, l'auto-correlation $G(\tau)$ du signal est définie par l'équation suivante :

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (3.3)$$

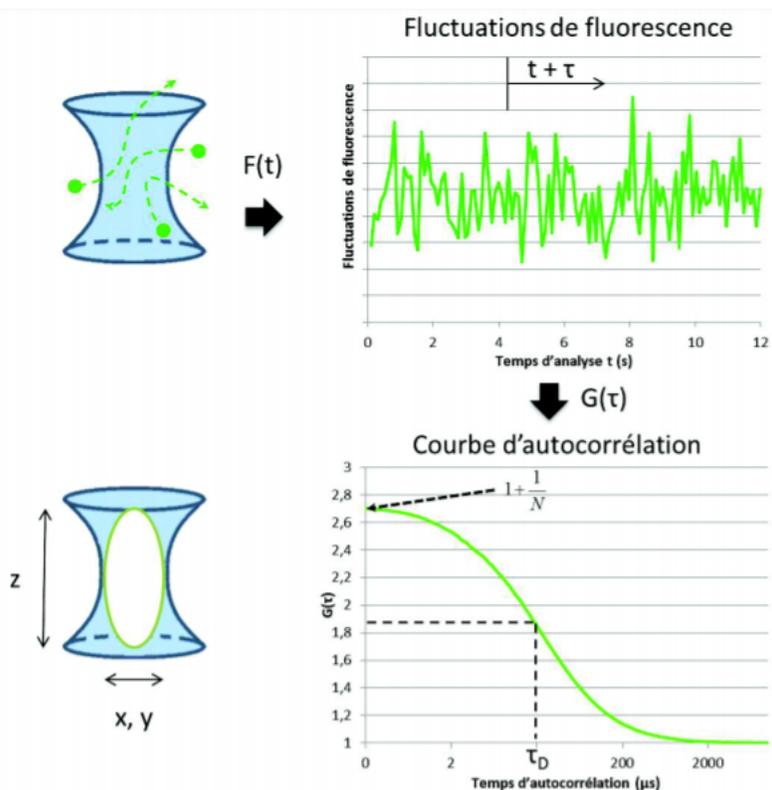
On peut définir l'intensité $I(t)$ comme étant égale au nombre de molécules multipliées par le taux de comptage par molécule (*Count Rate per Molecule - CRM*) tel que : $I(t) = N(t).CRM$. Si je remplace $I(t)$ dans l'équation précédente et que je simplifie j'obtiens :

$$G(\tau \rightarrow 0) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \quad (3.4)$$

Avec $\langle N \rangle$ le nombre moyen de molécules dans le volume focal.

Cela veut dire que l'interception entre la courbe d'auto-corrélation et l'axe des ordonnées me donne rapidement le nombre moyen de molécules (voir fig. 3.1).

D'un point de vue expérimental, il faut être vigilant quant à l'amplitude de la courbe d'auto-correlation. En effet, l'amplitude de $G(\tau)$ étant inversement proportionnelle au nombre de molécules, avoir un trop grand nombre de molécules dans



Tiré de la thèse de G. Herbomel. Les photons issus du volume focal lors des mouvements des molécules sont enregistrés. Si l'on soustrait à ce signal la valeur moyenne nous obtenons les fluctuations de fluorescence comme présenté dans la figure. Ces fluctuations sont auto-corrélées et nous donnent la courbe d'autocorrélation, qui sera analysée.

FIGURE 3.1 – Vue schématique d'une mesure FCS [65]

le volume focal (soit une trop grande concentration de molécules dans l'échantillon) impliquerait une très faible amplitude de la courbe d'auto-correlation, ce qui en pratique pose un problème notamment dans l'ajustement de modèles.

Le rapport signal-sur-bruit en FCS est également un point critique : il faut que le rapport des fluctuations sur l'intensité moyenne soit très supérieur à 1 pour que l'on puisse extraire le signal souhaité. Il existe deux sources principales de bruit en FCS, le bruit de photons (en anglais : *shot noise*), et le bruit induit par la nature stochastique des fluorophores (blinking, états triplets). Comme toutes techniques de microscopie, on cherche à augmenter le SNR. Cela commence dans un premier temps par bien choisir sa sonde fluorescente (brillance, efficacité quantique, minimisation du

blinking). Il peut être démontré que le SNR d'une fonction d'auto-correlation d'un système considéré comme « classique » (c'est-à-dire détection Gaussienne, diffusion brownienne 3D, background \ll signal et échantillonnage temporel rapide $\Delta\tau \rightarrow 0$) est : [156]

$$SNR_{R_{\tau \rightarrow 0}} \simeq \frac{CRM\sqrt{T_{tot}\Delta\tau}}{(1 + 1/\langle N \rangle)^{1/2}} \quad (3.5)$$

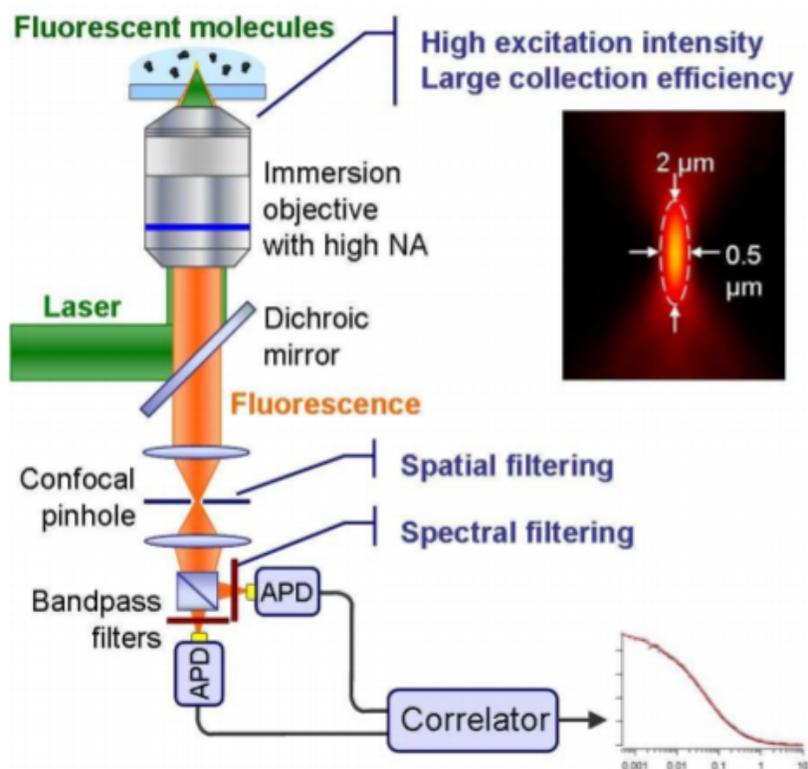
3.2 Matériel

Pour réaliser des expériences de FCS, il est possible d'acheter des systèmes commerciaux adaptés pour la FCS comprenant la source LASER, les filtres adaptés, un système de comptage de photons plus précis que les photomultiplicateurs utilisés dans les microscopes confocaux, et enfin une solution pour corrélérer le signal. Cependant, il est également possible de transformer un microscope confocal pour réaliser des mesures de FCS. Pour cela, il faut vérifier les points suivants (fig. 3.2) :

- Mettre le laser en mode beam park dont la modalité varie en fonction du constructeur. Avec soit un réel positionnement avec une tension fixe dans les galvanomètres (ex : sur le SP5 de Leica) soit de donner un angle de balayage tellement petit que les miroirs ne bougent plus (comme dans le CLSM A1 de Nikon). Le contrôle de la stabilité de position est un point important pour la qualité des mesures de FCS.
- Le volume de mesure est principalement contraint par la PSF de l'objectif et donc l'ouverture numérique et la longueur d'onde. Afin de réaliser des mesures précises il est souhaitable de réduire le volume de mesure de fluctuation et donc utiliser des objectifs de forte ouverture numérique (typiquement 1 à 1,3). Cependant il est délicat de travailler avec des angles de collection trop forts car les variations de volume en fonction de la profondeur dans l'échantillon deviennent fortes et faussent les mesures. Idéalement une correction dynamique du front d'onde par une optique adaptative est souhaitable mais rend le dispositif complexe.
- Il est possible d'optimiser le volume de mesure confocal par réglage du pinhole tout en restant proche de 1 Airy afin de limiter la profondeur focale et ainsi obtenir un volume réduit et contrôlé. Cependant une alternative est de travailler avec un diamètre réduit contrôlé et une grande profondeur focale

par une mise en forme du faisceau au plan arrière de la pupile de l'objectif afin de réaliser en quelque sorte un tube (allongement du waist laser). Ainsi les variations dans l'axe de propagation du faisceau deviennent très grandes et non observables, au profit des variations dans l'axe du diamètre du faisceau qui est contrôlé. Cette méthode est en particulier pertinente pour les mesure de FCS à diamètre variable.

- Le SNR étant sensible au CRM, il est nécessaire de vérifier régulièrement l'intensité LASER en sortie d'objectif et de contrôler régulièrement l'alignement. L'intensité doit être constante et stable, afin de pouvoir avoir des mesures comparables au fil du temps.
- Comme évoqué plus haut, il est nécessaire d'avoir un détecteur avec un niveau de bruit électronique très faible. La plupart du temps, des photo-diodes à avalanche (APD) sont utilisées pour une sensibilité de l'ordre de la molécule unique.
- Le calcul de corrélation peut se faire de plusieurs manières différentes, soit par l'ajout d'un corrélateur digital (par exemple les dispositifs vendus par correlator.com), ou par traitement en post-acquisition par l'intermédiaire d'un logiciel.



Le chemin optique de l'excitation LASER est décrit en vert. Le faisceau LASER collimaté est réfléchi sur le miroir dichroïque et est focalisé dans l'échantillon. La fluorescence émise (en orange) repasse par l'objectif, est transmise par le dichroïque et est filtré par un système de pinhole pour le filtrer spatialement. Sur cette représentation, la corrélation se fait de manière physique : le signal de fluorescence est divisé en deux par un filtre, puis envoyé au corrélateur, qui se charge d'effectuer l'opération de corrélation, et le transmet sur une IHM sur PC pour visualisation.

FIGURE 3.2 – Dispositif classique pour des mesures FCS [44]

3.3 Méthodes

Une fois le dispositif établi, vient le temps des mesures. Un protocole FCS se décompose principalement en 3 parties distinctes : la calibration, les mesures, et l'analyse.

3.3.1 La calibration

La FCS est une méthode de mesure indirecte de la dynamique moléculaire, elle nécessite donc une calibration. Les paramètres $\langle N \rangle$ le nombre moyen de molécules dans le volume focal et τ_D le temps caractéristique de diffusion, sont calculés grâce aux courbes d'auto-corrélation et sont dépendants du volume d'observation (donc de l'objectif utilisé et de la longueur d'onde). Pour bien faire, il faut donc réaliser la calibration à chaque début d'expérience. Nous utilisons pour cela une solution fluorescente à la longueur d'onde désirée pour les mesures, très stable et dont la concentration en molécules et les paramètres de diffusion sont standardisés, dans notre cas de l'ATTO 488 (ATTO-TEC GmbH, Germany) dilué dans de l'eau Milli Q à 10nM. Nous réalisons donc les mesures de FCS, les courbes d'auto-corrélation, sauf que nous remplaçons dans les équations directement les variables $\langle N \rangle$ et τ_D connues pour notre échantillon standard, cela nous donne donc une valeur calculée du volume d'excitation grâce à l'équation suivante :

$$V_{eff} = \frac{1}{G_0 N_A c} \quad (3.6)$$

avec G_0 la valeur de l'auto-correlation à $t = 0$, N_A la constante d'Avogadro et c la concentration de la solution de calibration.

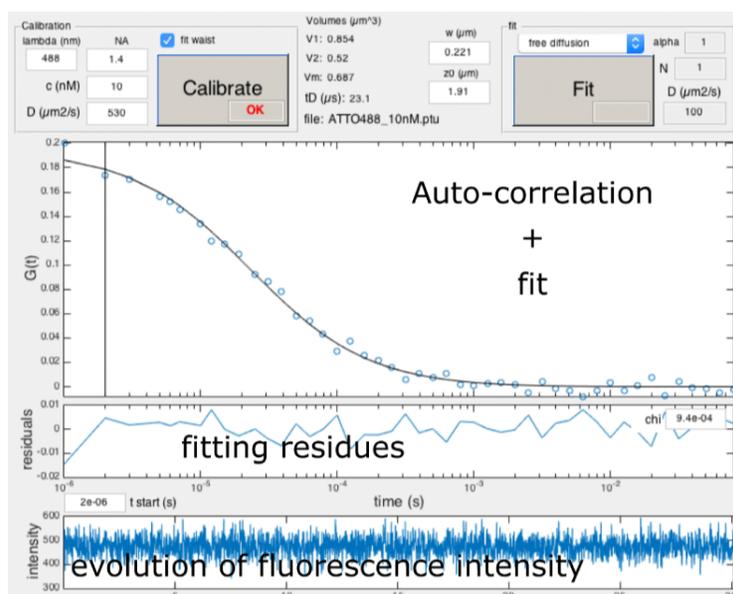
3.3.2 La mesure

Après calibration du système, et V_{eff} mesuré, il faut procéder aux mesures. En FCS sur des échantillons biologiques, il est conseillé de faire entre 30 et 50 mesures sur différentes cellules afin d'avoir des valeurs fiables. Les auto-corrélations sont enregistrées dans des tableaux et réservées pour l'analyse.

3.3.3 L'analyse

Concernant l'analyse il faut ensuite déterminer par ajustement les paramètres de diffusion (N , τ_D , α) courbe par courbe, puis les moyenner.

Pour cela, il existe différents logiciels d'analyse des courbes d'auto-corrélation : QuickFit de Jorg Langowski, PyCorrFit de Petra Scwhille ou encore SymphoTime de l'entreprise PicoQuant. Ces logiciels nous permettent de sélectionner différents modèles d'ajustement pour interpréter les courbes d'auto-corrélation. Dans notre équipe, nous utilisons un logiciel EasyFCS développé en interne par Aymeric Leray (CNRS, Laboratoire Carnot, Dijon), et qui permet une analyse simplifiée et adaptée à nos problématiques biologiques.



Logiciel EASY FCS développé par A.Leray. En haut à droite correspond la fenêtre de « calibration ». La fenêtre du milieu correspond aux volumes calculés par la méthode de calibration. La fenêtre de gauche est utilisée pour analyser l'échantillon à tester, on peut choisir le mode de diffusion à tester (libre, anormale, à deux/trois populations). L'auto-corrélation de chaque mesure de FCS est affichée ainsi que les résidus de l'ajustement par le modèle choisi. En dernier est représenté l'évolution de la fluorescence récoltée au cours du temps.

FIGURE 3.3 – Interface du logiciel EasyFCS

Ce logiciel *user-friendly* permet en quelques clics d'analyser les courbes d'auto-corrélations. Dans un premier temps, nous devons calibrer le système en analysant

les courbes issues de la phase de calibration. Le logiciel va calculer automatiquement V_{eff} grâce aux paramètres standards de l'échantillon utilisé, chez nous, une solution d'ATTO 488 (ATTO-TEC GmbH, Germany) diluée à 10nM. Ensuite, vient la phase de l'analyse des courbes d'auto-corrélation. Afin d'interpréter des courbes, le logiciel nous propose globalement trois modèles :

— Pour diffusion libre :

$$G_D^{3D}(\tau) = \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (3.7)$$

— Pour diffusion anormale :

$$G_D^{3D}(\tau) = \frac{1}{1 + (\frac{\tau}{\tau_D})^\alpha} \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 (\frac{\tau}{\tau_D})^\alpha}} \quad (3.8)$$

— Pour une diffusion à n populations (typiquement 2 ou 3) :

$$G_D^{3D}(\tau) = \sum_{i=0}^n \frac{P_i}{1 + (\frac{\tau}{\tau_{D_i}})} \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 (\frac{\tau}{\tau_{D_i}})}} \quad (3.9)$$

avec P_i la proportion de chaque population i .

Une fois le modèle choisi, on lance l'analyse. Le logiciel nous donne les résidus (différence entre la courbe d'ajustement et les valeurs réelles). C'est à l'utilisateur de faire le choix de la pertinence de son modèle (libre, anormale, n populations) en fonction de la valeur des résidus. Les paramètres de diffusion récupérés, il faut maintenant les interpréter, et en déduire des informations sur la nature de la diffusion étudiée.

Chapitre 4

Modèles théoriques de la dynamique moléculaire

Sonder la dynamique des molécules uniques dans des environnements aussi non-linéaires que le milieu cellulaire est une étape complexe, en déduire des paramètres de diffusion fiables et robustes en est une autre. Cela dit, une fois que ce travail est fait, il faut encore interpréter les paramètres pour en sortir une conclusion biophysique... et c'est là que les modèles entrent en jeu. L'observation de diffusion type anomal est très fréquente dans des milieux complexes comme les milieux biologiques. [67] Il existe différents modèles qui donnent lieu à une diffusion anormale. Nous allons voir dans ce chapitre, les différents modèles utilisés en FCS et en SPT pour expliquer le phénomène d'anomalité. Les modèles de SPT sont davantage orientés vers le point de vue du « marcheur aléatoire » autrement dit de la particule suivie.

4.1 Modèles utilisés en FCS

4.1.1 Cas d'une diffusion brownienne

Une mesure standard en FCS nous permet de déterminer des paramètres de diffusion (souvent τ_D le temps caractéristique de diffusion et α le coefficient d'anomalité) d'une zone précise de l'échantillon dans un champ d'observation défini par le waist du LASER w . Sur un dispositif classique, c'est-à-dire un microscope confocal, la pupille arrière de l'objectif est parfaitement remplie par le faisceau LASER, permettant en sortie un waist le plus petit possible à la limite de la diffraction (200nm). Cela dit,

il est possible d'augmenter la taille du waist en sous-remplissant la pupille arrière, grâce à un diaphragme ou un télescope variable : c'est une technique appelée *Spot-Variation FCS* [107, 152, 84, 9, 42]. Pour des w_n différents, τ_d va avoir une certaine valeur caractéristique de l'échelle spatiale considérée (qu'on indexera τ_d^n). Tracer τ_d^n fonction de w_n^2 permet d'obtenir ce qu'on appelle la loi de diffusion. [62]

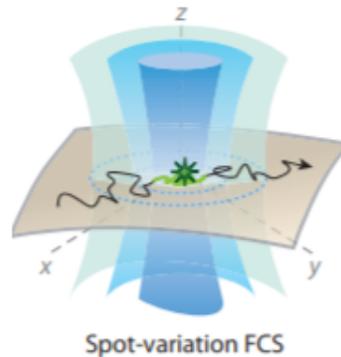


Image d'illustration du spot-variation FCS : il est possible de changer automatiquement le diamètre d'un faisceau LASER grâce à un diaphragme à diamètre variable.

FIGURE 4.1 – Spot-variation FCS : une technique pour calculer la loi de diffusion [62]

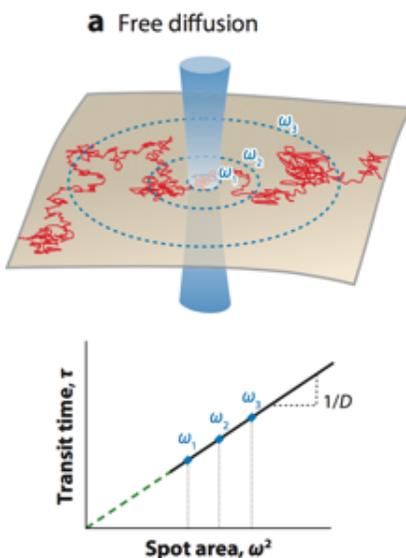
Pour une diffusion brownienne, la loi de diffusion est simple :

$$\tau_D = \frac{w^2}{4D} \quad (4.1)$$

Le temps caractéristique de diffusion est proportionnel à l'aire du spot LASER w^2 .

Une loi de diffusion pour une diffusion brownienne est facile à caractériser : il s'agit d'une fonction linéaire avec une pente inversement proportionnelle au coefficient de diffusion.

L'avantage de cette technique c'est qu'il est possible d'avoir une idée de la structure de l'environnement dans lequel diffusent nos particules en étudiant l'allure de la loi de diffusion. Il existe différents modèles intéressants pour décrire les milieux biologiques, comme nous allons le voir dans la suite.



w_1, \dots, w_n représentent les différents diamètres du faisceau. Si l'on affiche le temps de résidence τ fonction de w_n^2 , nous obtenons une droite de pente $1/D$.

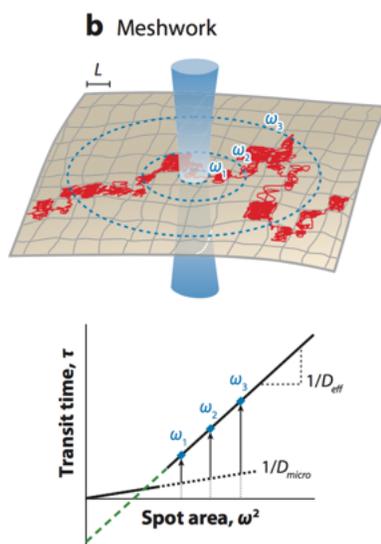
FIGURE 4.2 – Loi de diffusion pour une diffusion brownienne [62]

4.1.2 Cas d'un maillage (ou meshwork)

La diffusion d'un marcheur aléatoire dans un maillage est un modèle qui représente un milieu complexe comme un quadrillage composé de mailles avec des délimitations appelées « barrières ».

Les molécules ont une diffusion brownienne aussi longtemps qu'elles restent dans une maille. Dès qu'elles rencontrent une barrière, elles ont une probabilité P de passer au dessus et d'atterir dans une nouvelle maille. Lorsque que la dimension du waist du LASER est supérieure à la taille de la maille, le temps de diffusion τ_d est une fonction linéaire par rapport à w^2 , avec une pente dépendante de P . Le point d'intersection τ_0 de cette droite avec l'axe des ordonnées est strictement négatif, et sa valeur absolue est représentatif du nombre de molécules dans la maille. Ainsi, l'expression mathématique de la loi de diffusion dans le cas d'une diffusion dans un maillage est :

$$\tau_D = \frac{w^2}{4D_{eff}} - \tau_0 \quad (4.2)$$



w_1, \dots, w_n représentent les différents diamètres du faisceau. Si l'on affiche le temps de résidence τ fonction de w_n^2 , nous obtenons deux portions de droite : une de pente $1/D_{micro}$ avec D_{micro} le coefficient de diffusion à l'échelle microscopique, et une autre de pente $1/D_{eff}$ avec D_{eff} le coefficient de diffusion effectif.

FIGURE 4.3 – Loi de diffusion pour une diffusion dans un maillage [62]

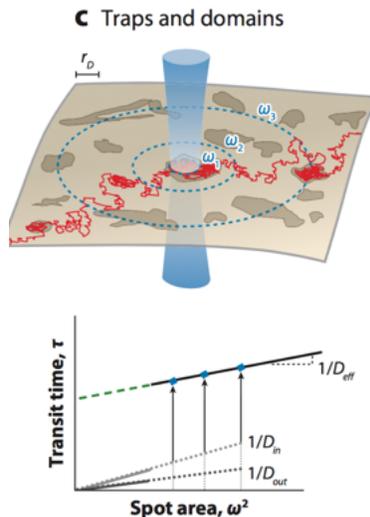
4.1.3 « Traps and domains »

Un autre modèle disponible est appelé « traps and domains ». Il représente une partition spatiale avec des délimitations imperméables, avec des zones de diffusion « libre » et d'autres appelées « micro-domaines » où les molécules sont confinées de manière transitoire.

La loi de diffusion d'un modèle type « traps and domains » est une droite affine de pente $1/D_{eff}$ et l'ordonnée à l'origine τ_0 est strictement positive. τ_0 dépend du « facteur de partition » ainsi que du nombre de molécules confinée dans un domaine.

Il existe d'autres types de modèles pour les lois de diffusion qui souvent, sont des cas particuliers de ce qui a été décrit précédemment. Un modèle intéressant issu de « traps and domains » est la *partition dynamique*. Il s'agit là d'une partition de l'espace en domaines où les particules sont confinées de manière transitoire, mais ces domaines sont mobiles. [84]

Le problème avec cette technique de sv-FCS est que la taille du waist en sortie d'objectif est contraint entre 200 et 400 nm [84] ce qui ne nous permet pas d'in-



Avec D_{eff} le coefficient de diffusion effectif, D_{in} le coefficient de diffusion dans les micro-domaines, et D_{out} le coefficient de diffusion hors des domaines.

FIGURE 4.4 – Loi de diffusion pour une diffusion de type « traps and domains » [62]

investiguer des domaines plus petits que la limite de la diffraction. Cela dit, grâce à l'émergence des techniques de STED, notamment pour la FCS, il est possible de combiner sv-FCS et STED-FCS pour permettre l'étude des domaines plus petits que la limite de la diffraction. [136, 38]

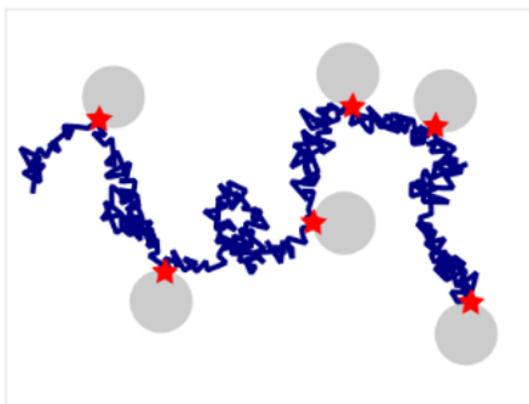
4.2 Modèles utilisés en SPT (point de vue du « marcheur aléatoire »)

L'outil fondamental pour étudier la dynamique d'une molécule en SPT est le calcul et l'analyse du MSD (Mean Square Displacement). D'un point de vue mathématique, un MSD de type sous diffusif est dû à un coefficient de diffusion dépendant du temps, une diffusion corrélée dans le temps, une distribution non-gaussienne des déplacements spatiaux ou une diffusion de type hétérogène (avec plusieurs populations par exemple, dont une fixée). [67] Différents types d'environnements donnent lieu à un comportement diffusif anormal. Une des grandes questions est de savoir comment déterminer, comment distinguer, et comment choisir le bon modèle alors que plusieurs modèles nous donnent les mêmes paramètres D et α .

L'anomalie conséquence des environnements biologiques est très référencée, mais la sélection de modèle reste encore un sujet d'actualité. Dans cette partie, nous verrons les différents types de modèles et les théories les plus utilisées dans notre domaine pour expliquer l'anomalie de nos mesures.

4.2.1 Continuous Time Random Walks (CTRW)

Décrit pour la première fois par Montroll et Weiss (1965), la marche aléatoire à temps continu (Continuous Time Random Walk, CTRW) décrit une particule qui diffuse librement sur une certaine portion d'espace et de temps, puis va s'immobiliser sur une certaine zone pendant une unité de temps τ , avant de reprendre sa course librement, et recommencer. La distribution des temps d'immobilisation τ est une loi de puissance.



En bleu est représenté la trajectoire du marcheur aléatoire, les étoiles rouges correspondent aux points d'interaction avec l'environnement, et les cercles gris représentent les éléments d'obstruction dans l'environnement.

FIGURE 4.5 – Diffusion de type CTRW

L'intégralité des démonstrations mathématiques concernant le CTRW sont disponibles dans l'article de Metzler et Klatzer (2000) et ne sera pas décrit dans cette thèse, car secondaire par rapport à la compréhension de mes travaux. Cela dit, on peut noter les conclusions concernant les expressions des MSD pour une marche de type CTRW :

$$EA - MSD \propto t^\alpha \quad (4.3)$$

$$TA - MSD \propto t \quad (4.4)$$

La marche de type CTRW met en avant une anomalie sur la dimension spatiale mais pas sur la dimension temporelle. L'hypothèse d'ergodicité est rompue.

Pour valider une hypothèse décrivant une diffusion de type CTRW, comparer le MSD moyenné sur l'ensemble avec le MSD moyenné sur le temps est probablement nécessaire mais pas suffisant (par exemple utilisation de tests comme le test « p-variations » de Magdziarz.) [99]

4.2.2 Fractional Brownian Motion (fBM)

En 1968, Mandelbrot modifie le modèle de la diffusion brownienne en ajoutant de la mémoire à la marche de la molécule. Alors que pour la diffusion brownienne, l'évolution temporelle des positions peut être décrite par :

$$x(t + \Delta t) = x(t) + \sqrt{2D\Delta t}\xi \quad (4.5)$$

avec $\xi = N(0, 1)$

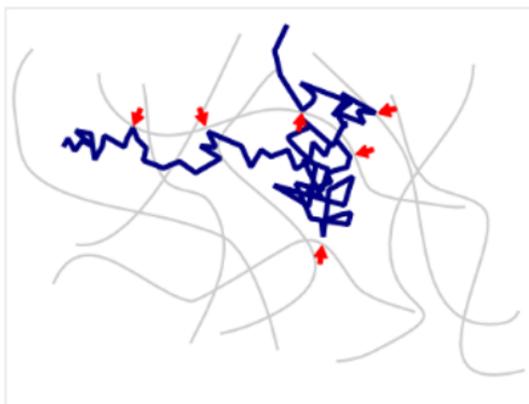
Mandelbrot définit le fBM comme :

$$x(t + \Delta t) = x(t) + \xi(t) \quad (4.6)$$

avec $\langle \xi(t)\xi(t') \rangle = |t - t'|^\alpha$

Ainsi, la position à $t + \Delta t$ est dépendante de la position à t . On dit que le fBM est une marche brownienne dont les pas successifs sont anti-corrélés. D'ailleurs le modèle fBM est appelé anti-persistant car à chaque pas, les molécules ont tendance à changer de direction, à aller dans la direction opposée. A cause de cette mise en mémoire des positions des pas de la particule, le modèle fBM ne respecte pas la propriété markovienne du mouvement brownien qui stipule que le système n'a pas de mémoire, autrement dit, le pas à l'instant t ne dépend pas du pas à l'instant $t-1$.

Cela dit, le modèle fBM conserve l'hypothèse d'ergodicité car le TA-MSD et le EA-MSD sont tous les deux proportionnel à t^α . Ainsi, l'anomalie se retrouve sur la dimension spatiale et temporelle, contrairement au CTRW.



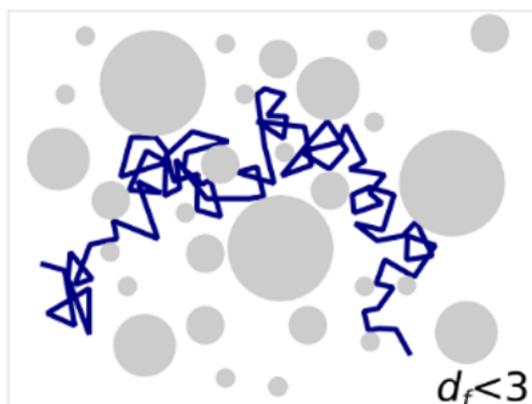
En bleu est représenté la trajectoire de la particule, en gris l'environnement, et les flèches rouges désignent les changements de direction de la particule.

FIGURE 4.6 – Diffusion de type fBM

4.2.3 Marche aléatoire sur une fractale

Un autre modèle de diffusion est la marche aléatoire dans un environnement fractal. Ce modèle est favorisé pour décrire la diffusion dans le noyau cellulaire car des expériences ont montré à plusieurs reprises que la chromatine avait une structure de type fractale. Les premières expériences à ce sujet ont été réalisées en 2005 par Lebedev [81], qui grâce à une irradiation par neutrons d'un noyau d'érythrocyte de poulet, a récolté un diffractogramme représentatif d'une structure fractale.

Une définition simple d'une fractale est une structure de forme précise qui va se répéter dans l'espace avec des dimensions différentes comme présentée figure 4.7 où les structures sont des cercles de différentes tailles.



En bleu est représenté la trajectoire de la particule, et en gris les obstacles qui définissent l'environnement. Les obstacles sont construits de manière fractale : c'est à dire que les objets sont identiques mais présentent plusieurs niveaux de dimension.

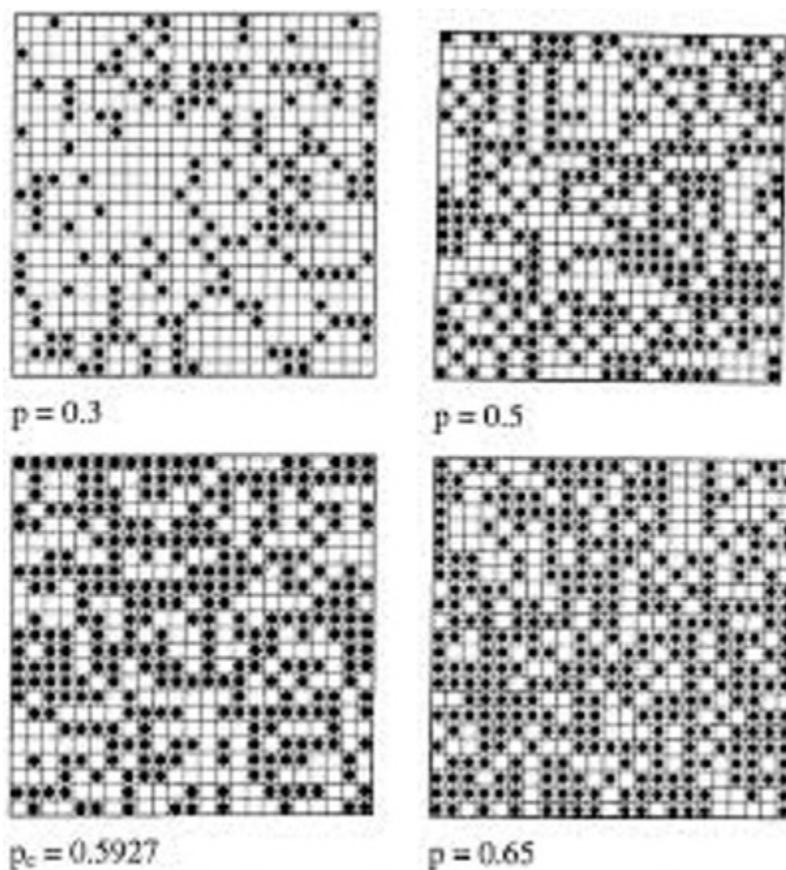
FIGURE 4.7 – Diffusion libre dans un environnement fractal

La particule, que l'on va qualifier ici de marcheur aléatoire, va se déplacer dans l'espace libre laissé vide par la structure fractale. Le marcheur va donc percevoir les obstacles de même forme à différentes échelles spatiales. Pour étudier ce système, on considère souvent la dimension de la fractale D_f et la dimension du marcheur $D_w = 2/\alpha$. La dimension de la chromatine considérée comme une fractale serait entre 2 et 3 (2,7 d'après les mesures de V.Récamier [126]). Pour mesurer D_w il est possible d'utiliser le MSD et d'en déduire α . Si $D_w > D_f$, on dit que l'exploration de l'environnement par le marcheur est appelée « compacte ». La molécule aura tendance à rester à proximité de sa cible, et des sites qu'elle a déjà visité. A contrario, si $D_w < D_f$, l'exploration est non-compacte, et la molécule peut diffuser dans le noyau librement. Elle aura la même probabilité de cibler des sites positionnés différemment dans le noyau.

La diffusion dans une fractale est un processus anomal et ergodique : $TA - MSD \propto t^\alpha$ et $EA - MSD \propto t^\alpha$.

Un cas particulier de la diffusion dans une fractale est le cas de la diffusion obstruée par des obstacles aléatoirement placés dans une matrice (théorie de la percolation fig. 4.8).

Imaginons un quadrillage 2D, comme un jeu d'échec et l'on doit remplir les cases aléatoirement avec des pions. Il existe donc une probabilité p décrivant la probabilité de remplissage. Si la densité d'obstacles (ici de pions) approche un certain seuil (le



D'après le site 'percolation.free.fr', la percolation « évoque les notions de propagation et d'agglutination dans des milieux aléatoires partiellement interconnectés ». Ce modèle a donc sa place parmi les hypothèses pour décrire la structure de la chromatine.

FIGURE 4.8 – Théorie de la percolation, un cas particulier de la diffusion dans une fractale.

seuil de percolation), les marcheurs sont forcés de diffuser dans les sous-espaces vides qui sont apparentés à un environnement fractal. Cette diffusion contrainte induit donc une anomalie dans le mouvement.

En pratique, il est cependant parfois compliqué de trancher et de choisir un modèle au détriment d'un autre. En effet, il est possible d'obtenir le même MSD pour deux modèles différents : il est parfois nécessaire de faire appel à d'autres méthodes que l'analyse des données de MSD pour trancher. Le calcul analytique du temps moyen de premier passage [31, 32, 69] peut être un outil déterminant dans la sélection de modèle. Cette méthode permet de calculer le temps moyen entre un point de départ

et une cible dans un environnement particulier. Selon la structure de l'environnement dans lequel évolue le marcheur aléatoire, le comportement de la courbe du temps de premier passage peut être discriminante.

Deuxième partie

Etude de la dynamique moléculaire de P-TEFb

Introduction

La cellule eucaryote s'adapte en permanence à son environnement afin d'assurer ses fonctions et sa multiplication. Elle a ainsi accès à différents outils de régulation de différentes natures : métaboliques, cytoplasmiques, ou génétiques par exemple. Dans notre équipe, nous nous intéressons à l'expression génétique, notamment la régulation de la transcription. Nos cellules modifient leur expression génétique en fonction des signaux externes (stress, augmentation de température...) ou internes (signalisation cellulaire, réaction inflammatoire...) qu'elles reçoivent et régulent ainsi leur programme transcriptionnel au cours du temps. Il existe différentes réactions cellulaires pour réguler l'expression génétique. Dans cette thèse, nous allons nous intéresser aux mécanismes de régulation de la transcription par des protéines appelées facteurs de transcription (en anglais : *transcription factors*, TFs) qui s'organisent en complexes et dont les interactions et dynamiques constituent des éléments clés de régulation. Les TFs ont été découverts dans les années 60 chez les procaryotes (prix Nobel F.Jacob et J.Monod en 1965) et mis en évidence dans les années 70 chez les eucaryotes (première transcription in vitro en 1979, par Roeder, mais sans purification des TFs [154]). Les années 80-90 sont marquées par une forte activité de description des complexes de transcription (Tjian, Chambon, Kornberg, Guarente, Roeder,...). Il faudra attendre 2001 pour avoir la structure de la polymérase II eucaryote (Kornberg, prix Nobel de Chimie 2006). Fin des années 1980, l'équipe de J.Lis met en évidence un enrichissement en ARN polymérase II dans la partie 5' du gène HSP70 non induit chez la drosophile [129]. Ces polymérases sont transcriptionnellement engagées et synthétisent un ARN de 25 nucléotides mais ne peuvent transcrire le gène entier sans une activation (choc thermique). Le choc thermique déclenche la transcription avec un fort recrutement de l'ARN polymérase II tout le long du gène, jusqu'à un ARN pol II tous les 100 bp [83]. Dans les années 90, les travaux de l'équipe de Groudine à Seattle sur la régulation de la transcription de c-Myc (un

oncogène) posent les bases de la « pause transcriptionnelle » ou « promoter-proximal pause site » dans un mécanisme de cellule eucaryote hors génome viral [80]. En 1995, ils introduisent le concept de « transcriptional pause release ». Cette même année, Marshall et Price découvrent chez la drosophile le complexe P-TEFb responsable de cette « levée de pause » dans des systèmes eucaryotes [103]. Ce complexe est fortement étudié depuis par différentes équipes. Il a été choisi par l'équipe BCF en 2007 comme système modèle pour étudier la dynamique des facteurs de transcription dans le cadre d'un travail en collaboration avec O.Bensaude (ENS, Paris) et X. Darzacq (ENS, Paris puis Berkeley, SF, USA).

Pour la suite de ce manuscrit, nous allons nous intéresser en particulier à ce complexe comme un système modèle d'activité de facteurs de régulation de la transcription eucaryote.

Chapitre 1

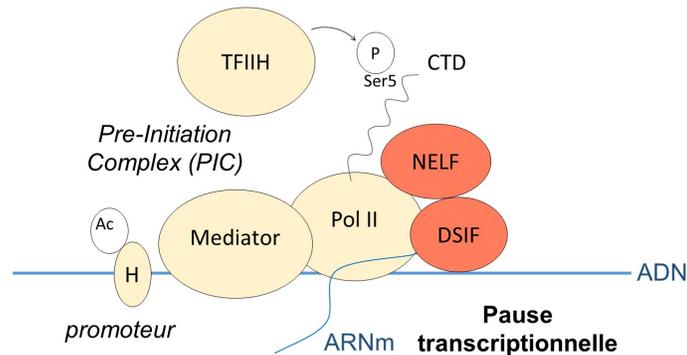
P-TEFb, un régulateur de la transcription

1.1 La levée de pause transcriptionnelle

1.1.1 Description du système

L'ARN Polymérase II (ARN Pol II) est un complexe supra-moléculaire (500kDa) présent chez les eucaryotes. Elle fait partie de la famille des ARN polymérases (quatre types différents chez l'Homme) et se charge de produire les ARN pré-messagers (ARNm) et les micro-ARN dont la cellule a besoin. L'ARN Pol II est constituée de douze sous-unités, dont la plus grosse est la sous-unité RPB1 (250kDa) qui possède à son extrémité C-Terminale (CTD pour *C-Terminal domain*) une répétition de cinquante-deux hexapeptides Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser essentiels à son activité (dont cinq acides aminés peuvent être phosphorylés par des kinases) [72]. La sous-unité RPB1 est impliquée avec RPB2 dans le site catalytique de la transcription. L'ARN Pol II, non phosphorylée, vient se fixer à l'ADN grâce à des facteurs de transcription généraux (TFII A, B, D, E, F et H) et au multimère Mediator (MC : *Mediator Complex*) ce qui forme le complexe pré-transcriptionnel, le PIC (pre-initiation complex). Ce complexe est nécessaire à l'interaction entre l'ARN Pol II et le promoteur, puis à l'initiation de la transcription (fig. 1.1). Pour 60% des gènes[33], l'ARN Pol II arrête de transcrire environ cinquante nucléotides en aval du site d'initiation sous l'influence de DSIF (*DRB sensitivity inducing factor*) [148] et NELF (*Negative Elongation Factor*) [159] : c'est le phénomène de pause transcriptionnelle. P-TEFb,

facteur positif de l'élongation est réquisitionné pour lever cette pause.



Représente l'état du système avant la pause transcriptionnelle. Ici l'ARN Pol II (Pol II) est recrutée sur la chromatine (ADN) grâce aux facteurs de transcription généraux (TFIID) et au complexe médiateur (Mediator) à proximité des histones acétylées (H, Ac). Au bout d'environ 50 nucléotides, et une portion du brin d'ARNm transcrit, NELF et DSIF viennent se greffer à ce complexe ce qui a pour action d'arrêter la transcription.

FIGURE 1.1 – Initialisation de la transcription [48]

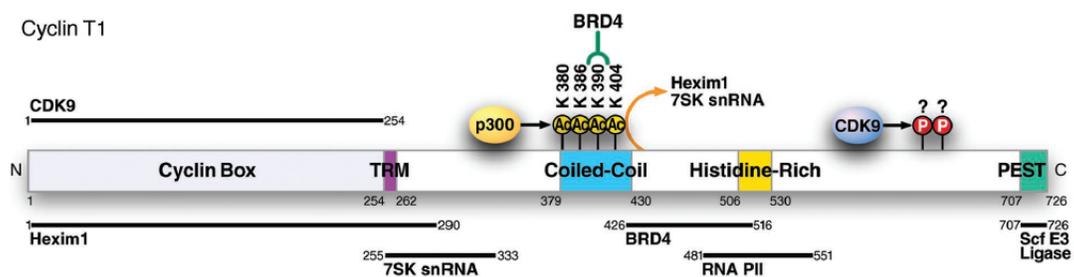
1.1.2 P-TEFb, responsable de la levée de pause

1.1.2.1 Découverte de la molécule et de ses fonctions

Les premiers travaux sur P-TEFb ont été effectués en 1995 par Marshall et Price. [103]. P-TEFb a été découvert de manière indirecte : Marshall a d'abord compris que la molécule DRB (*5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole*) avait la propriété de bloquer l'étape d'élongation et que cela résultait en une production d'ARNm courts et incomplets. Ces auteurs ont utilisé des fractions nucléaires extraites d'embryon de drosophile pour étudier *in vitro* la compensation de l'effet du DRB. Ils ont ainsi mis en évidence un complexe de protéines permettant de lever la pause transcriptionnelle. Ils ont alors procédé à la purification des protéines et ont ainsi

mis en évidence deux sous unités dans P-TEFb [103, 102, 120]. La plus petite sous unité présente des analogies avec les cyclines tel que CDC2 et une forte homologie de séquences avec la protéine humaine PITALE [120, 161]. Ces expériences ont montré que P-TEFb n'était pas impliquée dans l'initiation de la transcription et la formation du PIC, mais qu'elle avait un lien avec la régulation de l'ARN Pol II dans l'étape d'élongation. En contrant l'effet inhibiteur de kinase de DRB, Marshall émet l'hypothèse que P-TEFb en serait peut-être une.

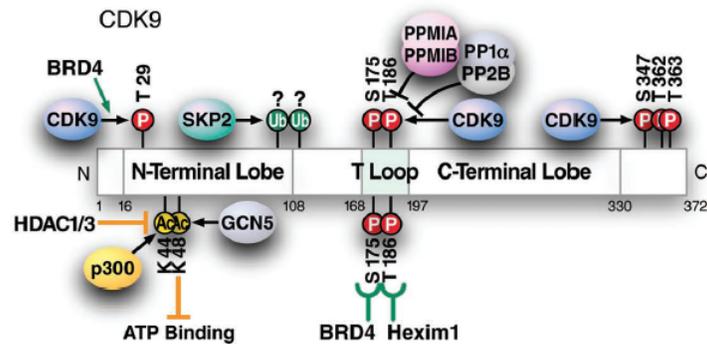
Jusqu'au début des années 2000, on cherche à caractériser P-TEFb et à comprendre son mécanisme.[102, 120]. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que P-TEFb est un dimère composé d'une kinase Cdk9 (Cyclin-dependant kinase 9) et d'une cycline (Cyclin T1, CT1), ou cycline T2 de façon minoritaire [120] (fig. 1.2 1.3), dont le rôle est de réguler l'activité phosphorylase de son partenaire Cdk9. Cdk9 phosphoryle les sérines en position 2 de l'heptapeptide répété dans le CTD de l'ARN Pol II. Cdk9 phosphoryle également les facteurs négatifs de la transcription DSIF et NELF (qui sont des petits complexes dont certaines sous unités présentent des motifs d'acides aminés ressemblant au CTD de l'ARN Pol II). Ainsi par cette phosphorylation multiple P-TEFb permet de désactiver le complexe de pause et de relancer la machinerie transcriptionnelle. [19, 27] La sous-unité CT1 a un rôle de transducteur des signaux cellulaires, et possède des sites d'interaction avec différentes protéines telles que l'ARN Pol II, Hexim1, (hexamethylene bisacetamide inducible 1) BRD4, JMJD6 ou encore l'ARN codant 7SK (fig.1.2) . [26]



Organisation et localisation des domaines des modifications post-translationnelles de CT1. Les numéros indiquent les positions des acides-aminés de chaque domaine.

TRM : Tat recognition motif; PEST : domaine d'interaction pour les protéines F-box. (Cho et al. 2010)

FIGURE 1.2 – Description de la sous-unité Cycline T1 de P-TEFb et localisation de ses sites d'interactions avec les acteurs de la levée de pause [26]



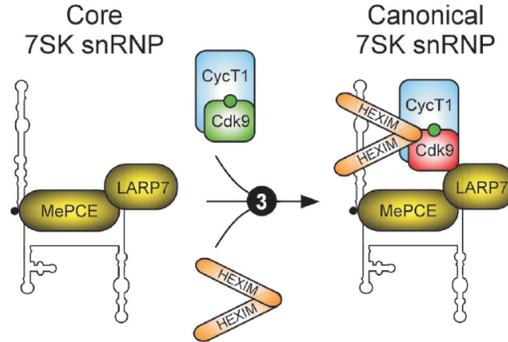
Organisation et localisation des domaines des modifications post-translotionnelles de CT1. Les numéros indiquent les positions des acides-aminés de chaque domaine. (Cho et al. 2010)

FIGURE 1.3 – Description de la sous-unité Cdk9 de P-TEFb et localisation de ses sites d’interactions avec les acteurs de la levée de pause [26]

1.1.2.2 P-TEFb actif et inactif

P-TEFb a un rôle de régulateur de l’élongation transcriptionnelle. L’équipe de O.Bensaude a montré par biochimie que P-TEFb existe dans la cellule sous deux formes : une petite forme (dite active), et une forme inactivée dans laquelle P-TEFb est associé avec Hexim1, un petit ARNsn 7SK ainsi que les protéines LARP7 (La-related protein 7) et MEPCE (Methylphosphate Capping Enzyme). Au sein de ce complexe appelé RNP 7SK (ribonucléoprotéine 7SK), Hexim1 inhibe l’activité phosphorylase de PTEF-b de manière réversible [117, 77]. L’ARN codant 7SK est un petit ARN nucléaire découvert dans les années 70, synthétisé par l’ARN Pol III, il se trouve en abondance dans le noyau. Hexim1 est aussi une protéine très abondante dans le noyau. On estime que seulement 3% d’Hexim1 interagit avec P-TEFb. La combinaison de l’ARNsn 7SK avec Hexim1 séquestre P-TEFb via une interaction entre Hexim1 et CT1. Il a été montré que le complexe 7SK/Hexim/P-TEFb avait une très faible activité kinase, et que cette forme complexée de P-TEFb inhibe ses fonctions. Ce phénomène d’inhibition de P-TEFb est donc perçu comme une boucle de rétro-action visant à moduler l’activité de l’ARN Pol II (fig.1.4) . [117, 77]

Selon le type cellulaire, entre 50 à 90% des facteurs PTEF-b seraient sous la forme inactivée [117]. Ce ratio entre les différentes formes de PTEF-b est primordial pour le bon fonctionnement de la cellule (activation cellulaire, prolifération et différenciation), et une dérégulation de cet équilibre est à l’origine de diverses pathologies. [115]



Une fois la formation de 7SK snRNP achevée notamment par la complexation de l'ARN naissant avec MePCE et LARP7 (tiré de Quaresma et al. 2016), il peut s'associer à HEXIM pour « capturer » P-TEF-b (CycT1 et Cdk9) afin de désactiver la fonction kinase de P-TEFb.

FIGURE 1.4 – Séquestration de P-TEFb libre par le complexe ARN 7SK/HEXIM1[20]

A l'heure actuelle, les acteurs de cette régulation sont assez bien connus, le mécanisme de l'inactivation de P-TEFb par 7SK/Hexim1 est bien documenté, en revanche, la dynamique et la sélectivité (choix des gènes à activer) de cette régulation restent inconnues. Différentes questions se posent :

Comment est régulé le passage de P-TEFb libre à P-TEFb séquestré ? Par quels mécanismes P-TEFb est-il recruté sur l'ARN Pol II ?

1.1.2.3 Différents modes de recrutement de P-TEFb

Il existe différentes hypothèses concernant le mode de recrutement de PTEF-b sur l'ARN Pol II qui sont variables en fonction du type cellulaire et des gènes régulés [47]. On peut répertorier les principaux mécanismes de recrutement en quatre axes :

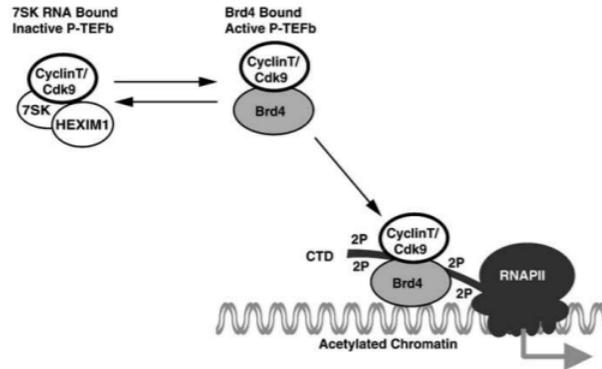
- Par Brd4, une protéine appartenant à la famille des BET (*Bromodomain and Extra Terminal Domain*)
- Par des protéines de liaisons à l'ADN (par exemple le proto-oncogène *cMyc* sur-exprimé dans certains cancers)
- Par des protéines de liaisons à l'ARN (*Tat* impliqué dans le VIH)
- Ou par le complexe dit de « super élongation » (*Super Elongation Complex : SEC*), associé au complexe Mediator et de PAF1 (*polymerase-associated factor 1*).

P-TEFb est impliqué dans de multiples mécanismes faisant de lui une cible d'étude singulière. Il apparaît comme une pièce maîtresse de la régulation de l'ARN Pol II. Dans la suite de cette thèse, nous allons nous intéresser de plus près à son recrutement par Brd4, qui comme nous le verrons dans la suite du chapitre est également une potentielle cible thérapeutique qui suscite l'intérêt [48].

1.1.3 Brd4, catalyseur de la levée de pause

1.1.3.1 Découverte de la molécule et de ses fonctions

Brd4 est mis en évidence en 2001 dans un carcinome par French et al. [46]. En 2003, Dey et al. décrivent l'association de Brd4 et de la chromatine acétylée en période d'interphase et mitose [36]. En 2004, il est montré que cette molécule est aussi impliquée dans les infections virales par le bovine papillomavirus E2. Il est proposé comme régulateur positif de P-TEFb pour la première fois en 2005 par Jang et al. [70]. Jang montre dans cette étude que Brd4 s'ancre à la chromatine via des histones acétylées et qu'il y a un lien direct entre l'acétylation de la chromatine et la présence de Brd4 et de P-TEFb. Une sous-expression de Brd4 entraîne une séquestration plus importante de P-TEFb par le complexe 7SK. Cet article suggère que Brd4 pourrait bien être la réponse à nos questions : il serait à la fois régulateur de la séquestration de P-TEFb, mais aussi un élément clé de son recrutement sur la chromatine (fig. 1.5). [70]

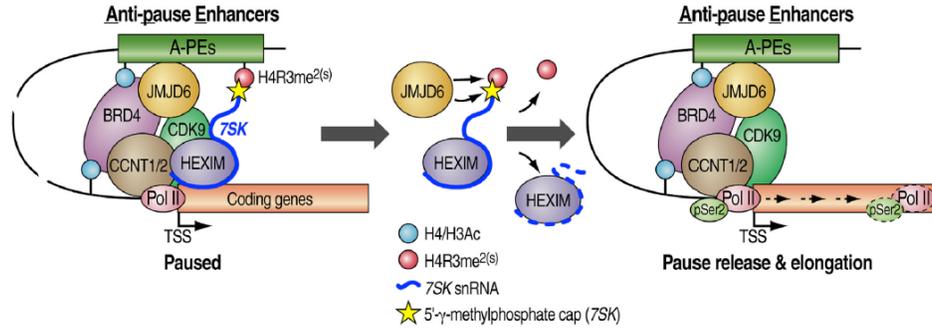


Tiré de Jang et al. 2005. Modèle proposé pour le recrutement de P-TEFb par Brd4. Le complexe 7SK-Hexim-PTEFb est dissocié par la présence de Brd4 qui s'associe à P-TEFb sous sa forme active. Ensuite le complexe Brd4-PTEFb se fixe sur la chromatine acétylée par le biais de Brd4.

FIGURE 1.5 – Brd4 régulateur de la séquestration de P-TEFb et élément clé de son recrutement sur la chromatine [70]

1.1.3.2 Inter-dépendance de P-TEFb et Brd4 pour la levée de pause ?

En parallèle de cela, des résultats concernant un recrutement de P-TEFb sur la chromatine sous sa forme inactivée apparaissent, notamment dans les équipes de Liu [92] et Quaresma [20]. Ils suggèrent que le complexe 7SK/Hexim1/P-TEFb peut être recruté sur la chromatine via des sites spécifiques nommés A-PEs (*Anti-Pause Enhancers*) riches en histones. Ces sites, qui se comparent à des boucles, font un pont entre l'ARN Pol II, P-TEFb, Brd4 et JMJD6 une enzyme responsable de la déméthylation des histones. Ici Brd4 et JMJD6 agiraient en binôme : Brd4 ferait le lien entre les A-PEs et l'ARN Pol II, il serait également responsable du recrutement de 7SK/Hexim1/P-TEFb, puis JMJD6 activerait P-TEFb en le libérant de 7SK/Hexim1 par déméthylation de l'ARNsn 7SK (fig. 1.6). Cependant, les hypothèses de recrutements de P-TEFb libre sur Brd4 ne sont pas réfutées : Liu et al. [92] montre par Immunoprécipitation (IP) et Immunoblotting (IB) que P-TEFb interagit de manière spécifique avec Brd4 mais aussi avec JMJD6.



Tiré de Liu et al. 2013. Le complexe 7SK-Hexim associé à P-TEFb inactivé s'attache à la chromatine par la liaison entre 7SK et l'histone H4R3me²(s). Le recrutement du complexe protéique JMJD6 / Brd4 (par les histones acétylées H4Ac et H3Ac) présente une double activité enzymatique, à la fois une activité de déméthylation des histones ciblant H4R3me²(s) et la déméthylation de 7SK snRNA, entraînant le rejet du complexe inhibiteur 7SK snRNA / HEXIM imposé à P-TEFb.

FIGURE 1.6 – Brd4 et JMJD6 sont impliqués dans le recrutement de 7SK/Hexim1/P-TEFb sur la chromatine via des sites A-PEs [92]

Le recrutement de P-TEFb sur la chromatine fait encore aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches : les hypothèses sont multiples, avec des acteurs multiples et il est difficile de tabler sur une explication unique. Comprendre et décrire la régulation de l'activation de P-TEFb ainsi que le recrutement sur la chromatine permettrait de mieux cibler les enjeux de la régulation de la transcription génétique.

1.2 Dysfonctionnement du phénomène de levée de pause

La levée de pause transcriptionnelle est un mécanisme complexe et non linéaire qui nécessite une coordination stricte de nombreuses molécules. Néanmoins, des perturbations physiopathologiques peuvent avoir lieu, et sont la cause de divers dysfonctionnements. P-TEFb a fait l'objet de nombreuses études notamment concernant son implication dans certains cancers, ou certaines infections par virus (par exemple : SIDA, SV40, HPV) [115]. Les différents exemples explicités dans la suite de ce paragraphe ne sont pas exhaustifs, et permettent de comprendre les enjeux de l'étude de P-TEFb comme cible thérapeutique, ainsi que d'introduire les drogues qui seront testées dans mes travaux de thèse.

Un niveau anormalement élevé de P-TEFb a été mis en évidence dans différents types de tumeurs. De la même manière, une sur-expression de CT1, une des deux sous-unité de P-TEFb, provoque une accélération du développement de tumeurs chez les souris [115]. Il est donc admis qu'un dysfonctionnement de P-TEFb est un facteur oncogène.

Un mécanisme référencé de l'implication de P-TEFb dans le développement de cancer est la sur-expression de c-Myc, un proto-oncogène qui stimule la prolifération des cellules [80]. Le recrutement inapproprié de P-TEFb sur le gène c-Myc sur-produit le facteur de transcription myc qui active à son tour un grand nombre de gènes et fait dérailler le fonctionnement normal de la cellule par l'augmentation de l'expression des gènes de prolifération.[125] L'activité de c-Myc est dépendante de Brd4, et la régulation de Brd4 par une molécule inhibitrice des bromodomaines comme JQ1 s'est montrée efficace sur des modèles de cancers tels que la leucémie myéloïde [162]

Une autre exemple de mécanisme concerne le gène MLL (Mixed-Lineage Leukemia) qui peut faire l'objet de fréquentes translocations et réarrangements génétiques. Cela a pour conséquence de provoquer la formation de gènes de fusion avec la sous-unité AFF4 du complexe de super-élongation (SEC) potentiel recruteur de P-TEFb. Ces réarrangements mènent à des dérégulations de l'élongation transcriptionnelle qui peuvent donner lieu à des pathologies comme la leucémie aïgue lymphoblastique [142].

1.3 Problématiques

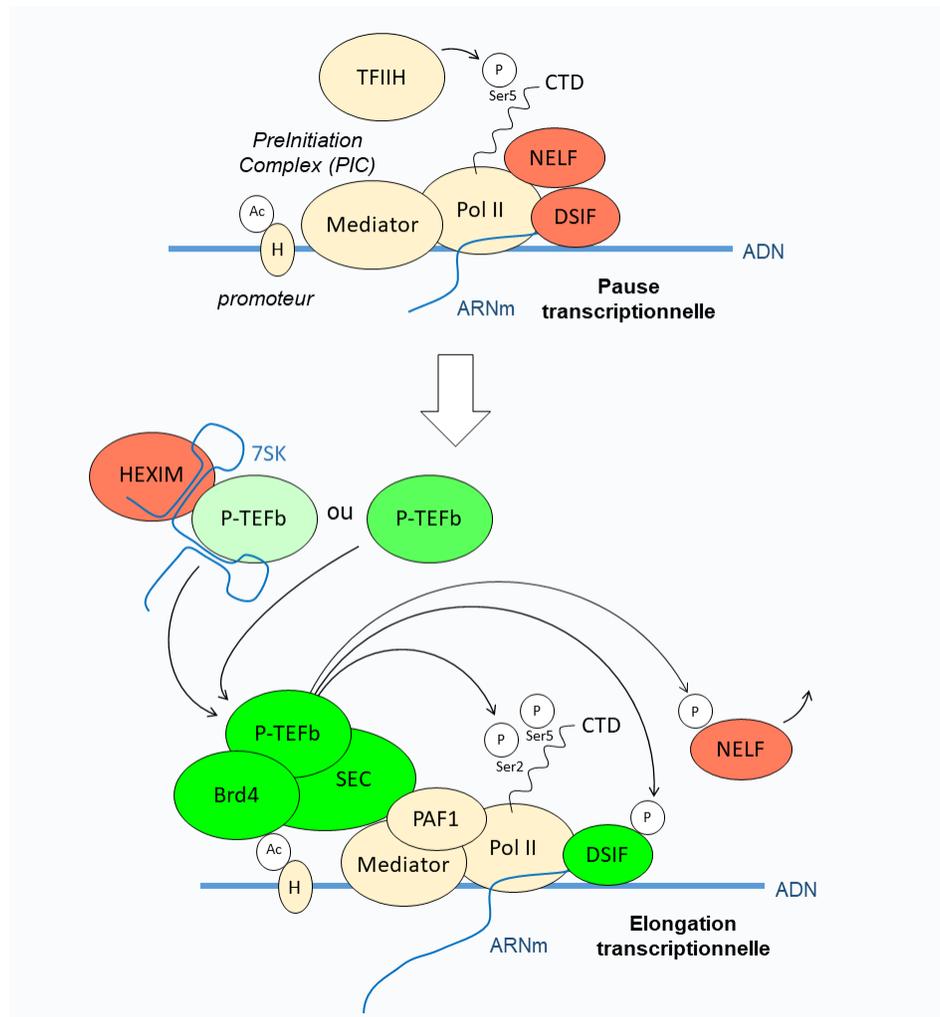
Bien que la majorité des résultats explicités jusque présent sont issus des techniques d'études biochimiques, qui nous donnent une vision statique du phénomène, nous arrivons à un tournant dans la compréhension du phénomène de levée de pause transcriptionnelle. En effet, nous n'avons pas d'informations temporelles fines concernant le phénomène de levée de pause, ce qui manque à notre vision mécanistique. Pour cela, l'étude de la dynamique moléculaire est d'une aide précieuse car elle nous renseigne sur une certaine temporalité et spatialité des mécanismes de transcription.

Dans cette thèse, une des questions principales à laquelle nous souhaitons apporter des éléments de réponse est :

Par quels mécanismes P-TEFb est-il recruté sur l'ARN Pol II ?

L'étude de la dynamique moléculaire des facteurs de transcription répond à la question de la recherche de cibles au sein du noyau cellulaire, ce qui est tout à fait adapté à notre problématique. Nous souhaitons avoir des informations sur le mode de recrutement de P-TEFb sur l'ARN Pol II. Dans notre démarche scientifique, nous avons donc décidé de nous lancer dans l'étude de quatre conditions différentes :

1. Etude complète de la dynamique de CT1, une sous-unité de P-TEFb, pour référence.
2. Etude de CT1 en présence de JQ1, qui va inhiber l'interaction avec Brd4 et potentiellement nous donner des éléments d'informations sur le rôle de Brd4 dans le recrutement de CT1.
3. Etude de CT1 en présence de flavopiridol, qui va inhiber l'activité kinase de P-TEFb. Cette expérience peut nous informer sur le devenir de P-TEFb et de son recrutement sur l'ARN Pol II lorsqu'il est privé de ses fonctions primaires.
4. Etude de CT1 Δ (480 – 551) qui présente une délétion du domaine riche en histidine, et qui est responsable de l'interaction directe avec la sous-unité RPB1 de l'ARN Pol II.



Différentes hypothèses existent concernant le recrutement de P-TEFb sur l'ARN Pol II, et il est fort probable que plusieurs de ces solutions co-existent. Nous proposons de nous focaliser sur l'hypothèse suivante : ici nous avons équilibre entre P-TEFb libre et P-TEFb séquestré. Par un mécanisme qui reste encore à déterminer, P-TEFb se libère de 7SK-Hexim, pour interagir ensuite avec Pol II grâce à Brd4 et SEC (le complexe de super élongation) par l'intermédiaire de PAF1 ; dans le but de phosphoryler les serines 2 et 5 du CTD de Pol II, DSIF et NELF. Tiré Furlan et al. 2018.

FIGURE 1.7 – Schéma récapitulatif des mécanismes testés dans cette thèse

Chapitre 2

La dynamique moléculaire des molécules impliquées dans la transcription

Pendant des dizaines d'années, les chercheurs n'avaient accès qu'à la biochimie pour étudier les phénomènes dynamiques tels que la transcription et la levée de pause transcriptionnelle. Les acteurs moléculaires impliqués dans la transcription ont été identifiés, ainsi qu'une bonne partie de leur interactome, mais la vision spatio-temporelle du phénomène reste encore incomplète. Les méthodes de spectroscopie et microscopie décrites précédemment nous permettent d'obtenir de précieuses informations sur la diffusion et les temps de liaison des molécules impliquées dans les assemblages macro-moléculaires du phénomène de transcription.

D'après X. Darzacq (Mifobio 2018), la transcription peut se décomposer en 4 sous domaines d'études qui sont tous liés d'une manière ou d'une autre :

- L'organisation nucléaire : Est-ce que la structure de la chromatine a un lien dans la régulation de la transcription ? Ou est-ce simplement une structure compacte qui permet la condensation de l'ADN dans un espace réduit en dépit de l'expression génétique ?
- La formation du PIC (Pre-Initiation Complex) : comment l'ARN Polymérase et les dizaines de facteurs de transcription de tailles variables préparent la machinerie transcriptionnelle ?
- La machinerie transcriptionnelle : comment cette machine géante et complexe

interagit avec la chromatine ?

- Les facteurs de transcription : est-ce que la diffusion des TFs est à l'origine de la régulation de la transcription ? Comment viennent-ils se lier à la chromatine ? Comment trouvent-ils leurs cibles ?

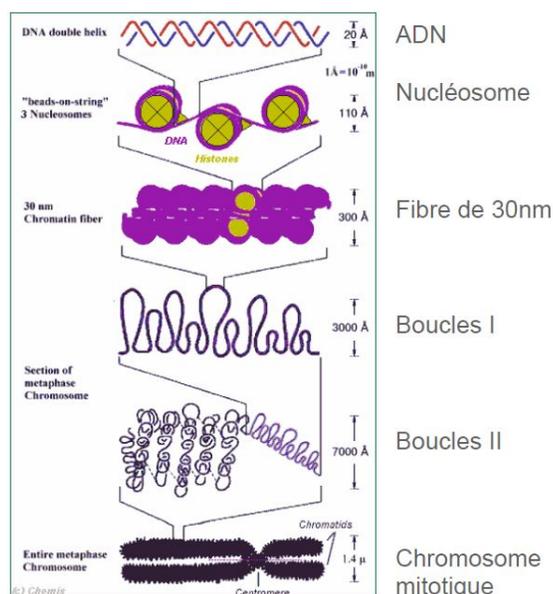
Le développement des approches de microscopie nous apporte de précieux indices sur la compréhension de la régulation des TFs et des acteurs de la transcription, mais également de la structure de la chromatine, environnement dans lequel ils diffusent.

2.1 La diffusion des TFs est impactée par l'organisation nucléaire...

La chromatine est la structure dans laquelle l'ADN est condensée au sein du noyau. Elle est constituée d'ADN et de protéines dont les histones. L'intégralité du matériel génétique d'une cellule mis bout à bout est long de 2m, et il doit être contenu dans un noyau de 10 μ m de diamètre... le seul moyen d'y arriver est donc la compaction. Pour cela l'ADN va se conformer d'une certaine manière : l'ADN va s'enrouler autour d'un assemblage de huit histones (H2A, H2B, H3 et H4) : cette sous-unité s'appelle un nucléosome ($\sim 10nm$). Ainsi, l'ADN s'enroule sur les disques protéiques octamères créés par les histones à la manière d'un collier de perle. Sur une échelle supérieure, les nucléosomes sont empactés les uns sur les autres pour former une autre unité de la chromatine qui se représente sous la forme de fibres de $\sim 30nm$. Ces mêmes fibres peuvent être ré-agencées sous forme de boucles à différentes échelles (fig. 2.1).

On distingue deux niveaux de compaction : l'euchromatine moins dense et l'hétérochromatine très dense, avec une accessibilité à l'ADN réduite. Ces niveaux de compaction sont un premier niveau de contrôle de l'expression génétique : les gènes qui ne sont pas accessibles à cause d'un compactage élevé ne sont pas exprimés.

Cette compaction de l'ADN est réversible, en particulier pour permettre la réplication des chromosomes, grâce à des modifications post-traductionnelles des histones. Ces modifications par méthylation ou acétylation des histones selon des motifs spécifiques permettent d'assurer une régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes : c'est une des grandes thématiques de l'épigénétique. Ces modifications au niveau des histones sont réversibles, mais aussi transmissibles d'une cellule mère à une cellule



Au sein d'un noyau cellulaire, l'ADN se compacte d'une manière spécifique. Le premier ordre de compaction est la création des nucléosomes : l'ADN s'enroule autour de groupement d'histones à la manière d'un « collier de perles ». Ensuite, ces « perles » se regroupent en fibre de chromatine de 30 nm. S'en suivent les ordres de compaction 3 et 4 où ces fibres s'organisent sous forme de boucles (boucles I et boucles II). Lorsque la cellule est en phase de division cellulaire, on observe le dernier ordre de compaction puisque l'ADN s'organise en chromosome.

Source : <http://www.geneticengineering.org>

FIGURE 2.1 – Différentes échelles de la compaction de la chromatine

file. Par acétylation des histones, la chromatine pourrait passer d'un état « fermé » non permissif à la transcription à un état ouvert avec des gènes disponibles. Ces histones acétylées permettent également le recrutement des facteurs de transcription.

Au niveau dynamique moléculaire, la structure de la chromatine apparaît donc comme un système complexe à l'évolution spatio-temporelle non linéaire avec des zones plus diluées qui permettent le déplacement des molécules (on estime à 10% le volume nucléaire disponible[158]), et d'autres plus compactes qui excluent l'accessibilité... Par ailleurs, la chromatine se compacterait comme une structure fractale [81, 7, 8, 68, 89]. Comprendre la structure de la chromatine et son niveau de compaction permettrait d'avoir plus d'informations sur la compréhension de la diffusion de nos facteurs de transcription, notamment en couplant résultats expérimentaux avec modélisations. Cependant, l'architecture chromatiniennne n'est pas le seul et unique

facteur de régulation ou contrainte sur la diffusion des TF. Dans le noyau les TFs vont interagir avec différentes molécules (libres ou attachées à la chromatine ou à des protéines de structure) avec lesquelles ils vont interagir, perturbant ainsi leur diffusion, et contribuant ainsi à l'augmentation de l'anomalité. Les interactions avec les nombreux petits ARN semblent avoir un rôle important à ce niveau.

2.2 ... ainsi que les interactions faibles

TFs-chromatine et TFs-protéines

La diffusion des molécules dans le noyau, notamment l'anomalité du mouvement, n'est pas soumise uniquement à l'exclusion des molécules de certaines zones du noyau, mais également aux interactions faibles des molécules avec les structures nucléaires. Cependant, il est difficile de faire une généralité quant à l'impact de la structure nucléaire sur la diffusion des molécules car de multiples comportements co-existent. Un exemple qui illustre cela est décrit par Izeddin et al. en 2014 [69] qui montre que deux facteurs de transcription différents, c-Myc un proto-oncogène et P-TEFb ont des explorations du noyau différentes. Ces auteurs proposent pour P-TEFb un mode d'exploration compacte, c'est-à-dire que P-TEFb a tendance à sur-échantillonner une certaine zone autour de sa cible. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène est que P-TEFb « voit » la fractalité nucléaire : son mouvement est influencé par les corrélations spatiales et temporelles de l'environnement dans lequel il évolue. A contrario, c-Myc, lui évoluerait dans le noyau comme s'il ne voyait pas ces structures, c'est une exploration non-compacte. Il diffuse librement au sein du noyau, étant parfois piégé dans des zones de confinement s'expliquant par des interactions avec ses partenaires. De son point de vue, c-Myc voit le noyau comme une structure « traps and domains ».

L'anomalité découle en partie des restrictions spatiales ou temporelles de l'environnement dans lequel les molécules évoluent. Il est souvent difficile de différencier la nature de ces restrictions. Izeddin et al. [69] propose une méthode d'analyse des trajectoires par rapport aux angles entre chaque détection. Par exemple, si une molécule va toujours tout droit, les angles entre chaque vecteur de la trajectoire seront nuls. Et au contraire, si la molécule a un comportement anti-persistant, les angles entre les vecteurs tenderont vers 180°. Il introduit ainsi le coefficient d'asymétrie,

qui correspond au logarithme du rapport des angles allant « vers l'avant » sur ceux allant « vers l'arrière ». Il trouve alors que pour le cas particulier de P-TEFb, qui lui est impacté par la nature fractale de la chromatine, que le coefficient d'assymétrie est invariant par rapport au temps et par rapport à l'espace, ce qui est caractéristique des fractales à corrélation spatiale, comme les tapis de Sierpinsky (répétition d'un motif, dans le cas du tapis de Sierpinsky : juxtaposition de carrés de différentes tailles, à plusieurs échelles). Cette observation écarte l'hypothèse d'une structure fractale de type « percolation cluster » qui elle ne possède pas de similitudes spatiales.

P-TEFb, ayant une exploration compacte du noyau, verrait son environnement comme des domaines compartimentalisés et interconnectés entre eux, formant un labyrinthe fractal, avec des similitudes à différentes échelles spatiales. De part la nature de son interactome et de la structure de son environnement, il serait guidé vers ses cibles. On peut imaginer qu'il « ferait des rondes autour de ses cibles », attendant qu'on ait « besoin » de lui, avec une probabilité non nulle mais faible qu'il puisse d'échapper de sa zone d'exploration. [69] Il est important de préciser que malgré les métaphores utilisées dans ces dernières phrases, que les facteurs de transcription dont P-TEFb n'ont pas de rôle à proprement parler : ce sont des molécules en diffusion dans un environnement complexe et soumis à l'agitation thermique. Cependant, on peut visualiser que l'environnement particulier dans lequel elles évoluent a un impact certain sur leurs modes de déplacement (restrictions spatiales et interactions faibles avec la chromatine ou autres protéines).

Les facteurs de transcription, dont PTEF-b, sont donc en constante réaction avec leur environnement et leur haute mobilité est dirigée par des interactions transitoires spécifiques et non spécifiques avec la chromatine. Ces interactions faibles et rapides seraient essentielles pour assurer une régulation efficace du phénomène de transcription. La diffusion facilitée [158]observée dans certains cas de diffusion non compacte permettrait aux molécules de trouver plus rapidement leur cible, plus vite que prédit par une diffusion libre 3D. Ce processus se décomposerait en plusieurs étapes : 1) une diffusion libre 3D dans le noyau 2) un attachement à la chromatine non spécifique, 3) une diffusion de dimension inférieure 1D le long du brin d'ADN ou 2D le long d'une surface, afin de trouver sa cible pour une potentielle réaction et 4) un détachement de la molécule. Cependant, des expériences de Darzacq et al. ont montré qu'une fois trouvé sa cible, l'ARN Pol II avait une probabilité de seulement 10% d'engager le phénomène de transcription. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que la probléma-

tique de régulation de la transcription ne peut pas uniquement être simplifiée à une question de recherche de cibles dans un milieu complexe. [158]

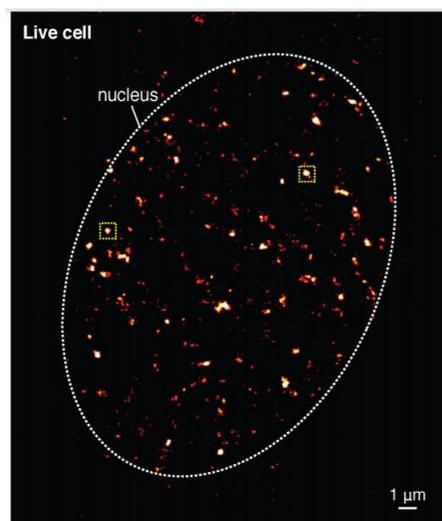
La géométrie complexe du noyau, associée à des interactions TF-chromatine ou TF-potéines affecte donc la diffusion et la mobilité de nos facteurs de transcription, et cet effet se caractérise sous la forme d’anomalité dans le mouvement. Selon Guigas et al., la sous-diffusion qui induit donc à l’anomalité augmenterait la probabilité de la molécule de trouver sa cible, il expose donc l’anomalité non pas comme un phénomène subit par les molécules dû à leur interaction avec le milieu complexe dans lesquelles elles diffusent, mais comme un bénéfice au service de la régulation des réactions nucléaires [123].

Ainsi pour les facteurs de transcription, chaque type de diffusion, et indépendamment de la compacité, assure des interactions transitoires faibles et rapides spécifiques ou non, mais nécessaires à la régulation de l’occupation des sites transcriptionnels. [158, 1]

2.3 Des loci transcriptionnels spécifiques au sein du noyau

En 2013, Cisse et al. [30] met en évidence grâce aux technologies PALM, les loci transcriptionnels au sein de la cellule en localisant les molécules uniques d’ARN Pol II (voir fig.2.2)

Il cherche alors à déterminer si ces loci transcriptionnels sont fixes dans la cellule. Ce serait alors au rôle de la chromatine de se muer, selon un mécanisme à définir, pour placer l’ADN à transcrire dans ces points spécifiques appelés parfois « usines à transcription », ou alors, ces loci seraient dynamiques et pourraient s’assembler et se désassembler au cours du temps afin de réguler la transcription. Il montre alors que ces clusters sont dynamiques dans le temps, et que la présence des ARN Pol II à un certain locus n’est pas aléatoire. En effet, il observe une forte concentration d’ARN Pol II qui apparaîtrait avant la levée de pause et qui dépendrait de la présence du PIC. Darzacq a également retrouvé ce phénomène chez les embryons de drosophiles avec ce qu’il appelle des « *local hubs* » ou concentrateurs locaux temporellement dynamiques de protéines Zelda dont la probabilité de présence est inversement proportionnelle au taux de transcription. Cela suggérerait que des concentrateurs de



Tiré de Cho et al. 2016. Image de super-résolution de Dendra2-Pol II dans des cellules de fibroblastes embryonnaires de souris, mettant en évidence les clusters d'ARN Pol II. La couleur rouge dénote la densité spatiale des détections accumulées sur 5000 images.

FIGURE 2.2 – Image de super-résolution mettant en évidence les clusters d'ARN Polymérase II au sein du noyau [28]

protéines Zelda se formeraient dans le temps, et se dissolvent pour déclencher et réguler la transcription.

De manière analogue aux protéines Zelda dans les drosophiles, il est possible que les facteurs de transcriptions comme P-TEFb soient amenés à « scruter » les zones de clusterisations de l'ARN Pol II, pour agir et lever la pause transcriptionnelle. Ce phénomène n'est pas encore parfaitement connu, mais cette notion de « *local hubs* » pose beaucoup de questions. Pour quelles raisons l'ARN Pol II aurait tendance à former des foyers de concentrations autour d'un certain locus ? Quel est l'avantage de ce phénomène par rapport à des loci transcriptionnels placés « aléatoirement » dans le noyau ? Comment s'assemblent et se désassemblent aléatoirement ces « *local hubs* » ? Quels sont les phénomènes biochimiques derrière cela ? Et surtout : y-aurait-il d'une manière ou d'une autre, une « priorisation » des levées de pauses à effectuer au sein de la cellule ?

Les techniques de microscopie et spectroscopie, de par leurs échelles spatio-temporelles de mesures nous permettent de visualiser une partie des phénomènes

impliquées dans la régulation de la transcription. De plus, la recherche sur les semi-conducteurs, notamment les technologies EMCCD ou sCMOS, couplées à des performances de stockage et de computation des ordinateurs actuels, nous permettent d'avoir en imagerie des échelles de temps toujours plus petites, avec des champs de vue toujours plus grands afin d'avoir une meilleure perception de la dynamique. Le couplage des techniques de FCS et de SPT semble donc tout à fait pertinent dans l'étude de la levée de pause transcriptionnelle, car cela permet d'avoir une vision à différentes échelles spatio-temporelles du phénomène. La FCS, effectuée en mono-point, nous permet d'avoir un échantillonnage temporel exceptionnel (de l'ordre de grandeur \sim nanoseconde) permettant de capter les phénomènes ultra-rapides, et le SPT, comme toute technique de vidéo-microscopie nous permet d'avoir un champ large et de visualiser le fonctionnement moléculaire d'une cellule entière en temps réel, ce qui est une grande avancée. Mais l'échantillonnage temporel est moins rapide, ne nous donnant pas l'accès à l'ensemble des phénomènes.

Chapitre 3

Matériels et méthodes

3.1 Matériels

3.1.1 Mesures de suivi de particules uniques (SPT)

Les mesures de SPT ont été réalisées sur un statif de microscope inversé NIKON Ti-Eclipse (Nikon Instrument, Tokyo, Japan), objectif NIKON TIRF à haute ouverture numérique (NA=1,49) et un grandissement x100. Nous utilisons le Perfect Focus System du microscope, afin d'éviter tout *défocusing* le long de l'axe z . Le LASER d'excitation (561nm - OXXIUS, Lannion, France) est injecté dans une fibre et le faisceau est focalisé en pupille arrière de l'objectif. Le dichroïque utilisé est un SEMROCK référence Di03-R405/488/561/635-t1 adapté pour une utilisation de fluorophores de type DENDRA-2 pour une application de PALM. A l'intérieur du statif et sur le chemin optique, un miroir motorisé nous permet de passer d'une configuration champ large à une illumination inclinée : pour nos expériences de SPT, une configuration HiLo (Highly Inclined Laminated Optical sheet) est utilisée afin de limiter au maximum les contributions hors focus. L'expérience se déroule en illumination continue (561nm, 20 kW/cm² sur l'échantillon). La fluorescence émise par les JF_{549} est filtrée par le dichroïque et imagée sur une caméra sCMOS PCO EDGE 4.2 camera link (PCO, Kelheim, Bavaria, Germany). La taille du pixel est de 6,5µm, et pour nos applications de SPT, nous faisons l'image sur ROI capteur de 100 par 100 pixels, ce qui équivaut à une fraction de nos cellules (diamètre U2OS = 10µm). Cette restriction des pixels lus nous permet donc une vitesse de lecture au moins égale à 100Hz (10 images par seconde) ce qui est suffisant pour bien échantillonner

des TFs allant jusque $10\mu\text{m}^2/s$. Le logiciel de contrôle du statif et d'acquisition des images est NIS (Nikon Instrument, Tokyo, Japan). L'échantillon est placé dans une chambre thermostatée à 37°C le temps des acquisitions (OKOLAB, Italy).

3.1.2 Mesures de spectrométrie par fluctuation de fluorescence (FCS)

Les mesures de FCS sont réalisées sur microscope confocal Nikon A1 (Nikon Instrument, Tokyo, Japan) avec un objectif x40 (NA=1,25) (Nikon Instrument, Tokyo, Japan). Un LASER Argon 488nm (Coherent, USA) est utilisé pour balayer l'échantillon en mode confocal. Pour sélectionner spatialement l'excitation des photons émis par fluorescence, nous utilisons un miroir dichroïque passe-bande (405-488nm). Les photons de fluorescence sont collectés sur une photo-diode et les images sont reconstruites avec le logiciel NIS (Nikon Instruments, Tokyo, Japan).

Pour réaliser des mesures de FCS, nous avons ajouté un module TCSPC (PicoQuant, Germany) à notre dispositif commercial, qui est composé d'un LASER 488nm pulsé (réf : LDH-D-C 488, PicoQuant, Germany), une unité TCSPC et un module de comptage de photons uniques (SPCM CD 3516H, Excelitas Technologies Corp., USA). Pour piloter ces dispositifs, nous utilisons le logiciel SymphoTime (PicoQuant, Germany) en mode FCS. Pour éviter les photons indésirables, nous ajoutons un filtre passe-haut (BLP-488R, SEMROCK, USA) juste avant le détecteur.

3.2 Méthodes

3.2.1 Protocoles biologiques

3.2.1.1 Culture cellulaire

Les cellules utilisées sont des cellules de type U2OS (Human Osteosarcoma), cultivées dans le DMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA), 4,5 g/l de glucose, supplémenté avec 10% de FCS (vol/vol) et pénicilline/streptomycine (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri de diamètre 35mm avec fond en verre de type MatTek ou Ibidi Glass à 100 000 cellules par boîte. Avant l'imagerie, le milieu nutritif est remplacé par du milieu L-15 sans rouge phénol (Life Technolo-

gies, Carlsbad, CA). Pendant l'imagerie, les cellules sont incubées à 37°C dans une chambre thermostatée.

3.2.1.2 Transfection

100 000 cellules sont transfectées par un mélange de 50ng de plasmide, 1 μ L de l'agent de transfection Fugene (Roche, Basel, Switzerland) le tout dilué dans 100 μ L de Optimem (Gibco, Thermo Fisher). 15min d'incubation du mélange est préconisé avant contact avec les cellules. Le temps d'incubation avant imagerie est de 48h.

Les différents plasmides utilisés pendant cette thèse sont les suivants :

- CT1wt-N-Halo, CT1 sauvage
- CT1 Δ (480 – 551)-N-Halo, délété du domaine riche en histidine

Deux drogues ont été testées : le flavopiridol, inhibiteur de l'activité kinase de Cdk9 [22] et JQ1 un inhibiteur des bromodomains [96, 149, 162]. Les deux drogues ont été diluées dans le milieu de culture à 1 μ M.

3.2.1.3 Marquage Halo

Le marquage a été réalisé juste avant l'imagerie. Conformément au protocole des marquages Halo-Tag, les cellules ont été incubées avec une solution de JF_{549} de 0,1-1nM pour le SPT et une solution de JF_{503} de 1-10nM pour la FCS, pendant 30 min, rincées ensuite 3 fois avec du DMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA) ré-incubées pendant 30min, puis rincées une dernière fois, avant de changer le milieu par du L-15 (Life Technologies, Carlsbad, CA).

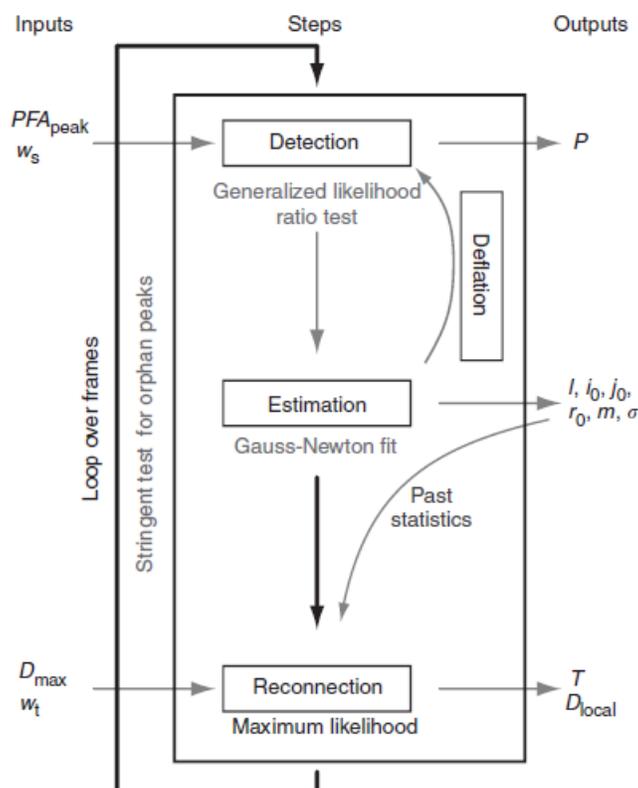
3.2.2 Traitements informatiques pour les données de SPT

Nos données brutes correspondent à des piles d'environ 5000 images codées sur 16 bits sous format *nd2*. Elles sont ensuite converties en 8 bits sous format *.TIFF* pour être compatibles avec les logiciels d'analyse.

3.2.2.1 Détection et tracking des molécules uniques

Le logiciel de détection et d'analyse et de tracking des molécules utilisé dans cette thèse s'appelle « *SLIMfast_fastSPT_JF549.m* », il a été codé sous MATLAB (MathWorks) par Anders Hansen en 2016. Il repose sur le principe de l'algorithme

MTT [138] : l'avantage de ce logiciel est qu'il est efficace pour une densité de molécules élevée (+ 10 molécules) dans le champ. En effet, cet algorithme permet lorsqu'il y a ambiguïté dans le tracking, de refaire l'étape de détection en mode rétro-actif avec un seuillage moins sélectif, afin de détecter des particules qui pour une raison ou pour une autre seraient moins brillantes et qui aurait échappé à la première vague de détection. Ensuite l'étape de tracking, une autre étape de détection si besoin, etc jusque convergence du système. L'algorithme MTT pousse un peu plus loin le principe de prédiction, puisqu'il démarre le tracking en partant du D_{max} imposé par l'utilisateur, mais va recalculer sur une fenêtre glissante de taille w_t un D_{local} plus précis et enregistré comme « historique » de la trajectoire, et qui sera utilisé comme nouvelle référence à chaque itération (voir fig.3.1) .



PFA_{peak} : probabilité de fausse alarme, w_s : taille de la fenêtre spatiale glissante,
 P probabilité, I intensité, (i_0, j_0) centre de la PSF et r_0 son rayon, m valeur
moyenne de l'intensité du bruit de fond, σ écart-type de l'intensité du bruit de fond,
 D_{max} coefficient de diffusion maximal attendu défini par l'utilisateur, w_t fenêtre
temporelle en nombre d'images, T la trajectoire, et D_{local} la valeur qui écrase D_{max}
et qui est réévaluée par le logiciel à chaque itération.

FIGURE 3.1 – Description de l'algorithme MTT

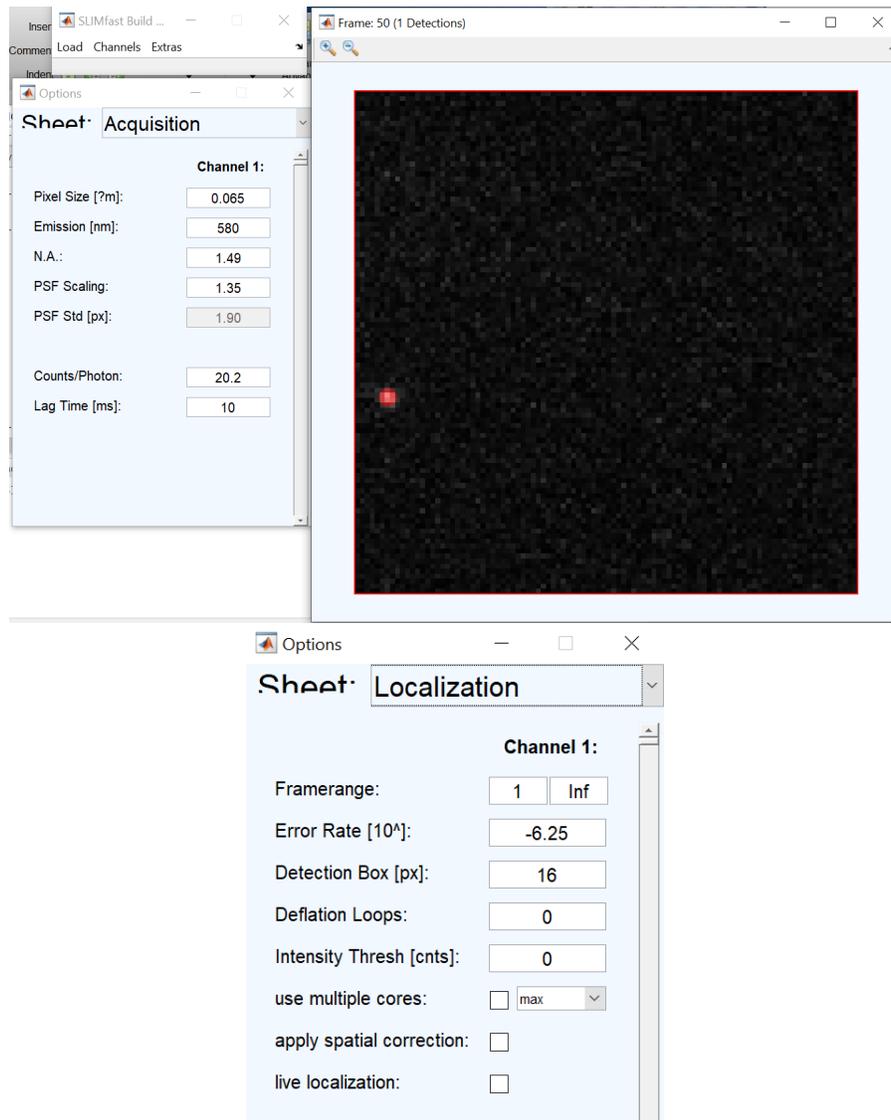
La première étape de l'algorithme MTT est de détecter les particules. Généralement, la détection se fait par la recherche de gaussiennes 2D approximant la PSF du microscope. Pour chaque image, le logiciel va donc commencer par appliquer un test de détection, afin de localiser la présence de gaussiennes 2D : de manière générale l'algorithme utilisé est le test généralisé du rapport des vraisemblances (*GLRT* : *Generalized Likelihood Ratio Test*). L'intensité de l'image est analysée par une fenêtre spatiale glissante w_s (de taille similaire à la PSF) qui va comparer la probabilité de

présence d'une gaussienne (H1 haut niveau de gris) ou l'absence de gaussienne (H0 bruit de fond de l'image) en tout point. L'image codée en niveau de gris est donc transformée en une matrice où sont repertoriés les ratio H1/H0. Si ce ratio est élevé, la probabilité de trouver une particule en ce point est très grande : la détection arrive à se démarquer de manière significative du niveau du bruit. Plus le ratio est faible, plus la détection se noie dans le background. Pour discriminer dans un premier temps, à partir de quel ratio le logiciel considère qu'il n'y a plus de détection, l'utilisateur doit renseigner une constante appelée probabilité de fausse alarme (PFA_{peak}) qui forcément doit être inférieure à 1. Pour nos images, relativement bruitées, le PFA_{peak} est placé à 10^{-6} , et peut-être adapté en fonction des résultats du tracking. Une fois le premier lot des particules candidates détectées, leurs caractéristiques spatiales sont enregistrées (amplitude, position, largeur et offset en ordonnée de la gaussienne 2D) : c'est l'étape d'estimation.

Le logiciel va ensuite rentrer dans une « boucle de déflation » : ce premier lot de particules est ensuite soustrait de l'image brute de départ, cela permet aux particules moins visibles d'être également détectées, bien qu'elles n'aient pas un ratio H1/H0 très élevé (l'algorithme va d'ailleurs chercher à diminuer le PFA_{peak} afin de faire apparaître de potentiels pixels candidats pour l'étape d'estimation). Cette opération est réitérée jusqu'à ce que toutes les particules soient détectées, puis l'algorithme sort de cette boucle de déflation. Pour l'étape de reconnection des particules, l'utilisateur doit renseigner deux paramètres : D_{max} , le coefficient de diffusion maximal auquel on s'attend, et w_t la fenêtre temporelle qui va permettre de calculer à chaque nouvelle image D_{local} qui va remplacer D_{max} dans l'utilisation qu'on en fait. Cette méthode permet d'avoir un historique de la diffusion de la molécule et de reconnecter plus efficacement les particules ensemble. Une autre innovation de l'algorithme MTT comme décrit dans l'article de Sergé [138] est la gestion du blinking. En effet, la technique de reconstruction de trajectoires ressemble à ce qui est décrit plus haut (voir fig. 2.6) dans le cas où le nombre de molécules dans l'image N et $N + 1$ sont identiques. Cela dit lorsqu'à l'image $N + 1$ il y a une particule en plus dans le champ de vision, deux hypothèses se posent : 1) une molécule est arrivée de manière fortuite dans la zone d'intérêt, ou alors 2) il est possible que la molécule supplémentaire corresponde à une molécule détectée plus tôt, mais qui aurait subi le phénomène de *blinking* (passage momentané de la molécule dans un état « *dark* »). Pour écarter ou valider cette dernière hypothèse, l'algorithme MTT va chercher une trajectoire

qui a été tronquée à l'image $N - 1$, déterminer la position de la dernière molécule détectée et chercher dans l'image $N + 2$ si cette molécule supplémentaire apparaît dans un cercle de rayon $(3r_{max})^2 t_{off}$, t_{off} étant le nombre d'images correspondant à une non-détection de la particule (dans notre exemple $t_{off} = 3$). S'il y a détection, les particules sont reconnectées entre elles bien que les détections ne se sont pas faites de manière parfaitement successives. S'il n'y a pas détection, la nouvelle particule est considérée comme le début d'une nouvelle trajectoire.

D'un point de vue pratique, concernant l'utilisation du logiciel *SLIMfast_fastSPT_JF549.m* : il faut tout d'abord télécharger les données brutes pour analyse, puis ensuite, il faut rentrer les paramètres de localisation. Le paramètre « counts/photons » dépend de la sensibilité de la caméra et de la brillance des fluorophores, il est utile pour seuiller l'image en terme de niveau de gris avant l'étape de détection. Ensuite, il faut renseigner les paramètres d'acquisition importants comme la taille du pixel image, la longueur d'onde d'émission, et l'ouverture numérique afin de calculer la taille de la PSF théorique pour la segmentation des pixels candidats.



Capture d'écran du logiciel : étape de détection

FIGURE 3.2 – Introduction au logiciel SLIMfast pour l'analyse des données de SPT - détection

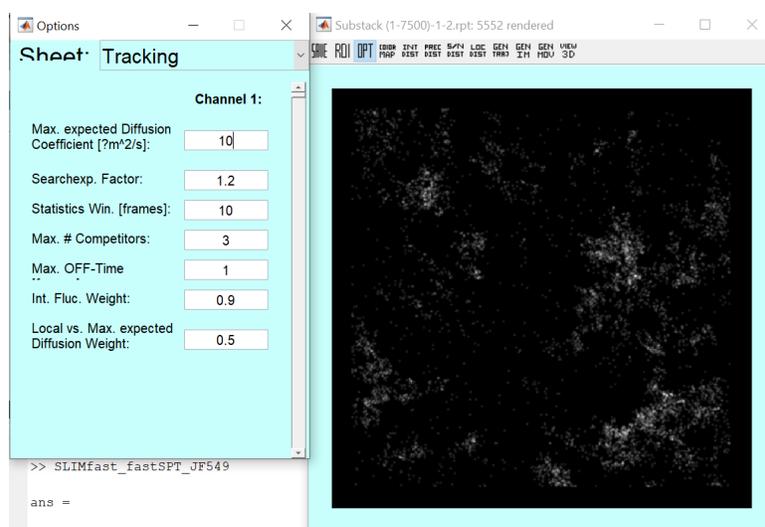
Pour l'étape de localisation, on ajuste le paramètre « Detection Box » qui correspond à la surface dans laquelle doit être recherchée la PSF. Elle est variable en fonction de la taille des pixels images. On peut également modifier le paramètre « Error rate » qui correspond à la probabilité de fausse alarme PFA_{peak} décrite précédemment.

Une fois toutes les particules du stack image détectées, celles ci sont enregistrées

Paramètre variable logiciel	Valeur selon notre dispositif
Pixel size	65nm
Emission (nm)	580nm
NA	1,49
Lag time	10ms

TABLE 3.1 – Liste des paramètres à renseigner dans *SLIMfast* pour l'étape de détection

dans une structure Matlab et utilisées pour l'étape de traçage et de reconstruction des trajectoires.



Capture d'écran du logiciel : étape de traçage

FIGURE 3.3 – Introduction au logiciel *SLIMfast* pour l'analyse des données de SPT - traçage

A cette étape, le logiciel nous retourne l'image de « super-résolution » qui correspond à la projection de toutes les détections sur une même image. Afin d'avoir un meilleur échantillonnage spatial, la dimension de l'image de départ est modifiée. En effet, pour 1 pixel de l'image brute, correspond 25 pixels de l'image super-résolue (matrice de 5 par 5 px centrée sur le pixel de départ). Ce facteur d'agrandissement de l'image de super-résolution est modifiable.

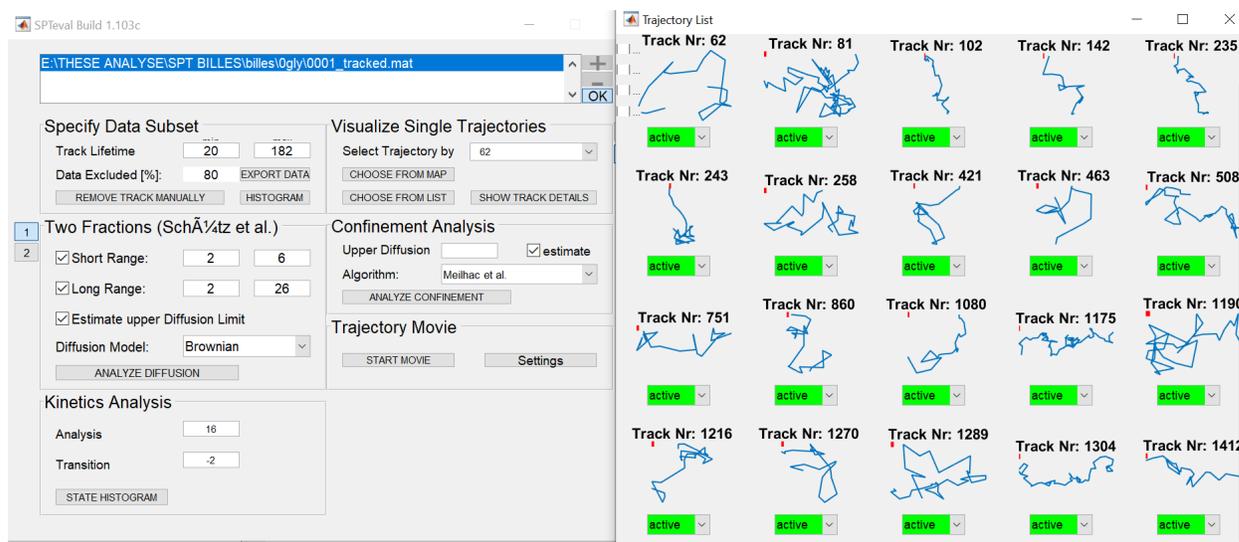
Concernant l'étape de recherche des trajectoires, le logiciel *SLIMfast* a besoin des paramètres suivants : le coefficient de diffusion maximal attendu qui définit le rayon de recherche de la particule $n+1$, le nombre maximal de particules détectées autori-

sées dans ce rayon, le paramètre « OFF-time » qui correspond au nombre d’images autorisées sans détection dans une trajectoire.

Une fois les trajectoires reconstituées et enregistrées dans une structure Matlab, l’utilisation du logiciel *SLIMfast* est terminée.

3.2.2.2 Visualisation des trajectoires et vérification

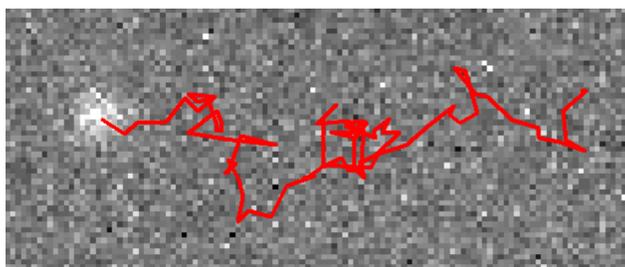
Le code *EvalSPT.m* écrit par C.P.Richter (University of Osnabrueck) nous permet d’ouvrir les structures Matlab et de visualiser les traces.



Capture d’écran du logiciel : étape de visualisation des trajectoires

FIGURE 3.4 – Eval SPT : un logiciel pour visualiser et sélectionner les traces

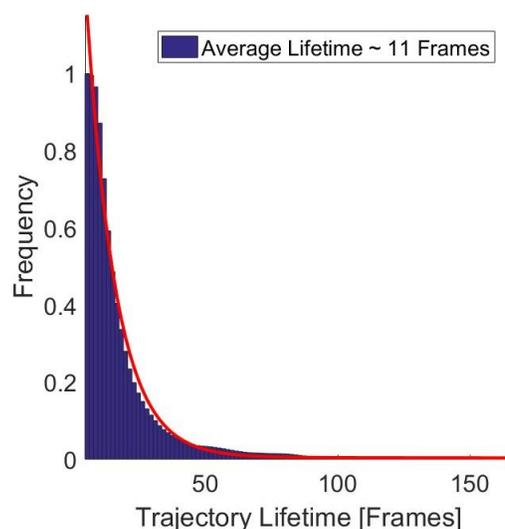
Ce logiciel est très pratique car il nous permet de sélectionner les traces et d’enlever celles provenant de fausses détections par exemple. L’utilisateur peut sélectionner le nombre de points par trajectoires en changeant le paramètre « Track Lifetime ». Il est d’usage de ne garder que les traces de plus de 10 points par trajectoire pour enlever le maximum de fausses détections. Une trajectoire de 10 points minimum nous permet lors de l’analyse en MSD d’avoir une courbe de MSD exploitable jusque $MSD(5\Delta t)$, les MSD supérieurs étant trop peu nombreux, et donc par conséquent statistiquement plus bruités [111, 112]. Le logiciel *EvalSPT.m* nous permet également de superposer les traces sur les images d’origine pour vérifier le tracking.



Réalisée grâce au logiciel EvalSPT

FIGURE 3.5 – Exemple de trajectoire d’une bille de 100 nm dans un mélange eau-glycérol

Une fois les traces vérifiées et sélectionnées, nous avons accès à l’histogramme du nombre de points par trajectoires. C’est un bon indicateur pour déterminer la longueur moyenne des trajectoires et donc la pertinence des analyses a posteriori. Par exemple, des trajectoires trop courtes peuvent potentiellement nous donner des mauvaises courbes de MSD et donc des mauvais ajustements de D et α . Si les trajectoires sont trop courtes, il faut parfois penser à réajuster les paramètres expérimentaux comme la concentration de particules dans le champ. Une sur-concentration peut amener à de traces écourtées car l’algorithme MTT va rapidement se confronter à un trop grand nombre de molécules dans le cercle de recherche. Il est également possible que des trajectoires plus courtes viennent de particules plus rapides qui logiquement vont rester moins longtemps dans le plan focal du microscope.



Réalisée par MATLAB grâce au logiciel EvalSPT.

FIGURE 3.6 – Histogramme du nombre de points par trajectoire pour un exemple de diffusion de billes dans un mélange eau-glycérol. (trajectoire + 10 pts)

Il est important de remarquer que lors de la sélection des traces par le nombre de points, un grand nombre de trajectoires sont mises de côté : environ 70 à 90% des trajectoires sont écartées pour un stack de 6000 images. Pour rendre l’analyse des traces de Single Particle Tracking statistiquement viable, il faut qu’après toute la chaîne de traitement on conserve un nombre important de trajectoires. Pour nos expériences et par condition, on a dû générer une quarantaine de piles d’environ 5000 images d’environ 100 par 100 px (soit pour des mesures sur du vivant : 40 cellules analysées). Cela représente environ 2Go de données brutes par condition, dont on ne garde que 30 à 10% des trajectoires totales détectées pour analyse.

Finalement et pour dernière étape avant analyse des traces, nous enregistrons le fichier contenant l’ensemble des traces sélectionnées dans un `.txt`.

3.2.2.3 Analyses des trajectoires par histogrammes

Les codes utilisés ci-dessous ont été développés en partie par Laura Caccianini (équipe de M.Coppey, Locco Lab, Institut Curie Paris), et ont été adaptés pour nos problématiques par mes soins.

- Une fois que les traces ont été sélectionnées, et triées selon le nombre de points par trajectoires (on ne garde que celles de plus de 10 points), on les traite avec

le code *analyse_evalSPT.m* qui nous permet à ce stade de calculer les MSD en unité arbitraire d'espace (pixels au carré) et de temps (écart entre les images considérées). Les données sont enregistrées dans une matrice $M(x, y)$ avec en x l'identifiant des trajectoires et en y les $MSD(n\Delta t)$ correspondants. Les MSD sont calculés en tenant compte des « trous » dans les trajectoires dû au traçage par l'algorithme MTT qui prend en compte un « OFF-TIME » pour le blinking. Si ce paramètre est mis à zéro, il n'y aura pas de trous dans les trajectoires, mais celles-ci seront donc plus courtes. Dans ce code, on performe également l'ajustement de $D(px^2/n_{image})$ en unité arbitraire. Le tout est enregistré dans des matrices, qui seront les variables d'entrée du logiciel suivant.

- Le code suivant, nommé *make_alphad.m* nous permet de calculer les D et logD en $\mu m^2/s$ suivant les valeurs dépendant de notre dispositif (typiquement taille de pixel = 65nm et temps entre deux images de 10ms). Il nous permet également d'afficher les histogrammes de logD qui nous servent à l'interprétation des données. Dans ce code, on effectue l'ajustement des MSD sous échelle logarithmique par une droite affine : cela nous permet d'extraire le coefficient directeur qui est égal à α . Cependant, comme expliqué précédemment, les courbes de MSD, surtout lorsqu'elles sont traitées en individuelles sont très bruitées sur la deuxième partie de la courbe de MSD. C'est pour cela que l'ajustement du α ne considère que le premier tier de la courbe de MSD. Les justifications de ces conventions utilisées sont explicitées dans l'article « **Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell** ». Une fois logD, D et α extraits, ils sont affichés sous forme d'histogrammes. Pour nos applications, l'histogramme des logD est ajusté par un mélange de fonctions gaussiennes (1, 2 ou 3). La sélection d'un modèle par rapport à un autre est déterminée par le critère du BIC ou du AIC. Si AIC_1 (ou BIC_1) $> 2.AIC_2$ (ou $2.BIC_2$) alors le modèle 2 est sélectionné.

Chapitre 4

Analyses des résultats

4.1 Etude sur échantillons de référence

Afin de calibrer nos systèmes de mesure de la dynamique moléculaire (FCS et SPT), j'ai réalisé une étude sur échantillons de référence (billes de 40-100nm dans des milieux de différentes viscosités) pour simuler des coefficients de diffusion allant de 0,1-15 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ en mono-populations, ou deux populations. Puis, dans un second temps, j'ai réalisé l'étude de la dynamique moléculaire de RPB1 selon les process mis en place.

Cette étude a été l'objet d'un article, qui est en cours de finalisation avant soumission :

« Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell »

M Fournier, A Furlan, D Champelovier, L Héliot

Cet article est joint à ce manuscrit de thèse et se substitue à ce chapitre.

Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell

Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell.

M Fournier, A Furlan, A Leray, D Champelovier, L Héliot^{§*}

* To whom correspondences and material requests should be addressed:

§ Senior authorship.

Keywords: molecular dynamics, diffusion, single particle, tracking, spectroscopy, model, transcription, biophotonics, RNA Pol II

Abstract

The orchestration of gene expression remains a key question in both fundamental and applied research. Transcription is reported to take place in some spatially and defined transcription factories with temporal hubs of RNA Pol II. Nevertheless, we lack reliable information about how these factories assemble and disassemble over time, and how these macromolecular complexes are dynamically organized in the cells.

Various microscopy approaches have been developed to quantify and/or track molecular motilities. Yet, distinct approaches can yield different apparent diffusion features, based on the temporal scale observed by the chosen technique, the available detector sensitivity, and the analytic methods used to treat the data. Having access to single molecules behaviors is a key element to push forward the understanding of molecular spatio-temporal mechanisms.

In this manuscript, we investigated this issue by combining and comparing Single particle tracking (SPT) and Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) experiments on the same standard samples to have a better understanding of the limitations of each techniques, and we applied our protocol on a specific nuclear target, namely RNA polymerase subunit RPB1.

Introduction

Biological activities are classically modulated through the dynamic binding and unbinding of molecular partners (Presman et al., 2017). Depending on the process considered, molecules may exist in several distinct complexes, which differ in their motility and availability features. In the frame of gene expression modulation, diffusion and target search actually constitute critical features for transcription actors (Halford and Marko, 2004; Izeddin et al., 2014). It was agreed that RNA Pol II is recruited on the target genes by general transcription factors during pre-initiation complex (PIC) formation (Kim et al., 1997; Kornberg, 2007; Lee and Young, 2000). Nevertheless, little is known about the temporal and spatial dynamics of that mechanism. Recent advancements in the field suggest that several RNA Pol II are co-recruited and form transient clusters which disintegrate after a few seconds (Cho et al., 2016; Cisse et al., 2013). A variable number of clusters occur simultaneously and independently in the nucleus depending on its transcriptional activity.

Classically, when fluorescence-labelled molecules are available, molecular mobility measurements in living cells are analyzed either by looking at the fluctuation of fluorescence (Magde et al., 1972) (e.g. in FCS, Fluorescence Correlation Spectroscopy) or by measuring the displacement of single particles (Cheezum et al., 2001; Geerts et al., 1987; Manley et al., 2008) (e.g. in SPT).

The calculation of molecular diffusion thanks to FCS will provide us with a mean value corresponding to 5-10 molecules transiting through the excitation focal volume (Elson, 2011). Even if the spot is small (around 0,1 fL with 200nm for axial diameter), it corresponds at the molecular level to a microenvironment with many distinct molecular crowding conditions or molecular interactions, and each experimental point already constitutes an average of several behaviors. Moreover, such techniques based on fluctuations are blind to strong binding events in which molecules hardly move. (Altan-Bonnet and Altan-Bonnet, 2009; Elson, 2011; Weiss et al., 2003)

On the opposite, SPT techniques have been developed over the last years thanks to the improvement of cameras and allow tracking individual molecules in the field of view over time (Cheezum et al., 2001; Geerts et al., 1987; Manley et al., 2008). Yet, such techniques are limited by the mobility of the molecules out of the focus plane and are classically not adapted to capture molecules moving with diffusion coefficients higher than $1-10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Hansen et al., 2018; Harwardt et al., 2018). SPT techniques require the analysis of a large number of individual traces (1000-10000). But all traces are not represented equally depending on their length, which depends on the mobility of the molecules and the configuration of the measurement (notably the thickness of the observation plane). This bias results in an over-representation of slower molecules with longer trajectories and in less accurate statistics concerning faster molecules (Izeddin et al., 2014). This problem is often underestimated in SPT analyses. It seems important to clearly define the methodology used to select trajectories in order to understand the populations studied and the limits of the interpretations that can be drawn with these measures.

In order to understand the dynamics of regulation of transcription proteins in nucleus, it is important to obtain quantitative data about the diffusion of both fast and slow molecules. To this end, we propose to take advantage of FCS and SPT complementary methods.

In this study, we evaluate the results obtained by these two methods with reference samples consisting of beads of known diameter in water/glycerol mixtures of different viscosities. With regard to SPT, different analytical protocols have been proposed in the literature and evaluated using simulated data. We reasoned that it was important to deal with experimental data and not simulations because they describe at best the reality of experimental images and instrumental constraints and contributions. We therefore compared different ways to analyze SPT trajectories using MSD-based analysis of standard samples measurements with different approaches (named TEA-MSD and H-MSD).

As depict in literature, the mobility of each biological molecule in cells always show a mixed of several diffusion modes (Hager et al., 2009; Hansen et al., 2018). We want to know how both methods for SPT analysis (TEA-MSD and H-MSD) behave under these conditions. We came up with a robust process, that we subsequently applied to the analysis of POL II dynamics. We finally

show that FCS and SPT techniques, under the optimization conditions described, are complementary and allow the identification of two POL II subpopulations with distinct diffusion features in cell nuclei.

Materials and methods

Standard samples preparation

Water:Glycerol (w:g) solutions were prepared considering weight percentage (wt %) with the use of a precision balance. Solutions were vortexed for 30 sec before being stocked at 37°. Few minutes before acquisitions, to avoid agglomerations of beads, we diluted our fluorescents beads stocks in two distinct manners :

- 100 nm beads (Molecular Probes, Fluorescent microspheres (505/515), 0,04µm, 2% solid) diluted at 10⁻⁴ in solution for SPT acquisition
- 40 nm beads (Molecular Probes, Fluorescent microspheres (505/515), 0,04µm, 2% solid) diluted at 10⁻² in solution for FCS acquisition

Beads solutions were finally deposited in 35-mm glass-bottom dishes (Ibidi, Clinisciences, France) and kept at 37° in a thermostatic chamber during acquisitions.

The theoretical values of beads' diffusion are calculated according to the Stokes-Einstein formula :

$$D = \frac{kT}{6\pi r\mu}$$

With k Boltzmann constant, T temperature in Kelvin, r the hydrodynamical radius of the bead and μ the viscosity.

Viscosities values of different (w:g) solutions are calculated following Takamura et al. (Takamura et al., 2012) and are indexed in the following table.

% glycerol	Calculated value of D for 40nm beads	Calculated value of D for 100nm beads
	D (µm ² /s)	D (µm ² /s)
0	15.1	5,98
10	12.1	4,78
20	9.05	3,58

Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell

50	3.24	1,25
80	0.4	0,19

For different standard two sub-populations studies, we mixed table of trajectories coming from different viscosities conditions. The different conditions, and the different fractions for each mixes are indexed in the following tables :

Condition A		Total number of trajectories	Nb of trajectories for D1	% D1	Nb of trajectories for D2	% D2
D1=4 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (w :g =100 :0) & D2=0.1 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (w :g=20 :80)	m1	2013	845	42	1168	58
	m2	3118	2339	75	780	25
	m3	3369	842	25	2527	75

Condition B		Total number of trajectories	Nb of trajectories for D1	% D1	Nb of trajectories for D2	% D2
D1=0.9 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (w :g =50 :50) & D2=0.1 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (w :g=20 :80)	m1	2027	932	46	1095	54
	m2	3207	1860	58	1347	42
	m3	3633	908	25	2725	75

Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell

Condition C		Total number of trajectories	Nb of trajectories for D1	% D1	Nb of trajectories for D2	% D2
D1=4.0 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (w :g =100 :0) & D2=0.9 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (w :g=50 :50)	m1	4470	894	20	3576	80
	m2	4791	2443	51	2348	49
	m3	5119	3993	78	1126	22

Condition D		Total number of trajectories	Nb of trajectories for D1	% D1	Nb of trajectories for D2	% D2
D1=4.0 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (w :g =100 :0) & D2=3.8 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (w :g=90 :10)	m1	5293	688	13	4605	87
	m2	5310	2443	46	2867	54
	m3	5398	4049	75	1350	25

Cell line culture :

U2OS cell line (from the American Type Culture Collection, Manassas, VA) was cultured in DMEM medium (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% FCS (vol/vol) and penicillin/streptomycin (100 mg/mL). A U2OS cell line overexpressing RPB1-halo was selected with a 1-week α -amanitin treatment (2 mg/mL). In this cell model, α -amanitin-resistant RPB1-Reach2 was expressed at an endogenous level whereas native RPB1 was degraded. For live-cell imaging, cells were plated on 35-mm glass-bottom dishes (Ibidi, CliniSciences, Nanterre, France), filled with L-15 medium without Phenol Red (Life Technologies, Carlsbad, CA), and incubated at 37°C in a thermostatic chamber (Life Imaging Services, Basel, Switzerland).

Labelling protocol :

Labelling was completed just before imaging. In accordance with HaloTag technology protocol described on promega.com, cells were incubated for 30min with 0,1nM for SPT and 1 nM for FCS with JF 549 or JF 503 solutions diluted in DMEM (Life Technologies, USA) with 10% SVF. Then, cells were rinsed 3 times with DMEM + 10% SVF, and re-incubated during 30min. Finally, cells medium were changed for L-15 medium (Life Technologies, CA, USA) before imaging, to avoid auto-fluorescence of DMEM.

SPT set up :

SPT measurements were performed with an inverted microscope (Ti-Eclipse, Nikon Instrument, Japan) adapted with a x100 NA=1,49 TIRF water immersion objective and an appropriate dichroic 405/488/561/635nm (ref Di03-R405/488/561/635 SEMROCK, USA) The excitation (488nm Argon LASER, Melles-Griot, USA and 561nm, OXXIUS, France) were injected in TIRF Nikon module into a monomode fiber and focused in the back plan of objective. Illumination is performed in HiLo mode (Tokunaga et al., 2008) to improve contrast in images. Perfect Focus System (PFS, Nikon) is set to avoid drift on Z-axis (defocusing) on the objective, relative to the coverslip. Experiments were acquired under continuous illumination (488nm 20 kW/cm² on the sample, or 561nm 20 kW/cm² on the sample). Emitted fluorescence is filter by dichroic and image is projected on a sCMOS camera (PCO EDGE 4.2, PCO, Germany), pixel size 6,5µm. Acquisitions

format was 100x100 px, and acquisition rate was set at 100 Hz (10 ms per frames). All devices were driven by NIS software (Nikon Instruments, Japan). A thermostatic chamber ('on-stage-incubator', OKOLAB, Italy) is used to keep samples at 37 Celsius degrees.

FCS set up :

FCS measurements were performed on a Nikon A1 confocal microscope (Nikon Instrument, Tokyo, Japan) with a 40x objective NA=1,25 (Nikon Instrument, Tokyo, Japan). Excitation Argon LASER 488nm (Coherent, USA) is used to scan samples in confocal illumination. To select spectrally the excitation from the emitted light, we used a band pass dichroic mirror (405/488nm). Fluorescence photons are collected on a photodiode and images were reconstructed with NIS software (Nikon Instruments, Tokyo, Japan).

To perform FCS, the CLSM is adapted with TCSPC module (PicoQuant, Germany) and a pulsed laser at 488 nm LASER (ref : LDH-D-C 488, PicoQuant), a TCSPC unit and a single molecule counting detector (SPCM CD 3516H, Excelitas Technologies Corp., USA). To drive these photons counting system, we used SymphoTime software (PicoQuant, Germany) in FCS mode. High pass filter (BLP-488R, SEMROCK, USA) is set before the detector.

SPT data analysis:

Traces are reconstructed (detection and tracking) with MTT algorithm tracking software (Sergé et al.) running on MATLAB (MathWorks), which is well adapted for high concentration of particles (up to 10 for a 100x100px field of view). For each condition, we had a least 1000 trajectories lasting more than 10 detections (smaller trajectories are not included in the analysis). Traces were then analysed with custom MATLAB routines partially kindly given by Laura Caccianini (Equipe Coppey/Hajj, Institut Curie, France). Both TEA-MSD and h-MSD techniques are based on the Time-Average MSD calculation $TA - MSD(\tau) = \langle r^2(\tau) \rangle_T = \langle [x(t + \tau) - x(t)]^2 + [y(t + \tau) - y(t)]^2 \rangle_T \propto 4D\tau^\alpha$ where $\tau = n\Delta t$, with n the number of frames considered for the sliding average ($0 < n < L_{traj}$, L_{traj} the length of the trajectory), Δt the lag time between two frames (10ms), D the diffusion coefficient ($\mu\text{m}^2/\text{s}$), and α is the anomaly coefficient.

For TEA-MSD analysis, TA-MSD(τ) were calculated for all individual traces, and for each $\tau = n\Delta t$, we averaged the TA-MSD(τ) over the ensemble of traces. The 20 first points of TEA-MSD curves are then fitted with the « Curve Fitting Application » of MATLAB, with a power law curve such as $TEA-MSD(t) \propto t^\alpha$ (Elf et al., 2007), with α the anomaly coefficient. For an ensemble of particles describing a mono-population (diffusion coefficient D and anomaly coefficient α normally distributed), we can adjust a power law function such as $TEA-MSD \propto 4Dt^\alpha$. Nevertheless, as soon as we observe more than one population with different diffusion coefficient, the last relation is not rigorously true. To be sure that we can use correctly the MSD, we should verify that the MSD for different lag times are distributed normally.

For H-MSD, each trace was treated individually as described in (Etoc et al., 2018; Normanno et al., 2012). The TA-MSD curves are fitted with a linear fit until $\tau = 60 \text{ ms}$ in order to obtain the instantaneous diffusion coefficient (D_{60ms}) following the previous works of Michalet et al. describing the right procedure to analyse the individual MSD curve (Michalet, 2010). Systematically for all curves, the first point MSD($1\Delta t$) is not considered in the fit, because it is the same order of magnitude than the static localization error (50nm, calculated on fixed RPB1-Halo in U2OS cells). To be strictly rigorous, only MSDs describing a diffusion coefficient of less than $0,1\mu\text{m}^2/\text{s}$ should have their MSD($1\Delta t$) excluded.

Anomaly coefficient alpha is calculated by fitting the log-log representation of the TA-MSD with a power law function $TA-MSD(t) \propto 4Dt^\alpha$. For individual traces, it is common that the second half of the MSD curve is very noisy because of the low statistics for each MSD($n\Delta t$) value. We decided to consider the first third of the curve for the linear fit, because more than the second half of the MSD curve is noisy and cannot be interpreted. The slope of the regression line gives alpha.

$\alpha-D_{60ms}$ maps (Etoc et al., 2018) are generated with MATLAB with scattercloud function. That function uses iterative Expectation-Maximisation algorithm optimization to adjust the data.

FCS analysis :

FCS set up is calibrated with ATTO 488 diluted at 10 nM in milliQ water to define the focal volume. In the water, the Atto 488 diffusion coefficient is $536 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (source : PicoQuant Application Note

Kapusta and GmbH, n.d.)- Calibration of the focal volume is performed according to the protocol described by Furlan et al. (Furlan et al., 2019)

The number N of molecules in this observation volume V was inferred from the autocorrelation function with

$$N = \frac{1}{G(0)} \quad (1)$$

and the observation volume determined with :

$$V_{eff} = \frac{1}{G(0) \cdot N_A \cdot c} \quad (2)$$

N_A being the Avogadro number and c the concentration of the calibration solution.

Once calibration is done, we can proceed to the analysis of fluctuation. For that we use a home written MATLAB code named EASY FCS (Furlan et al., 2019) which can performed autocorrelation function (ACF) and fitting by having the fluorescence signal over time.

In the case of normal diffusion the ACFs are adjusted with a Gaussian function (assuming the beam has a gaussian profile) :

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)} \right) \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{w_0^2}{z_0^2} \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)}} \right) \quad (3)$$

Where N is the number of molecules and τ_D is the characteristic residence time.

For anomalous diffusion, the mean square displacement is no longer linearly dependent on time, but it evolves proportionally with time to the power of α . In this case, the autocorrelation function becomes:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)^\alpha} \right) \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{W_0^2}{Z_0^2} \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)^\alpha}} \right) \quad (4)$$

The fitting of the ACFs was done with the Trust-Region-Reflective Least Squares Algorithm. To evaluate the goodness of the fit, we used the sum of the squared error.

Results

In order to characterize the sensitivity of both SPT and FCS techniques, we used a model based on the diffusion of fluorescent beads in different media of controlled viscosity, as described in M&M.

TEA-MSD and H-MSD characterization with mono-population model

In order to recapitulate the apparent diffusion parameters observed in the literature for the proteins of the transcription complex in the nucleus, i.e. between. 0.1 and 15 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Grünwald et al., 2008; Izeddin et al., 2014), we selected appropriate water:glycerol ratios and beads dimension to perform SPT and FCS experiments (fig1A).

SPT-acquisitions were performed in HiLo microscopy mode (Tokunaga et al., 2008). This technique is currently used for nucleus imaging because it allows a selection of the plan of observation thanks to a very inclined optical sheet (order of magnitude for thickness : 5-6 μm) (Liu et al., 2016). The lag time between two frames was set to 10ms as we usually do for with biological assays. With an objective x100, NA=1,49 we obtained an image pixel size of 65x65.nm. Temporal image series were analysed with the MTT algorithm tracking software (Sergé et al., 2008) in order to detect and reconstruct trajectories of the particles. Only traces with more than 10 detections are selected in order to reduce the errors induced by the stronger false detections for short trajectories and the problem of stability of the function adjustment methods which is also strongly penalized for short trajectories (Michalet, 2010). In SPT tracking step, a lot of misconnection can occur. In fig S1 C&D, we described an experiment within which we performed SPT tracking on a fixed sample data set (RPB1-Halo-JF 549 in U2OS fixed cells). We showed that with our classical tracking parameters (D maximum expected=10 $\mu\text{m}^2/\text{s}$), we obtained 1444 trajectories of more 3 detections, in a 2000 frames data set. Averaged length of these trajectories was 8 detections. Misdetections are the first source of possible errors in SPT experiments, and we must be extremely careful about it. For that reason, we only selected trajectories for more than 10 detections, which are more reliable and more operable. Figure S1-D shows the distribution of the trajectory lengths as a function of percentage of glycerol for standard samples (100nm beads diffusing in different solutions' viscosities). It shows that the average length of the trajectories

does not increase significantly for higher concentration of glycerol, i.e. lower diffusion coefficients. We can assume that for diffusion coefficients between 0.1 and 4 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ there is no major bias due to the proportion of trajectory lengths. We obtained more than 2000 trajectories of beads for each condition. Traces analyses were performed with a home-made software running on MATLAB. We tested the accuracy of two different Mean Square Displacement (MSD)-based analysis methods more currently used. The first method is the TEA-MSD (Time Ensemble Average-MSD) analysis, which relies on averaging MSD of individual trajectories over the time and over the batch of traces. The second one is the histogram analysis (called H-MSD), which is based on the MSD analysis of each trajectory individually, and the study of diffusion features in a histogram representation (Etoc et al., 2018). We analysed our trajectories with both methods with anomalous model to make any a priori on the diffusion mode.

We extracted two diffusing parameters from each method : for TEA-MSD, D_α is the apparent diffusion coefficient which corresponds to the explored surface (μm^2) over time (s^α), and α the anomaly coefficient which corresponds to the coefficient of the power law characterizing the evolution of MSD over time. D_α and α are calculated with a two-parameters fit of the MSD curve, which means that both factors are co-dependant. H-MSD is calculated as previously described by Etoc et al. The coefficient of diffusion $D_{60\text{ms}}$, corresponds to the explored surface (μm^2) over time (s) measured at short time scale (60ms). It is calculated as the director coefficient's fitting of the first 5 points of the curve, assuming that we have Brownian diffusion at short time scale (Michalet, 2010; Michalet and Berglund, 2012). On longer time scale the MSD curves are fitted with anomalous diffusion model, $\text{MSD} \propto t^\alpha$ (Saxton 2007). Experimentally, α is determined as the director coefficient of MSD curves in log-log representation.

For beads with Brownian mono-populations, we observed the same dimension of measurement for D_α and $D_{60\text{ms}}$ with this definition and we can compare these values.

Figure 1 shows the comparison of the two analytical methods and the theoretical values for tracking beads in media of different densities. The values of α coefficients obtained by both methods were comprised between 1.0 and 1.1 for water:glycerol ratios between 100:0 and 50:50 (see fig 1A and table fig S1-A). The experimental values found by both methods are slightly above

the theoretical value, namely 1 for a free diffusion (4.7% and 10 % error for TEA-MSD and h-MSD respectively), nevertheless, we noticed quite large standards deviations for H-MSD (up to 0.1). For a 20:80 water:glycerol ratio, corresponding to low diffusion conditions, the value of α is significantly lower, and decreases around 0,8 (mean value of 0.83 ± 0.02 and 0.76 ± 0.2 for TEA-MSD and h-MSD respectively). It is noteworthy that the mixture 20:80 water:glycerol might be non-perfectly homogenous due to the high viscosity of glycerol and that may result in anomaly in diffusion, as already described in the literature (Banks et al., 2016; Banks and Fradin, 2005).

For each water:glycerol ratio, the diffusion coefficients (D_α and D_{60ms}) calculated with both methods are compared with theoretical values (fig 1B). For both analysis method, the diffusion coefficients values (D_α and D_{60ms}) obtained are the same order of magnitude than the theoretical values but for D higher than $4\mu\text{m}^2/\text{s}$ (water solution and 10 % glycerol) both methods have difficulties to retrieve the exact absolute values . For water condition, the errors of D estimation is 19% and 33 % respectively for TEA-MSD and H-MSD (see supplementary data S1-B). This phenomenon, as previously described by Qian et al. (Qian et al., 1991; Wieser and Schütz, 2008) is related to measurement errors induced by the movement of the bead during the acquisition time.

FCS characterization

In order to compare the measurements by SPT and FCS, we applied a similar strategy with beads in several mixing water:glycerol. However, since the experimental focal volume was in the order of 200nm diameter in the x-y axis, the use of 100nm-diameter beads resulted in huge bursts of fluorescence during signal acquisition, which were misinterpreted during the Autocorrelation Function (ACF) process. We therefore chose smaller fluorescent beads (40nm-diameter) which allowed us to measure fluorescence fluctuations and infer their diffusion coefficients. In that way, we could address a D range comprised between 0.4 and $15.1\mu\text{m}^2/\text{s}$, which is in the same order as previous SPT measures. For each condition, we performed about 30 measurements of 30 sec, which were then analyzed with the custom MATLAB-based software EasyFCS (Furlan et al., 2019). The ACF were fitted with anomalous model.

As previously, the values of α coefficients were calculated by characterizing the beads diffusions under several medium viscosities (fig 2). Fig 2A shows that the experimental value of α is very close to the theoretical value of 1 (between 0.96 and 1.02), (See table fig S2-A in supplementary data for values). The standard deviation is around 0,02 for these conditions, indicating a great reproducibility in measurements of α coefficient for brownian conditions. For the solution containing 80% glycerol, the alpha value decreases to 0.70 +/- 0.02, which is coherent with data from the literature (Banks et al., 2016) and with anomaly observed previously in SPT experiments

Diffusion coefficients (D_α) measured by FCS (fig 2B), show a strong correspondence between the measured and theoretical values (see table figure S2-B for details of values). In more details, FCS has a tendency to over-estimate the values of D_α , especially for higher concentration of glycerol (D smaller)–Nevertheless, for less viscous solution, i.e. higher diffusion coefficient, percentage of error is less than 3%. Concerning the standard deviation is very low, but it gets more consequent with D_α increasing (from 0.19 for smallest D up to 1.84), see table figure S1-B.

H-MSD analysis is sensitive enough to detect subpopulations with different diffusion coefficients

We have mixed the trajectories described above in order to reproduce a level of apparent complexity close to that observed in biological environments. We are virtually mixed our experimental trajectories coming from two different viscosity media with different proportions. For example: condition A is composed by a mix of two trajectories' populations from measurement in w:g 100:0 and 20:80 with respectively mean measured diffusion coefficient of $D1=4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D2=0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$. To test the effect of proportion of each population of diffusion coefficients $D1$ and $D2$, we work with three different ratios $m1$, $m2$, and $m3$ (%of $D1$: %of $D2$), for example $m1$ (42%:58%), $m2$ (75%:25%) or $m3$ (25%:75%). We define four conditions (A, B, C and D) to see the effect of different mean diffusion coefficients on the analysis. The tables of description of several mixes is given in M&M.

We then tested the ability of the-analysis method H-MSD to estimate the parameters as: diffusion coefficient, anomalous coefficient, and proportions of both populations.

The mixture of trajectories was analyzed by the H-MSD method (figure 3). Figure S3 shows the distribution histograms of the D_{60ms} and α values calculated by the H-MSD method for each mixture and according to the proportions of trajectories. For condition A mix m1 (initial value : $D_1=4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and $0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$; 42%/58%), we clearly observed a bimodal distribution of the D_{60ms} histogram (figure S3-A) with a mean value respectively $3.76 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($SD=0.65$) and $0.09\mu\text{m}^2/\text{s}$ ($SD=0.02$) The histogram of the distribution of the alpha coefficients shows typically a mono-modal distribution centred on 1.1 ($SD= 0.07$). Figures S3 B, C, D show the results for the conditions B, C and D respectively. Figure 3, tables summarize the values found with the different mixes m1 m2 and m3 for each condition.

Figure 3A, gave results for condition A ($D=4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$). For the three mixes m1, m2 and m3, we obtained measured diffusion coefficients for fastest populations very near to initial values, between 3.68 and $3.76\mu\text{m}^2/\text{s}$ for all mix versus initial value of $4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ ($SD=0.6$). For the slowest population, diffusion coefficients measured are $0.09\mu\text{m}^2/\text{s}$ (SD between 0.02 and 0.06) for an initial value of $0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$, i.e. 10% error. Gaussian fitting of α distribution gives values between 0.83 and 1.01 with a standard deviation of 0.1 for each mix.

For condition B ($D=0.9\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$) (fig 3B), fitting returned values between 0.84 and 0.90 for the fastest diffusion coefficient, i.e. 6% error. For the slowest, we obtained 0.10 - $0.11 \mu\text{m}^2/\text{s}$ i.e. 10% error. Concerning α histogram, adjustments of data returned α values between $0,81$ and $0,96$ with standard deviations around $0,1$ which is not consistent with Brownian motion, but can be explain with the presence of data coming from 20:80 w:g solution that already showing anomaly.

For condition C ($D=4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=0,9\mu\text{m}^2/\text{s}$) (fig 3C) for the fastest population, H-MSD gave accurate values, between $3.95\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $4.10\mu\text{m}^2/\text{s}$ (SD between 0.45 and 0.93). For the slowest population, algorithm returned values between 0.81 and $0.87\mu\text{m}^2/\text{s}$ ($SD=0.02$ and 0.06 respectively), i.e. a percentage of error of 10%. For α histogram (supp. data. Fig S3 C), we observed a unique gaussian centered around 1, as we previously observed. Fitting gave α between 1.05 and 1.07 with a standard deviation of 0.07 .

We observed for each mixing that the proportions measured are very near to initial value. The largest percentage error was identified at 19% for condition C m2. Otherwise for other conditions and mixes, percentage errors on calculated fractions is around 5%.

Concerning condition D, where mean diffusion coefficients are very close (4.0 and $3.8\mu\text{m}^2/\text{s}$), we do not observe two distinct gaussians (see supp data S3 D). With a fit with one gaussian function, we obtain a mean value between 3.5 and $3.8\mu\text{m}^2/\text{s}$ i.e. 12% error.

That kind of standard data are perfect to test selection model methods. Minimization of BIC criterion is often used to find the right number of parameters for adjustment with a mixture of gaussian functions. We calculated BIC criterion for 1, 2 or 3 parameters Gaussian mixture model for each condition A, B, C and D (see supp. data S4). We found that for all tested conditions, the selected model was the one with a mixture of 3 gaussian functions, which was not in accordance with the input data.

H-MSD analysis method is sensitive enough to described with the sample in term of sub-populations. Even if this technique suffers from quite large standard deviation (around one order of magnitude smaller than the mean value), it is the more adapted to describe our sample as a mixing of several populations. Nevertheless, this technique is dependent of the ability of fitting applications to resolve gaussians distribution when they are overlapping (depending on the mean values of gaussian functions and their standard deviations) (see supp. data fig S3-D).

Characterization of RPB1 molecular dynamics in the nucleus of U2OS cells

We applied the previously described method to quantify the dynamics of polymerase II in the nucleus. We have realized U2OS lines containing a gene coding for RPB1 resistant to alpha-amanitin. Under the condition of selection by alpha-amanitin only the mutant RPB1 gene is expressed. Its level of expression is typically at the level of endogenous proteins in normal condition (Cisse et al., 2013), i.e. around 320 000 RPB1 per cell, i.e. 1000U/m³ (Cook, 1999).

We realized a variant of this mutant fused to a Halo peptide. For the SPT experiments we used fluorophores JF 549 (Grimm et al., 2015) at the concentration of 0,1nM as a marker. For FCS measurements we used fluorophores JF 503 at the concentration of 1nM. For more details see section M&M.

We performed FCS measurement with 5 acquisitions of 30 seconds per cell, for 30 cells approximately. ACF analysis were performed with EasyFCS software and anomalous model (Furlan et al., 2019). We plotted the histogram of $-D_{\alpha}^{FCS}$ and α^{FCS} calculated for each ACF in figure 4. We observed for D_{α}^{FCS} (fig 4A) that one huge gaussian function centered around 1.44 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (SD=0.33) for 80% of ACF. Fittings are represented in supp. data S5. Faster behaviors are detected (up to 17 $\mu\text{m}^2/\text{s}$), with an averaged value of 7.6 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, even if they are not predominant (20%). Concerning α^{FCS} (fig 4B), distribution can clearly be separated in at least two different gaussian functions, one centered around 0.345 (SD=0.002) for 40% of ACF, and the other one around 0.520 (SD=0.002) for 39%. The last 21% is spread all over the distribution and suffers from a larger standard deviation (0,01) compared to others with a mean value at 0,61. This result suggests that in a cell micro-environment of 0.5 μm^3 , FCS detected an at least two distinct averaged behaviors : one very anomalous with $\alpha^{FCS}=0.345$ and another one around $\alpha^{FCS}=0.520$. In the cells, we globally might have two spatial distributions of RPB1, one more anomalous than the other. At this step of the study, SPT measurement can clarify that two distinct behaviors that FCS perceived. Because they are the reflect of local averaged diffusion properties, interpretation of FCS measurements presents limitations, that SPT can overtake.

The SPT acquisitions in 70 U2OS cells were performed by HiLo illumination with a pixel size of $6.5\mu\text{m}$ (sCMOS 4.2 PCO EDGE camera), with a lag time between two frames of 10ms, in the same set up and configurations than for bead samples. Frames stacks were analyzed as previously described 48 521 trajectories were automatically detected by the MTT algorithm, we kept the 1296 trajectories with more than 10 detections Figure S6 shows all the TA-MSD curves of RPB1-Halo-JF549 in log-log representation. In a first approach, two sub-populations were observed (red and blue circle). That suggesting that we have two different particles behaviors at first glance.

Figure 5A is giving the results of TEA-MSD analysis. We clearly see that the curve is not a power law function and cannot be adjust this way. For the first $10\Delta t$, the curve is clearly sublinear showing an α^{TEA} of 0.62 (95% interval of confidence [0.522 ; 0.726]). For lag time between $10\Delta t$ et $20\Delta t$, the curve looks like linear again with $\alpha^{TEA} = 1.15$ (95% interval of confidence [1.043 ; 1.25]). When we looked at the distributions of MSD for short time scale $2\Delta t$ and $5\Delta t$ (see supp. data S6 C-D) we noticed that distributions present one predominantly gaussian centered around $0.01\mu\text{m}^2$. At $10\Delta t$ and $20\Delta t$, we observed then two distinct gaussian functions suggesting that particles behave differently at longer time scale. The averaging of at least two different components non constantly distributed along time creates non-linear effect that is not clearly understandable and interpretable.

We apply H-MSD protocol to analyze our data. First of all, we observed that slower trajectories are more represented than faster ones (fig S7 A) but there is no correlation between the length of the trajectories and the measured diffusion values (fig S7 B). Because the goodness of the TA-MSD fit depends strongly on the number of detections considered, we should not have a worse adjustment for faster molecules than for slower. Figure 4B is showing distribution of D_{60ms} . Two distinct populations have been observed and adjusted by two gaussian functions with mean values of $0.01\mu\text{m}^2/\text{s}$ (SD=0.32) and $0.42\mu\text{m}^2/\text{s}$ (SD=0.63) (see supp data fig. S7 C). The ratio of slower population was 42% against 58% for faster populations. We estimated at 20% of total molecules, the percentage of RPB1 fixed on chromatin (knowing the static localization error of 50nm). Around 53% of the slowest population of RPB1 is totally fixed.

We wanted to attribute a characteristic value of anomaly coefficients to both detected populations. Figure 5C shows the distribution of the anomaly coefficients calculated for each trajectory as previously described. Gaussian mixture model algorithm failed to adjust properly a model on it (see fig S7 D). To tackle this issue, we represent a scatterplot in two dimensions where each trajectory is represented by its diffusion coefficient D_{60ms} in x-axis, and its anomalous diffusion α in the y-axis, for 1296 trajectories analyzed (fig 5D). Gaussian mixture model in two-dimension was applied on the graph. It returned that effectively the slowest population ($D_{60ms}=0.01\mu\text{m}^2/\text{s}$) is the most constraint ($\alpha=0.23$), and respectively the faster population ($D_{60ms}=0.43$) which diffuses more freely ($\alpha=0.73$). 2D gaussian functions fit of this scatterplot (see M&M) highlighted two populations of parameters ($D_{60ms} : \alpha$) of almost same proportion (46%:54%): one slowest and more confined ($D_{60ms} ; \alpha$) = (0.01 $\mu\text{m}^2/\text{s}$; 0.23) (SD +/- 0.23 ; 0.01 respectively) the other fastest and free ($D_{60ms} ; \alpha$) = (0.43 $\mu\text{m}^2/\text{s}$; 0.73) (SD +/- 0.56 ; 0.08 respectively).

Discussion

Several works have already been published to compare the methods of FRAP, FCS and SPT. More recently, Harwardt et al. performed a comparison between SPT and a FCS variant called ITIR-FCS by performing simultaneous measurements with both techniques on a same sample (Harwardt et al., 2018). They proposed a simulation approach and experimental measurements of GPI-anchored-mEOS3.2 in the membrane of CHO-K1 cell. According to this work, both techniques gave comparable mean values. However, the distributions of the diffusion coefficients were different. Our results are also consistent with this observation. The authors tried to apply two and three component fits to the ITIR-FCS data, but this gave aberrant diffusion coefficients for the model, i.e. D values $< 0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ or $D > 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$. The authors indicated that it could be due to GPI-anchored proteins temporarily trapped in nanodomains identified in the literature. This shows that FCS techniques, which by nature perform global measurements, are more affected by sub-population behaviours. On the other hand in SPT, molecules are analyzed individually, so that only the temporal average within a single molecule trajectory is performed by local variation, but not the overall average. Mazza et al. also proposed a very interesting work comparing FCS, SPT and FRAP for the study of the diffusion of a transcription factor (P53) (Mazza

et al., 2012). They showed a good consistency between the measurement methods and focused on differences in the measurements of the stationary fraction and residence time. The anomalous model used for P53 study converges to anomalous coefficient $\alpha=0.8$, which classically corresponds to a weakly constrained molecule (crowding effect). In this study the authors identified as immobile molecules with $D < 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (typically H2B, $D = 1.9 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$). The authors used SPT data to guide the kinetic fit model for FRAP and FCS. The authors observed a fixed fraction of 20% for P53.

In this work on RPB1 we have shown by H-MSD a fixed fraction of about 20% of the total detection number at 60ms. FCS is not sensitive to this fixed fraction. But this classical assertion must be modulated by the residence time as shown by Harwardt et al for GPI-anchored nanodomains (Harwardt et al., 2018).

Among the 80% of RPB1 molecules that present a diffusion in our study, the SPT/H-MSD technique allows to highlight several populations. We can first consider two main populations (adjustment by Gaussian pairs). In one hand 46% of the diffusing molecules displayed an anomalous coefficient $\alpha=0.23$ and an instantaneous diffusion coefficient $D_{60ms} = 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$. On the other hand, the other fraction is less constrained (0.73) and diffuses more rapidly $D_{60ms}=0.041 \mu\text{m}^2/\text{s}$. FCS analyses gave a different result with two mobile fractions: a slow population ($D_{\alpha} = 1.44 \mu\text{m}^2/\text{s}^{\alpha}$; $\alpha=0.35$) and a fast population ($D_{\alpha} = 7.6 \mu\text{m}^2/\text{s}^{\alpha}$, $\alpha=0.5$). We observed that the α coefficients were quite well preserved between both techniques, but the diffusion coefficients were different, contrarily to that we had observed for measurements with beads. It should be noted that the standard deviations are large for FCS data.

It is also known that the diffusion coefficients measured by FCS are often higher than those measured by SPT (Harwardt et al., 2018; Mazza et al., 2012). However, it is very important to recall that anomalous diffusion coefficient D_{α} cannot be directly compared to Brownian diffusion coefficient D , because the dimensions of time are different. If in the simple case of Brownian diffusion of beads these values are comparable, this isn't the same for systems with a strong anomaly as we observed for RPB1 in nucleus. This result was expected because of the time being considered with the power α . The study of the distribution diagrams of MSD at different Δt (figure

S6) allows to measure the anomaly at several time scales. It showed the local evolution of this anomaly on short time scales, which were taken into account in the description of slow populations as measured by the two techniques FCS and SPT. The α coefficient was showing highly constrained populations with $\alpha = 0.23-0.35$ by SPT and FCS respectively.

Cho et al, when studying RPB1 recruitment on actin genes in U2OS cells, highlighted two behaviours for RPB1. They quantified the number of molecules constituting clusters and measured their residence time. They observed 10-20% of RPB1 molecules described as fixed i.e. in an active transcription state on the gene. Besides, 90% of the molecules have a much lower residence time. In our measurements the RPB1 molecules in transcription correspond to the 20% of molecules that are immobile for 60 ms or less. The molecules described by Cho et al. as having a shorter residence time in the cluster probably correspond to our fraction with an α coefficient of 0.23 and 0.35 in SPT and FCS respectively. The difference in the diffusion coefficients observed between SPT and FCS seems to indicate that this fraction of RPB1 does not correspond to a homogeneous population. We have two hypotheses: 1) different molecular dynamics are ongoing in the same clusters; 2) several clusters with different specific RPB1 mobility exist. This was further studied in the literature by modifying RPB1 activity. In particular, several models have been proposed to explain the transcription regulation mechanism by measuring the dynamics of RPB1 by FRAP (Darzacq et al., 2007; Steurer et al., 2018). The authors showed a pause step of about 42s and involving 20% of RPB1 (Steurer et al., 2018).

The second main sub-population that we described appears less constrained and faster: ($D_{\alpha} = 7.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $\alpha=0.5$) in FCS and ($D_{60\text{ms}} = 0.41 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $\alpha=0.73$) in SPT. Differences in the diffusion coefficient can be explained by the existence of sub-populations. But one should also take into account that the SPT technique is strongly penalized for the accuracy of measurement of fast molecules (typically $D > 4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in our quantification with beads). This is explained by the acquisition frequency (10ms per image) which limits our sensitivity to the fast molecules. It therefore does not give any information on the existence of faster RPB1 molecules. Also, the analysis of the histogram of D at 60 ms by SPT confirms the existence of this fast population ($D > 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$). It could correspond to free RPB1 molecules in the nucleus. The work of Dross et al with GFP multiplexes showed that the free diffusion in the kernel is spatially variable $D_{\alpha} = 8$ and 87

$\mu\text{m}^2/\text{s}$ ^α (Anomal model). Moreover, the work of Grunwald et al with dextran beads showed coefficients ranging from 0.8 to 5 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Brownian model). It is therefore reasonable to assume that RPB1 has a so-called "free" diffusion in the nucleus which is either constrained by local congestion in the nucleus (chromatin...) or by the contribution of other RPB1 partners.

In conclusion, SPT and FCS represent two complementary approaches to quantify molecular diffusion in living cells. The SPT technique allows to track monofluorescent target molecules in low-concentration and to characterize individual trajectories. FCS is based on the calculation of autocorrelation functions from intensity fluctuations due to the scattering of particles in the observation volume. Thus, the SPT provides specific information on individual particles and the FCS provides an average information with a high degree of statistical significance. The SPT is well suited for the examination of heterogeneous systems. However, the analysis of SPT data is complex and is highly dependent on the quality of the particle tracking and the chosen analysis method. This makes it even more difficult for a novice to obtain reliable data. On the other hand, the creation and fitting of FCS curves is less complex. However, the interpretation of FCS results may be less obvious due to the averaging of the overall data.

With bead characterisation, we have set up a benchmark to cross-interpret FCS and SPT results for the measurement of proteins in the nucleus. We propose a method for SPT analysis called H-MSD inspired by Etoc et al. Characterization with beads in media of known viscosity allows us to move towards a more accurate method to quantify the mobility of molecules in living cells. We propose an analysis of the dynamics of RPB1 presenting three major components and allowing to integrate in a single vision the notions of residence time of RPB1 in clusters and of RPB1 diffusion in the nucleus.

Author contributions

MF, AF and LH designed research. MF and DC performed experiments. MF, AF, AL, HB and LH analysed and interpreted the data. MF, AF and LH wrote the manuscript.

Acknowledgements

We thank all members of our team for their help and comments. We are much grateful to Jonathan Grimm and Luke Lavis (Janelia Farm, VA, USA) for kindly providing us with JF dyes to perform our experiments.

Funding

This work was supported by Ministerial Funding, Agence Nationale de la Recherche (Dynamic-12-BSV5-0018-02), Region “Hauts de France” (CPER Photonics4 Society and I-PRIMER), EquipEX ImaginEx BioMed (PIA / Region Hauts de France), CNRS, and a contract Nikon-CNRS.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Altan-Bonnet, N., Altan-Bonnet, G., 2009. Fluorescence Correlation Spectroscopy in Living Cells: A Practical Approach, in: Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J., Yamada, K.M. (Eds.), *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0424s45>
- Banks, D.S., Fradin, C., 2005. Anomalous Diffusion of Proteins Due to Molecular Crowding. *Biophys. J.* 89, 2960–2971. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.051078>
- Banks, D.S., Tressler, C., Peters, R.D., Höfling, F., Fradin, C., 2016. Characterizing anomalous diffusion in crowded polymer solutions and gels over five decades in time with variable-lengthscale fluorescence correlation spectroscopy. *Soft Matter* 12, 4190–4203. <https://doi.org/10.1039/C5SM01213A>
- Cheezum, M.K., Walker, W.F., Guilford, W.H., 2001. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys. J.* 81, 2378–2388.
- Cho, W.-K., Jayanth, N., English, B.P., Inoue, T., Andrews, J.O., Conway, W., Grimm, J.B., Spille, J.-H., Lavis, L.D., Lionnet, T., Cisse, I.I., 2016. RNA Polymerase II cluster dynamics predict mRNA output in living cells. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.13617>
- Cisse, I.I., Izeddin, I., Causse, S.Z., Boudarene, L., Senecal, A., Muresan, L., Dugast-Darzacq, C., Hajj, B., Dahan, M., Darzacq, X., 2013. Real-Time Dynamics of RNA Polymerase II Clustering in Live Human Cells. *Science* 341, 664–667. <https://doi.org/10.1126/science.1239053>
- Cook, P.R., 1999. The Organization of Replication and Transcription. *Science* 284, 1790–1795. <https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1790>
- Darzacq, X., Shav-Tal, Y., de Turris, V., Brody, Y., Shenoy, S.M., Phair, R.D., Singer, R.H., 2007. In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 796–806. <https://doi.org/10.1038/nsmb1280>
- Elf, J., Li, G.-W., Xie, X.S., 2007. Probing Transcription Factor Dynamics at the Single-Molecule Level in a Living Cell. *Science* 316, 1191–1194. <https://doi.org/10.1126/science.1141967>
- Elson, E.L., 2011. Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. *Biophys. J.* 101, 2855–2870. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.012>
- Etoc, F., Balloul, E., Vicario, C., Normanno, D., Liße, D., Sittner, A., Piehler, J., Dahan, M., Coppey, M., 2018. Non-specific interactions govern cytosolic diffusion of nanosized objects in mammalian cells. *Nat. Mater.* 17, 740–746. <https://doi.org/10.1038/s41563-018-0120-7>
- Furlan, A., Gonzalez-Pisfil, M., Leray, A., Champelovier, D., Henry, M., Le Nézet, C., Bensaude, O., Lefranc, M., Wohland, T., Vandenbunder, B., Bidaux, G., Héliot, L., 2019. HEXIM1 Diffusion in the

Nucleus Is Regulated by Its Interactions with Both 7SK and P-TEFb. *Biophys. J.* 117, 1615–1625. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.09.019>

Geerts, H., De Brabander, M., Nuydens, R., Geuens, S., Moeremans, M., De Mey, J., Hollenbeck, P., 1987. Nanovid tracking: a new automatic method for the study of mobility in living cells based on colloidal gold and video microscopy. *Biophys. J.* 52, 775–782.

Grimm, J.B., English, B.P., Chen, J., Slaughter, J.P., Zhang, Z., Revyakin, A., Patel, R., Macklin, J.J., Normanno, D., Singer, R.H., Lionnet, T., Lavis, L.D., 2015. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat. Methods* 12, 244–250, 3 p following 250. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3256>

Grünwald, D., Martin, R.M., Buschmann, V., Bazett-Jones, D.P., Leonhardt, H., Kubitscheck, U., Cardoso, M.C., 2008. Probing Intranuclear Environments at the Single-Molecule Level. *Biophys. J.* 94, 2847–2858. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.115014>

Hager, G.L., McNally, J.G., Misteli, T., 2009. Transcription Dynamics. *Mol. Cell* 35, 741–753. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.005>

Halford, S.E., Marko, J.F., 2004. How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res.* 32, 3040–3052. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh624>

Hansen, A.S., Woringer, M., Grimm, J.B., Lavis, L.D., Tjian, R., Darzacq, X., 2018. Robust model-based analysis of single-particle tracking experiments with Spot-On [WWW Document]. *eLife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.33125>

Harwardt, M.-L.I.E., Dietz, M.S., Heilemann, M., Wohland, T., 2018. SPT and Imaging FCS Provide Complementary Information on the Dynamics of Plasma Membrane Molecules. *Biophys. J.* 114, 2432–2443. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.013>

Izeddin, I., Récamier, V., Bosanac, L., Cissé, I.I., Boudarene, L., Dugast-Darzacq, C., Proux, F., Bénichou, O., Voituriez, R., Bensaude, O., Dahan, M., Darzacq, X., 2014. Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus. *eLife* 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.02230>

Kapusta, P., GmbH, P., n.d. Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data for FCS Calibration 2.

Kim, T.-K., Lagrange, T., Wang, Y.-H., Griffith, J.D., Reinberg, D., Ebright, R.H., 1997. Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12268–12273. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12268>

Kornberg, R.D., 2007. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 12955–12961. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704138104>

Lee, T.I., Young, R.A., 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* 34, 77–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.77>

Liu, C., Liu, Y.-L., Perillo, E.P., Dunn, A.K., Yeh, H.-C., 2016. Single-Molecule Tracking and Its Application in Biomolecular Binding Detection. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. Publ. IEEE Lasers Electro-Opt. Soc.* 22. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2568160>

Magde, D., Elson, E., Webb, W.W., 1972. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System--- Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* 29, 705–708. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.29.705>

Manley, S., Gillette, J.M., Patterson, G.H., Shroff, H., Hess, H.F., Betzig, E., Lippincott-Schwartz, J., 2008. High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat. Methods* 5, 155–157. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1176>

Mazza, D., Abernathy, A., Golob, N., Morisaki, T., McNally, J.G., 2012. A benchmark for chromatin binding measurements in live cells. *Nucleic Acids Res.* 40, e119–e119. <https://doi.org/10.1093/nar/gks701>

Michalet, X., 2010. Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium. *Phys. Rev. E* 82. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.82.041914>

Michalet, X., Berglund, A.J., 2012. Optimal diffusion coefficient estimation in single-particle tracking. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 85, 061916. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.85.061916>

Normanno, D., Dahan, M., Darzacq, X., 2012. Intra-nuclear mobility and target search mechanisms of transcription factors: A single-molecule perspective on gene expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1819, 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.02.001>

Presman, D.M., Ball, D.A., Paakinaho, V., Grimm, J.B., Lavis, L.D., Karpova, T.S., Hager, G.L., 2017. Quantifying transcription factor binding dynamics at the single-molecule level in live cells. *Methods* 123, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.03.014>

Qian, H., Sheetz, M.P., Elson, E.L., 1991. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.* 60, 910–921.

Sergé, A., Bertaux, N., Rigneault, H., Marguet, D., 2008. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat. Methods* 5, 687–694. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1233>

Steurer, B., Janssens, R.C., Geverts, B., Geijer, M.E., Wienholz, F., Theil, A.F., Chang, J., Dealy, S., Pothof, J., van Cappellen, W.A., Houtsmuller, A.B., Marteiijn, J.A., 2018. Live-cell analysis of endogenous GFP-RPB1 uncovers rapid turnover of initiating and promoter-paused RNA Polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E4368–E4376. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717920115>

Takamura, K., Fischer, H., Morrow, N.R., 2012. Physical properties of aqueous glycerol solutions. J. Pet. Sci. Eng. 98–99, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2012.09.003>

Tokunaga, M., Imamoto, N., Sakata-Sogawa, K., 2008. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. Nat. Methods 5, 159–161. <https://doi.org/10.1038/nmeth1171>

Weiss, M., Hashimoto, H., Nilsson, T., 2003. Anomalous Protein Diffusion in Living Cells as Seen by Fluorescence Correlation Spectroscopy. Biophys. J. 84, 4043–4052.

Wieser, S., Schütz, G.J., 2008. Tracking single molecules in the live cell plasma membrane—Do's and Don't's. Methods 46, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.06.010>

Figure legends

Figure 1. To describe mono-populations, TEA-MSD and H-MSD show similar sensitivities

(a) Graph of alpha values against wt % of glycerol to characterize diffusion of 100 nm beads in water:glycerol solutions. Our w:g solutions were precisely weight with a precision balance and kept at 37degrees to avoid temperature fluctuaction which results in a variation of theoretical D. Our 100 nm beads (Molecular Probes, Fluorescent microspheres (505/515), 0,04µm, 2% solid) where diluted at 10^{-4} in our w:g mixtures and vortexed during 30s just before acquisitions to avoid agglomeration of beads. Acquistions were performed at 37degrees with a Nikon Ti-Eclipse microscope (NIKON, Japan) with HiLo illumination with a sCMOS camera (PCO EDGE 4,2, PCO, Germany). Time between two frames are set to 10 ms to set with biological assays. Traces were reconstructed with MTT algorithm tracking software and analyzed with custom software (MATLAB) with two MSD-based analysis methods: TEA-MSD or H-MSD. Results were compared to theoretical values calculated with Stokes-Einstein equation at 37°.

(b) Graph of diffusion coefficient D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) values against wt % of glycerol to characterize diffusion of 100 nm beads in water:glycerol solutions. Two MSD-based analysis methods were used to calculated D: TEA-MSD and H-MSD and compared to the theoretical values. Blue dots represent the values of D_α obtained by TEA-MSD, and orange dots by D_{60ms} H-

MSD. Blue and orange curves describe the function of D depending on viscosity (proportional to $1/x$ function). The black curve represents the theoretical values. Standard deviations are represented but not visible (see table xx supplementary).

Figure 2. FCS characterization

- (a) Graph of alpha values against wt % of glycerol to characterize diffusion of 40 nm beads in water:glycerol solutions (green dots). Our w:g solutions were precisely weight with a precision balance and kept at 37degrees to avoid temperature fluctuaction which results in a variation of theoretical D. Our 40 nm beads (Molecular Probes, Fluorescent microspheres (505/515), 0,04 μ m, 2% solid) where diluted at 10^{-2} in our w:g mixtures and vortexed during 30s just before acquisitions to avoid agglomeration of beads. Acquistions were performed at 37degrees with a Nikon A1 confocal microscope (NIKON, Japan) adapted with a TCSPC system (SymphoTime, PicoQuant, Germany). Data were analyzed with ACF thanks to EASY FCS our custom software (MATLAB). Theoretical values are plotted in black.
- (b) Graph of coefficient D values against wt % of glycerol to characterize diffusion of 40 nm beads in water:glycerol solutions (green curve). Results were compared to theoretical values calculated with Stokes-Einstein equation at 37° (black curve).

Figure 3. H-MSD analysis is sensitive enough to detect subpopulations with different diffusion coefficients

- (a) To test the ability of H-MSD analysis to retrieve different populations diffusion parameters (proportion and diffusion coefficient) we artificially merge together bundles of traces coming from different experimental data of 100 nm beads diffusing in w:g solutions. Condition A contains diffusion traces for beads with a $D_1=4.0 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (100:0 w:g solution) and $D_2=0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (20:80 w:g solution) in different proportions m_1, m_2, m_3 . In this table appears the initial known values of proportions and diffusion coefficient and calculated associated values.
- (b) Following the same principle as before, condition B contains diffusion traces for beads with a $D_1=0.9\mu\text{m}^2/\text{s}$ (50:50 w:g solution) and $D_2=0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$ (20:80 w:g solution) in different proportions m_1, m_2, m_3 . In this table appears the initial known values of proportions and diffusion coefficient, and associated values calculated by H-MSD.
- (c) Condition B contains diffusion traces for beads with a $D_1=4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ (50:50 w:g solution) and $D_2=0.9\mu\text{m}^2/\text{s}$ (20:80 w:g solution) in different proportions m_1, m_2, m_3 . In this table appears the initial known values of proportions and diffusion coefficient, and associated values calculated by H-MSD.
- (d) Condition D contains diffusion traces for beads with a $D_1=4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ (50:50 w:g solution) and $D_2=3.8\mu\text{m}^2/\text{s}$ (20:80 w:g solution) in different proportions m_1, m_2, m_3 . In this table appears the initial known values of proportions and diffusion coefficient, and associated values calculated by H-MSD.

Figure 4. Characterization of RPB1 molecular dynamics in the nucleus of U2OS cells in FCS

(a) Histogram of D_α calculated on each ACF with anomalous model. ACF were analysed with EasyFcs (Furlan et al. 2019)

(b) Histogram of α calculated on each ACF with anomalous model.

Figure 5. Characterization of RPB1 molecular dynamics in the nucleus of U2OS cells in SPT

- (a) This graph represents TEA-MSD calculated over 1296 trajectories. The curve does not follow a power law function. We can distinguish two predominant behaviours. One at short time scale (up to 100ms) sublinear power law function $\alpha=0,62$. The second behaviour predominant for larger time scale (between 100 to 200 ms) shows linear properties.
- (b) Histogram of D_{60ms} plotted with home-made routine MATLAB.
- (c) Histogram of α plotted with home-made routine MATLAB.
- (d) Scatterplot of parameters couple ($D_{60ms}; \alpha$) for each trajectory. The plot is fitted with a mixing of 2D gaussian functions thanks to the application *fitgmdist* on MATLAB. Colorful circles represents same density sections.

**Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS
and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell.**

M. Fournier et al

FIGURES

Legends are described in the main text.

FIGURE 1

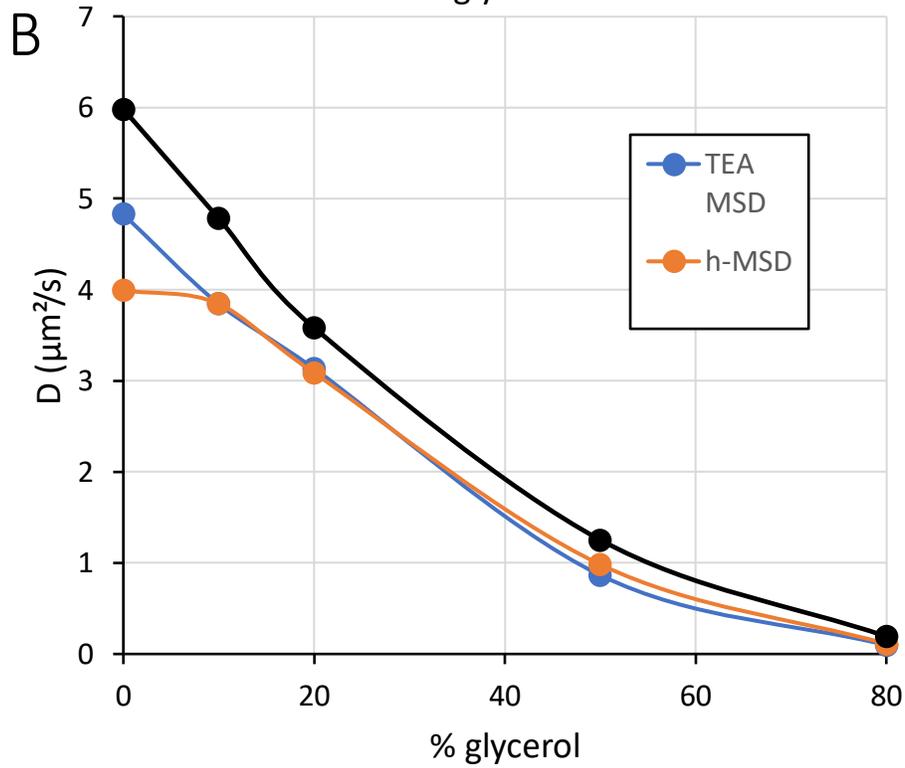
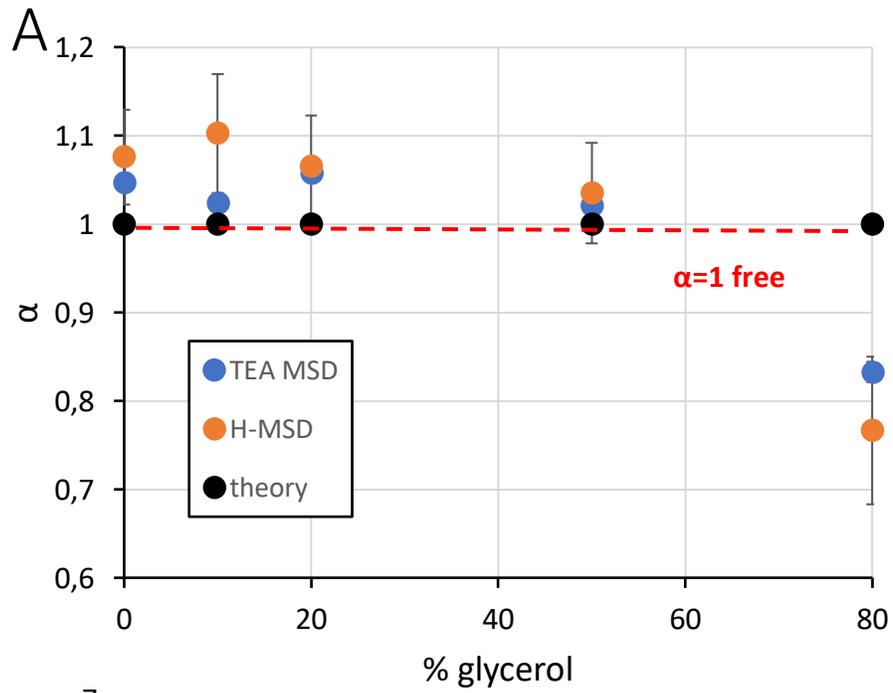
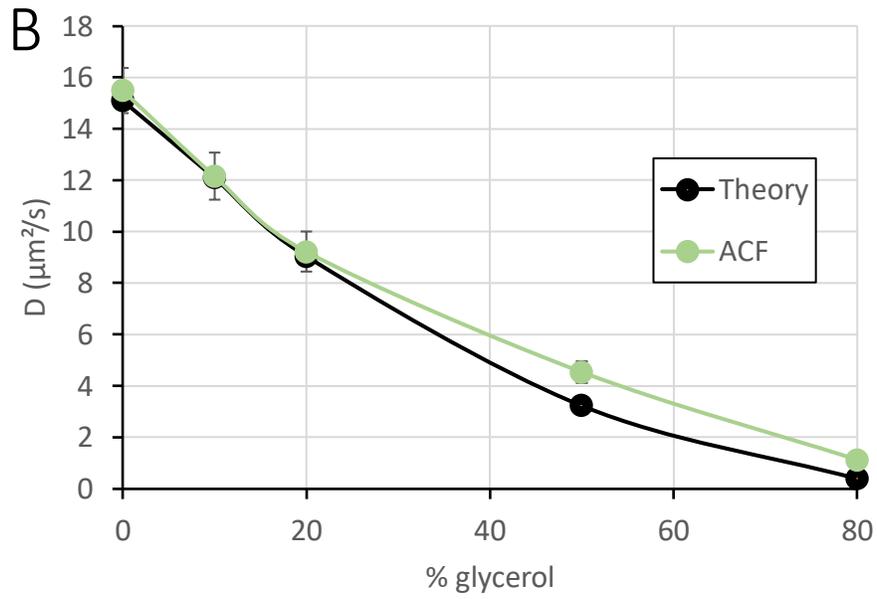
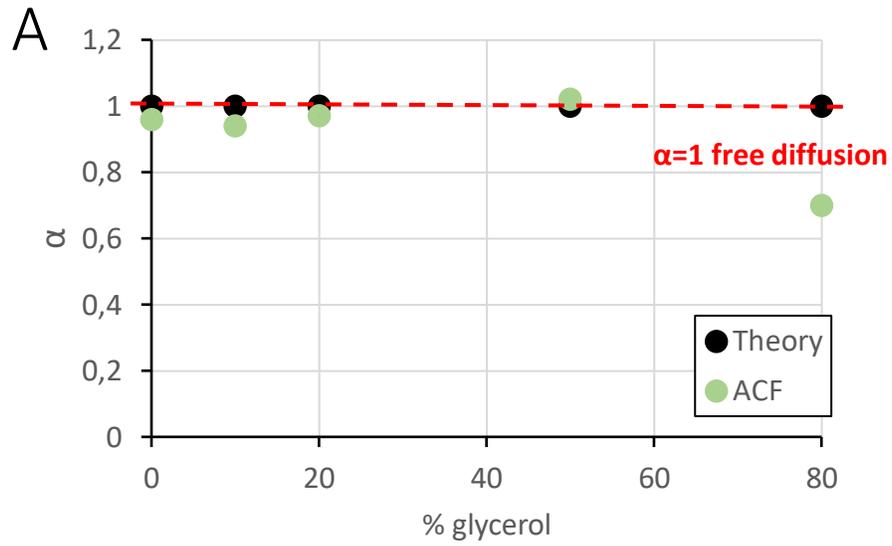


FIGURE 2



A

Condition A		Input	Calculated by H-MSD analysis
Mix D1=4.0$\mu\text{m}^2/\text{s}$ + D2=0.1$\mu\text{m}^2/\text{s}$			
Mix 1 (m1)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	4.0	3.76 (SD=0.65)
	% pop 1	42%	40%
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.1	0.09 (SD=0.02)
	% pop 2	58%	60%
Mix 2 (m2)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	4.0	3.68 (SD=0.61)
	% pop 1	75%	73%
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.1	0.09 (SD=0.06)
	% pop 2	25%	27%
Mix 3 (m3)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	4.0	3.76 (SD=0.63)
	% pop 1	25%	24%
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.1	0.09 (SD=0.04)
	% pop 2	75%	76%

B

Condition B		Input	Calculated by H-MSD analysis
Mix D1=0.9$\mu\text{m}^2/\text{s}$ + D2=0.1$\mu\text{m}^2/\text{s}$			
Mix 1 (m1)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.9	0.88 (SD=0.07)
	% pop 1	46%	43%
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.1	0.10 (SD=0.05)
	% pop 2	54%	57%
Mix 2 (m2)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.9	0.84 (SD=0.06)
	% pop 1	58%	66%
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.1	0.11 (SD=0.04)
	% pop 2	42%	34%
Mix 3 (m3)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.9	0.90 (SD=0.07)
	% pop 1	25%	23%
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.1	0.10 (SD=0.04)
	% pop 2	75%	77%

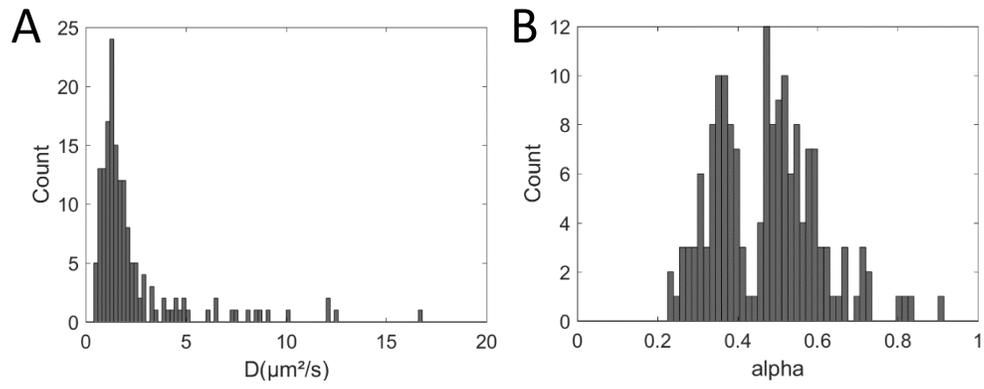
C

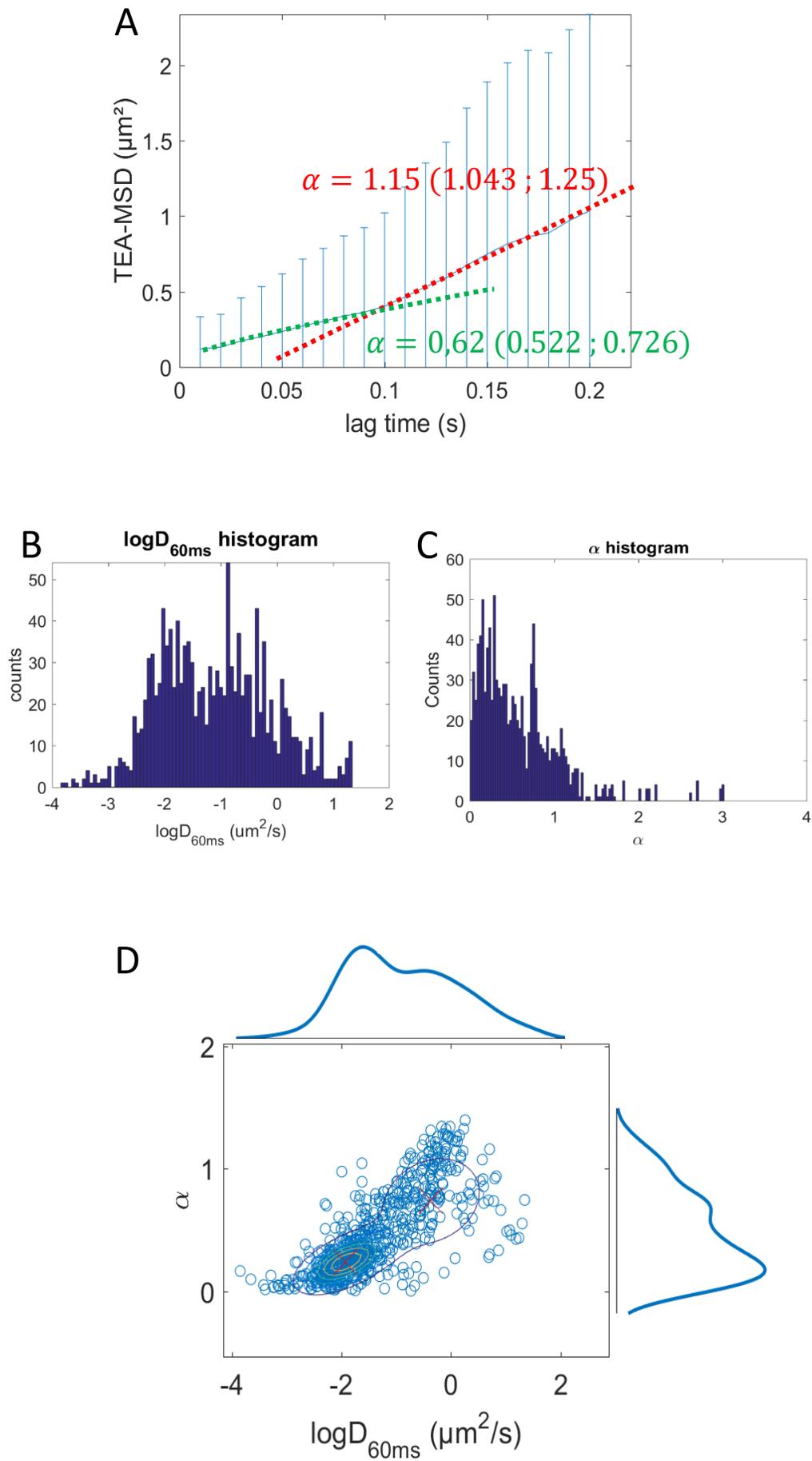
Condition C		Input	Calculated by H-MSD analysis
Mix D1=4.0$\mu\text{m}^2/\text{s}$ + D2=0.9$\mu\text{m}^2/\text{s}$			
Mix 1 (m1)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	4.0	3.95 (SD=0.93)
	% pop 1	20%	15%
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.9	0.81 (SD=0.04)
	% pop 2	80%	85%
Mix 2 (m2)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	4.0	4.01 (SD=0.45)
	% pop 1	51%	41%
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.9	0.82 (SD=0.74)
	% pop 2	49%	59%
Mix 3 (m3)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	4.0	4.10 (SD=0.45)
	% pop 1	78%	67%
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.9	0.87 (SD=0.42)
	% pop 2	22%	33%

D

Condition D Mix D1=4.0 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ + D2=3.8 $\mu\text{m}^2/\text{s}$		Initial	Calculated by H-MSD analysis
Mix 1 (m1)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	4.0	1 population detected 3.5 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (SD=0.7)
	% pop 1	13%	
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	3.8	
	% pop 2	87%	
Mix 2 (m2)	D1 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	4.0	1 population detected 3.6 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (SD=0.9)
	% pop 1	46%	
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	3.8	
	% pop 2	54%	
Mix 3 (m3)	D1($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	4.0	1 population detected 3.8 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (SD=0.8)
	% pop 1	75%	
	D2 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	3.8	
	% pop 2	25%	

FIGURE 4





**Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS
and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell.**

M. Fournier et al

SUPPLEMENTARY DATA

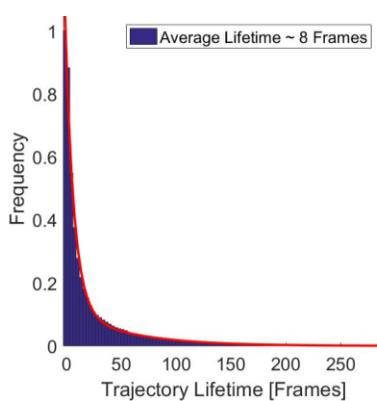
A

% glycerol	TEA MSD			H-MSD		Theory
	mean α	interval 95%	Std α	mean α	Std α	α
0	1.047	0.035	0.009	1.1	0.1	1
10	1.024	0.027	0.007	1.0	0.1	1
20	1.058	0.01	0.002	1.0	0.1	1
50	1.021	0.018	0.004	1.0	0.1	1
80	0.83	0.0914	0.02	0.8	0.2	1

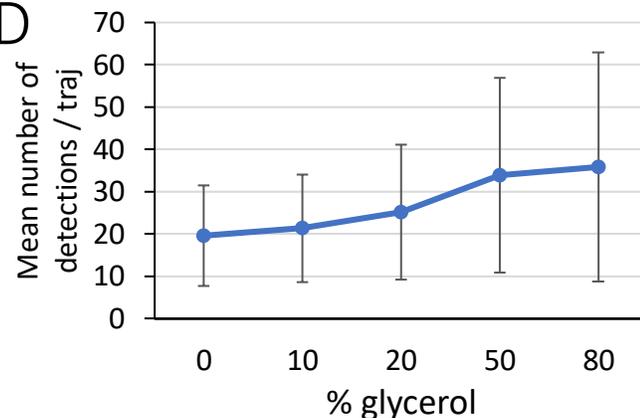
B

% glycerol	TEA MSD			h-MSD		Theory
	mean D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	interval 95%	Std D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	mean D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Std D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
0	4.83	0.33	0.08	4.0	0.1	5.98
10	3.84	0.204	0.05	3.8	0.1	4.78
20	3.13	0.064	0.01	3.0	0.1	3.58
50	0.864	0.031	0.007	0.9	0.1	1.25
80	0.095	0.019	0.004	0.1	0.1	0.19

C



D



(A) Table with mean α values and corresponding standard deviations calculated by TEA-MSD and H-MSD vs theory. (B) Table with mean D values ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) and corresponding standard deviations calculated by TEA-MSD and H-MSD vs theory. (C) Characterization of mistracking with a movies of 2000 frames of a fixed sample of RPB1-Halo in U2OS cell. MTT algorithm parameters were filled out with the same parameter than for beads and live cells studies (with a coefficient diffusion expected at $10\mu\text{m}^2/\text{s}$), after detection and tracking, it detected 1444 trajectories of more than 3 points, with an averaged length of 8 detections per trajectories. Even if molecules do not move, in this configuration, MTT algorithm find 1444 false trajectories over 2000 frames. (D) For each (w:g) solution conditions, 100nm-beads dynamic is studied with SPT. In this graph is represented the average number of detection per trajectories for each condition, and their standard deviations. We noticed that even if mean values tends to increase with percentage of glycerol (i.e. diffusion coefficient slower), we have no significant differences between each condition. We can assume that we should not have major bias within this range of diffusion coefficients ($0.1\text{-}4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$) in the interpretation of data, due to an over-representation of slower beads.

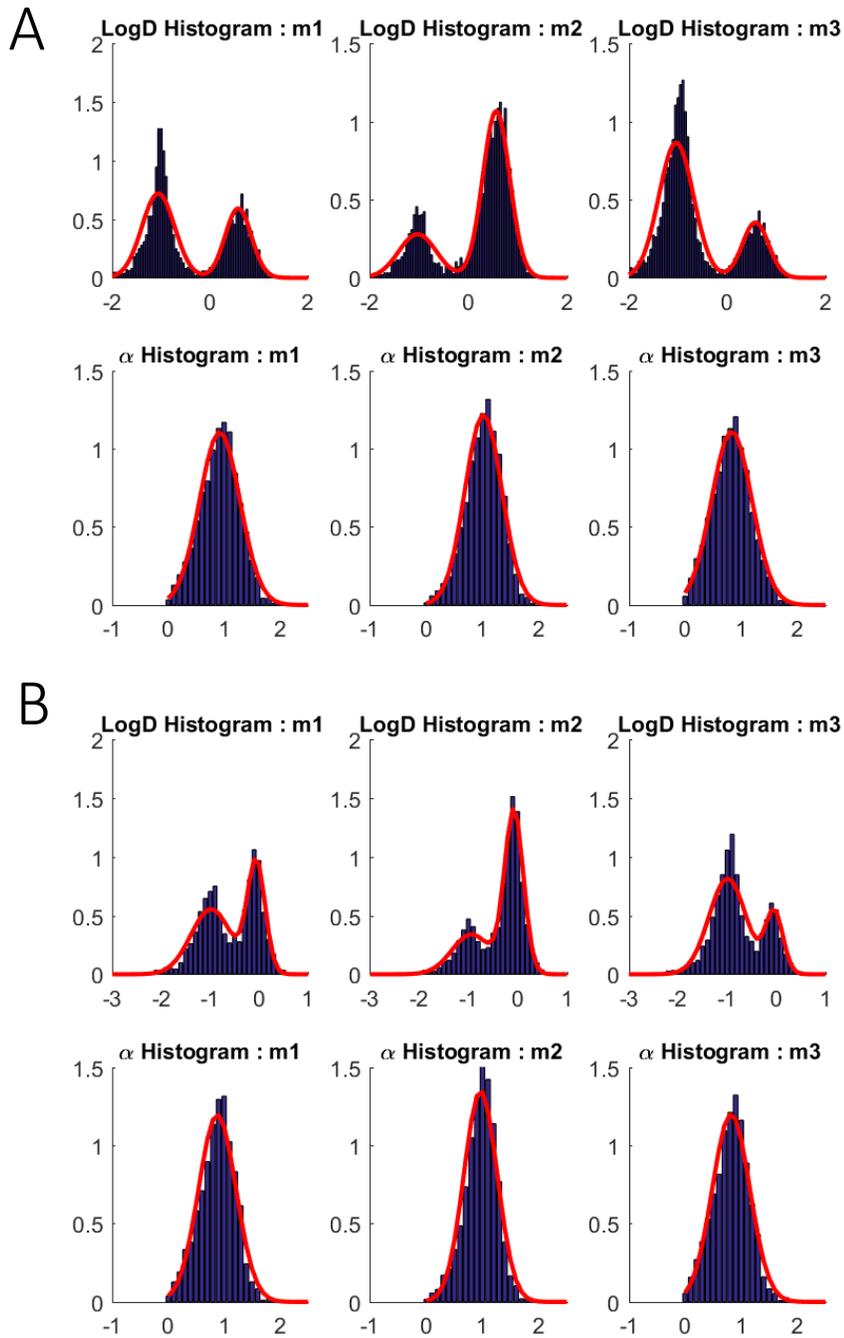
A

% glycerol	ACF		Theory
	mean α	Std α	α
0	0.96	0.01	1
10	0.94	0.02	1
20	0.97	0.02	1
50	1.02	0.02	1
80	0.7	0.02	1

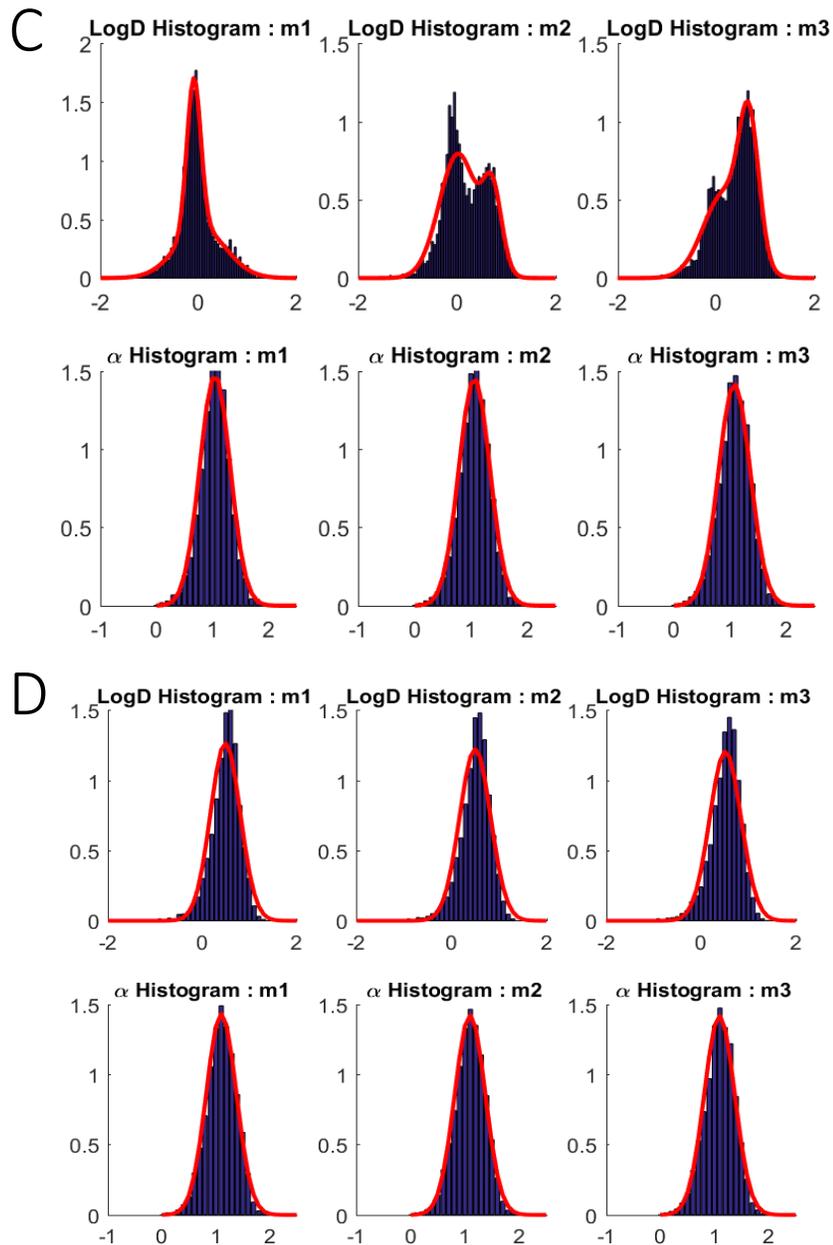
B

% glycerol	ACF		Theory
	Mean D_α	Std D_α	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
0	15.5	1.7	15.1
10	12.1	1.8	12.1
20	9.2	1.5	9.05
50	4.5	0.8	3.24
80	1.1	0.2	0.4

(A) Table with mean α values and corresponding standards deviations calculated by ACF.
 (B) Table with mean D values ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) and corresponding standards deviations calculated by ACF.



(A) Initial histograms and their fittings of $\log D_{60ms}$ and α for the condition A ($D=4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$) at three different proportion m_1 , m_2 , m_3 . (B) Initial histograms and their fittings of $\log D_{60ms}$ and α for the condition B ($D=0.9\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$) at three different proportion m_1 , m_2 , m_3 .



Initial histograms and their fittings of $\log D_{60ms}$ and α for the condition C ($D=4.0 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=0.9\mu\text{m}^2/\text{s}$) at three different proportion m_1, m_2, m_3 . (D) Initial histograms and their fittings of $\log D_{60ms}$ and α for the condition D ($D=4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=3.8\mu\text{m}^2/\text{s}$) at three different proportion m_1, m_2, m_3 .

A Condition A ($D=4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$)

BIC	m1	m2	m3
1 sub-pop	5.10e+03	7.74e+03	7.24e+03
2 sub-pop	3.64e+03	5.73e+03	4.84e+03
3 sub-pop	3.36e+03	5.32e+03	4.83e+03
ratio BIC3/BIC2	0,92	0,93	1,00

B Condition B ($D=0.9\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$)

BIC	m1	m2	m3
1 sub-pop	3.45e+03	5.64e+03	4.58e+03
2 sub-pop	2.91e+03	5.15e+03	3.23e+03
3 sub-pop	2.82e+03	4.82e+03	3.23e+03
ratio BIC3/BIC2	0,97	0,94	1,00

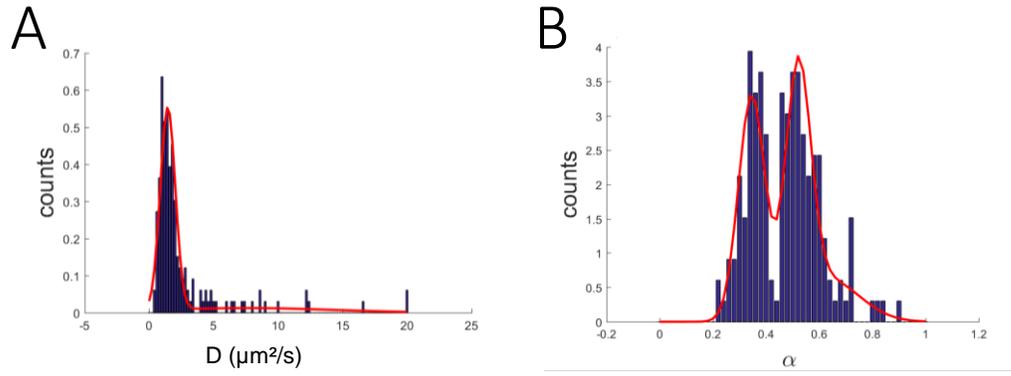
C Condition C ($D=4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=0.9\mu\text{m}^2/\text{s}$)

BIC	m1	m2	m3
1 sub-pop	4.40e+03	5.82e+03	6.10e+03
2 sub-pop	3.56e+03	5.26e+03	5.86e+03
3 sub-pop	3.54e+03	5.17e+03	5.54e+03
ratio BIC3/BIC2	0,99	0,98	0,95

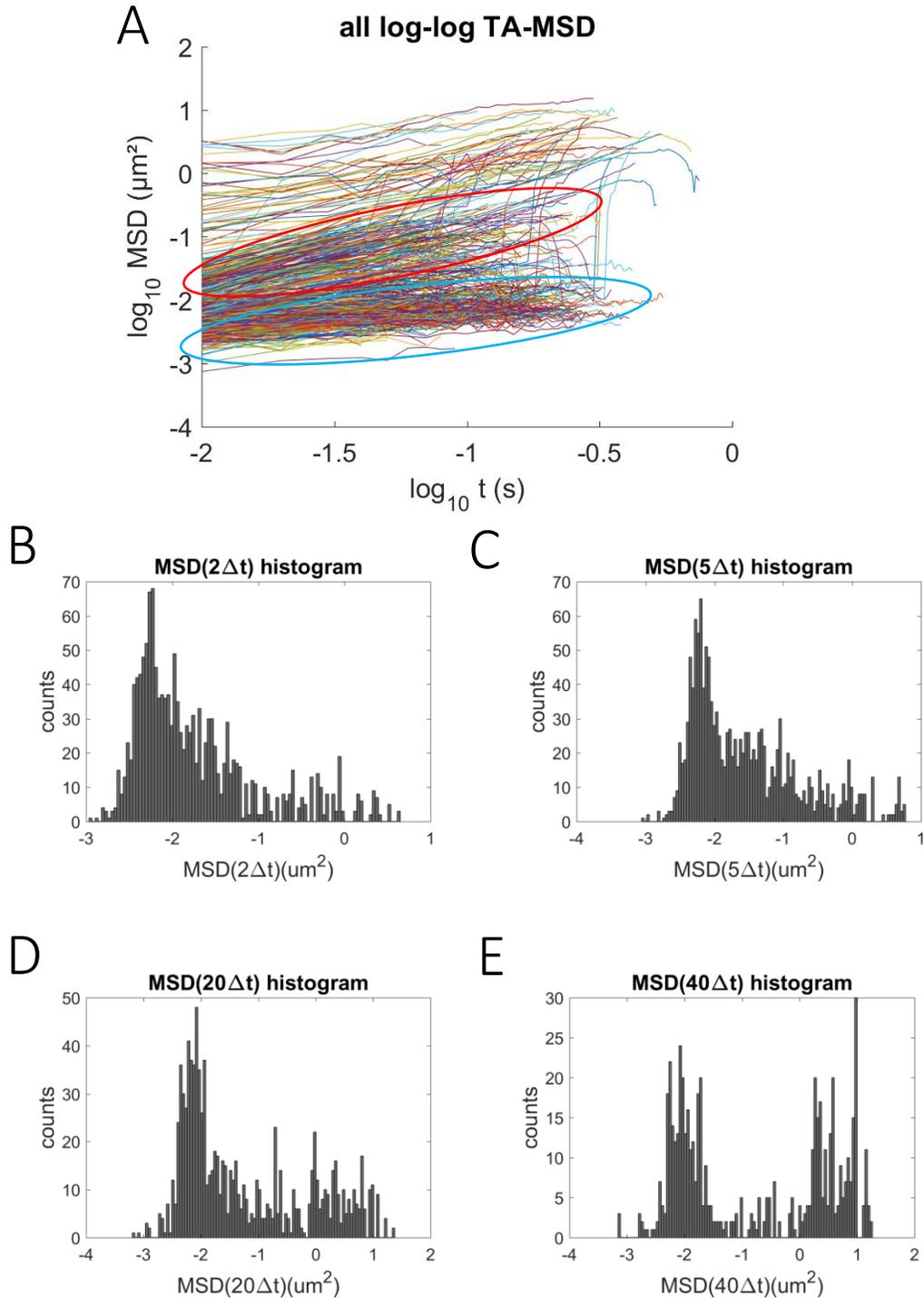
D Condition D ($D=4.0\mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D=3.8\mu\text{m}^2/\text{s}$)

BIC	m1	m2	m3
1 sub-pop	2.82e+03	3.14e+03	3.19e+03
2 sub-pop	2.25e+03	2.73e+03	2.55e+03
3 sub-pop	2.22e+03	2.68e+03	2.49e+03
ratio BIC3/BIC2	0,99	0,98	0,98

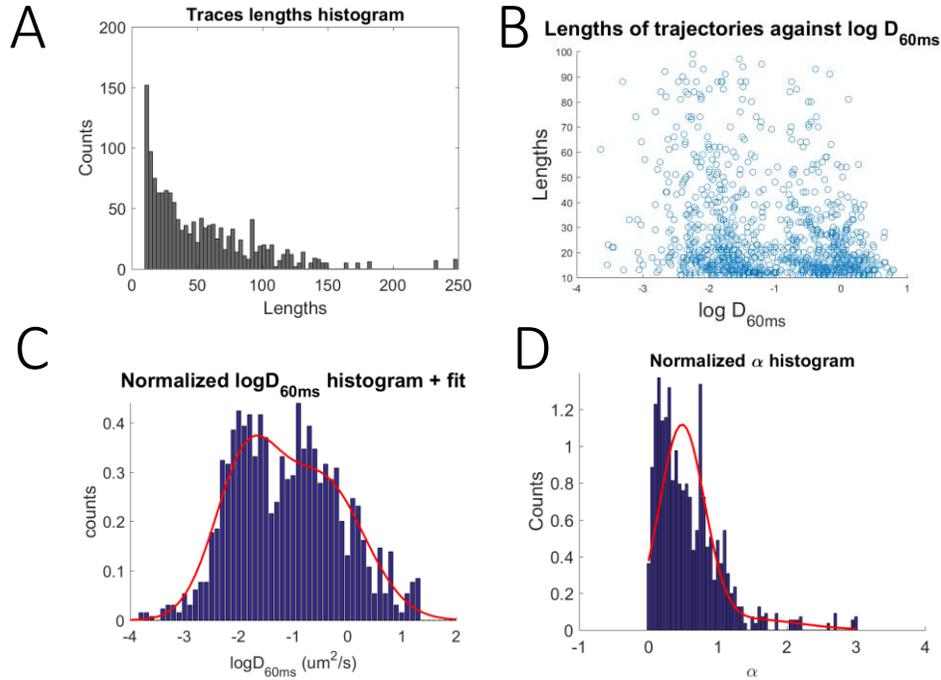
Calculated BIC for 1, 2, 3 parameters Gaussian Mixture Model for our four conditions A, B, C and D.



Normalized histograms and their fittings of D_α (A) and α (A) calculated by FCS for RPB1-Halo-JF 549 in U2OS cells. 150 ACF of 30s were performed and then analyzed by Easy FCS (Furlan et al. 2019). Fittings were performed with MATLAB, with the 'fitgmdist' function to perform Gaussian Mixture Model.



(A) All TA-MSD plotted in log-log representation for RPB1 analysis coming SPT measurements (B) MSD distribution at $2\Delta t$ for RPB1 analysis (C) MSD distribution at $5\Delta t$ for RPB1 analysis (D) MSD distribution at $20\Delta t$ for RPB1 analysis (E) MSD distribution at $40\Delta t$ for RPB1 analysis



(A) Histogram of length trajectories for RPB1 analysis. Average lifetime is around 190 ms. (B) Plot of trajectory lengths against $\log D_{60ms}$. This graph shows no correlation between diffusion coefficient and lengths of trajectories. This verification is important to assert the viability of our fitting : we need to see if we have an under-estimation of a certain population regarding one another. (C) Normalized histogram of $\log D_{60ms}$ and fit (2-populations models) (D) Normalized histogram of α and fit (2-populations models)

4.2 Etude de la dynamique moléculaire de CT1

L'un des défis de ma thèse est d'étudier la mobilité de P-TEFb dans le noyau cellulaire, dans le but de comprendre le mécanisme de régulation de la transcription : (1) étudier le caractère localement sous-diffusif de P-TEFb et (2) comprendre les mécanismes de ce confinement en identifiant les partenaires du complexe impliqués.

Lors d'une précédente étude réalisée au laboratoire [13], la méthode FICS (FRET Image Correlation Spectroscopy) a été développée pour quantifier spatio-temporellement les interactions de P-TEFb avec ses partenaires, à partir de piles d'images de FRET obtenues sur une durée d'1 min. Les interactions entre CT1 et RNA Pol II I mais aussi CT1 et H2A forment des clusters de taille caractéristique, et les mutants de CT1 qui ont perdu leur domaine d'interaction avec RNA Pol II restent sous forme de clusters de même intensité d'interaction (efficacité de FRET moyenne dans l'image) mais sur une surface plus importante en ce qui concerne les interactions CT1-RNA Pol II. Par ailleurs, les auteurs ont aussi montré par FCS (volume caractéristique 0,1 fL, et échantillonnage temporel de l'ordre de la μ s) que la diffusion de CT1 analysée avec un modèle anomal présente un fort niveau de confinement ($\alpha=0,6$), et que celui-ci est conservé pour les mutants ayant perdu leur interaction avec RNA Pol II.

Ces éléments plaident en faveur de la formation de domaines de sous-diffusion associée à une interaction avec la chromatine (H2A) mais pour partie non dépendant de RPB1.

D'un autre côté, le travail de Furlan et al. (2019) également réalisé au sein de l'équipe sur le gros complexe P-TEFb inactif (CT1-CDK9-2HEXIM1-ARN7SK), a permis de montrer que la sous diffusion de HEXIM1 est liée à son intégration dans le complexe RNP7SK et qu'il est possible par FCS d'analyser les différents niveaux d'interaction dans ce complexe. Cette technique est basée sur l'observation de 5 à 20 molécules simultanément dans le volume focal (1fL) sur des durées de 30 sec.

Les techniques de SPT permettent d'observer le comportement individuel de molécules d'intérêts. Izeddin et al. (2014) [69] a montré par cette approche que P-TEFb avait également un comportement sous-diffusif et compact, c'est-à-dire qu'il serait guidé vers ses cibles et qu'il y resterait à proximité. Des simulations ont montré que la mobilité de ce facteur de transcription en terme de recherche de cibles dans le noyau était en faveur d'une évolution dans un environnement fractal à corrélation spatiale de type tapis de Sierpinski.

D'autres travaux en FCS et FICS réalisés au laboratoire et en cours de publication, montrent que c'est la sous diffusion de CT1 qui contraint le reste des partenaires du complexe P-TEFb.

En m'appuyant sur ces précédents travaux j'ai développé une approche reposant sur le suivi de particules uniques afin d'étudier à l'échelle moléculaire la dynamique de CT1 et comprendre les mécanismes régulant sa sous-diffusion et permettant de comprendre comment P-TEFb cible correctement les bons gènes à activer.

Dans un premier temps, j'ai étudié par SPT, l'influence de deux agents pharmacologiques sur la diffusion de CT1wt : d'une part, JQ1 un inhibiteur des BET (Bromodomain and Extra Terminal domain) qui se fixe au bromodomaine et inhibe l'association de BRD4 avec les histones acétylés. Et d'autre part, le flavopiridol qui est un inhibiteur de l'activité kinasique de Cdk9 et qui empêche donc la phosphorylation de la queue C-terminale de l'ARN Pol II. Pour finir, j'ai étudié un mutant de CT1 présentant une délétion au niveau de la zone riche en histidine responsable de l'interaction avec la sous-unité RPB1 de l'ARN Pol II : CT1 Δ (480 – 551).

Les résultats seront présentés en quatre parties :

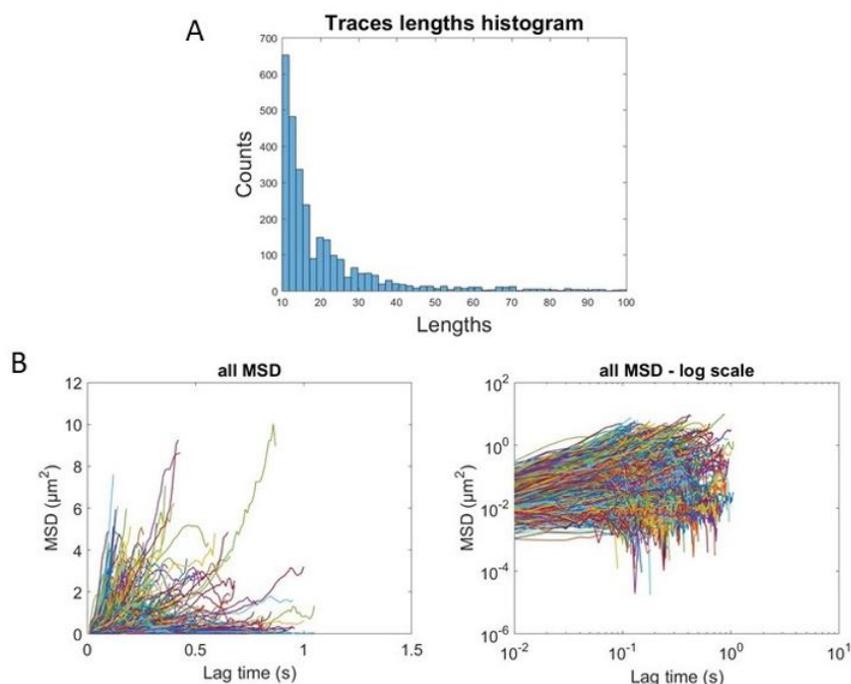
1. l'étude complète de CT1-wt et des outils auxquels nous avons accès et que j'ai sélectionnés pour notre étude. Les résultats concernant CT1 wt serviront de point de comparaison pour déduire les effets des mutations/drogues suivantes.
2. l'étude de la dynamique de CT1-wt en présence de JQ1
3. l'étude de la dynamique de CT1 en présence de flavopiridol.
4. et pour finir, l'étude de l'importance de l'interaction CT1-RPB1 dans la dynamique de CT1, par l'intermédiaire du mutant CT1 Δ (480 – 551).

4.2.1 Description du protocole d'étude : étude de la dynamique de CT1-wt

Les mesures ont été réalisées sur cellules U2OS, transfectées 48h avant le jour des acquisitions par 50ng de plasmides CT1wt-N-Halo. Le marquage a été réalisé grâce aux colorants organiques JF 549 à 0,1nM. Environ 80 cellules ont été choisies pour l'acquisition, suivant le niveau d'expression.

Suite aux acquisitions, nous avons enregistré un ensemble des 50906 trajectoires de plus de 3 points détectées automatiquement par le logiciel (MTT) (figure 4.1).

Nous avons retenu les trajectoires de plus de 10 points soit 2208 trajectoires, afin d'éliminer de nombreuses sources d'erreurs comme décrit précédemment lors de l'analyse sur échantillon de référence (cf article : « **Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell** » *M.Fournier et al.*). La figure 4.1 nous renseigne sur les données de départ analysées. L'allure de l'histogramme du nombre de détections par trace (fig.4.1 A) est une exponentielle décroissante, ce qui signifie pour nous que les trajectoires les plus longues sont largement minoritaires par rapport à nos trajectoires courtes, ce qui peut créer un biais dans notre analyse. En effet, comme expliqué précédemment, les trajectoires les plus longues proviennent souvent des mouvements moléculaires les plus lents, résultant parfois et selon la sensibilité de la technique à une sur-représentation des molécules lentes par rapport aux molécules rapides : ce qui constitue un point critique à vérifier et qui sera présenté dans la suite de l'analyse.



(A) Histogramme représentant la distribution du nombre de détections par trajectoire. En moyenne, nos trajectoires comptent 14 détections. Les molécules sont donc contenues dans notre plan focal pendant en moyenne 140 ms. (B) Représentation de l'ensemble des TA-MSD des 2208 traces de plus de 10 points représentés en échelle base 10 (gauche) et en échelle log-log (droite)

FIGURE 4.1 – Données de départ CT1 wt

Nous avons calculé que la longueur moyenne pour l'ensemble des trajectoires sélectionnées se situe autour de 14 détectations. Izeddin et al. en 2014 [69] obtenait en moyenne 4 détectations par trajectoire avec un marquage endogène par protéines fluorescentes photo-convertibles (Dendra2)-CT1, ce qui montre l'avantage des marquages Halo et des ligands organiques Janelia Farm très brillants. La figure 1B montre l'ensemble des TA-MSD individuels de nos 2208 trajectoires en TA-MSD (fig 4.1 B).

La représentation des TA-MSD en échelle log-log nous permet de mieux appréhender la variabilité des pentes des MSD, qui dans cette échelle correspondent directement aux coefficients d'anomalité. Nous observons que les allures et les pentes des courbes sont toutes très différentes, et que nous pouvons retrouver des TA-MSD aux pentes très faibles voir nulles, ce qui suggère un comportement très confiné, et d'autres courbes de MSD très inclinées, très pentues suggérant un comportement sur-diffusif.

La dispersion des valeurs à l'ordonnée à l'origine, entre 10^{-3} et 10^{-5} traduit de la variabilité des valeurs des coefficients de diffusion D , moyennant l'incertitude de mesure (précision de pointé de 50nm, calculée sur cellules U2OS fixées, marquage Halo JF 549 sur RPB1-Halo).

Nous avons ensuite appliqué la technique d'analyse H-MSD pour l'étude de nos données, suivant le protocole suivant :

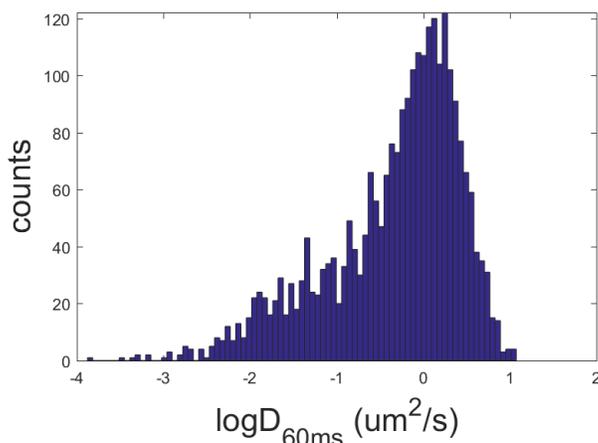
1. Estimation du coefficient de diffusion instantané sur une échelle de temps courte (D_{60ms}) en exploitant le TA-MSD en approximation brownienne (pente à l'origine). Représentation des paramètres sous forme d'histogramme et ajustement par un mélange de fonctions gaussiennes.
2. Estimation du coefficient d'anomalité sur une échelle de temps longue en exploitant la TA-MSD en représentation log-log (pente de la droite). Représentation des paramètres sous forme d'histogramme et ajustement par un mélange de fonctions gaussiennes.
3. Représentation nuage de points $D_{60ms}-\alpha$ et ajustements par un mélange de fonctions gaussiennes 2D.

4.2.1.1 Mesures de D_{60ms} et α

Dans un premier temps, nous allons travailler sur chaque paramètre de diffusion indépendamment. Nous allons donc analyser l'histogramme des coefficients de diffu-

sion instantanés D_{60ms} d'un côté, puis la distribution des coefficients d'anomalie α de l'autre.

La figure 4.2 représente la distribution sous forme d'histogramme des D_{60ms} en échelle logarithmique. A ce stade, j'ai cherché comment ajuster mes données et par quels modèles. L'allure de l'histogramme laisse penser qu'un mélange de fonctions gaussiennes serait le plus adapté. D'autres lois de distribution ont été testées, mais n'étaient pas adaptées.



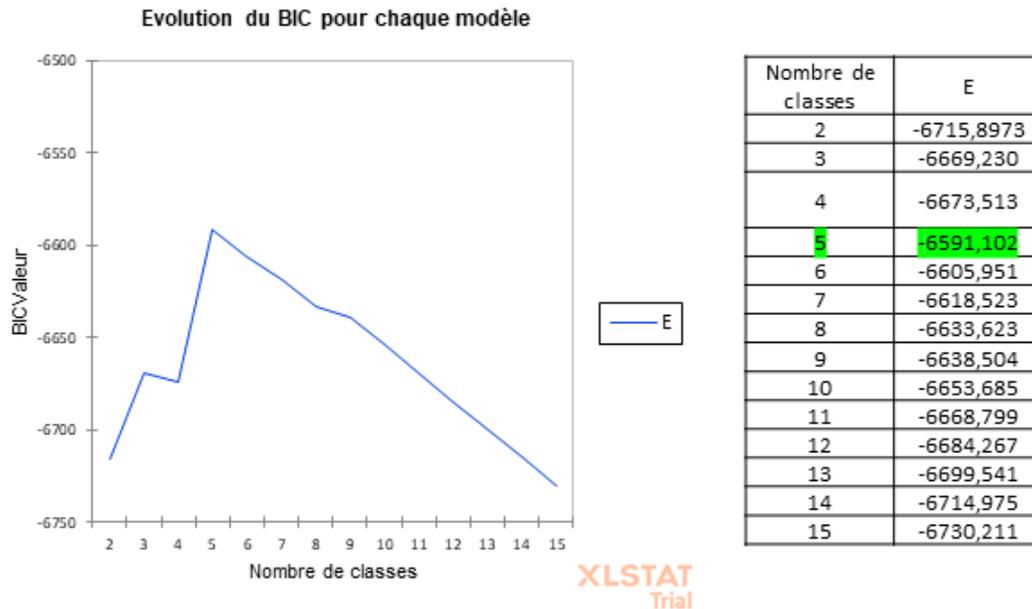
Représentation logarithmique. D_{60ms} correspondant à la valeur du coefficient de diffusion instantané, c'est-à-dire, la valeur de la pente à l'origine de la courbe de TA-MSD jusque 60ms.

FIGURE 4.2 – CT1 wt, histogramme des D_{60ms}

L'un des défis lorsqu'il s'agit d'ajuster une distribution complexe et inconnue avec un mélange de fonctions gaussiennes est de déterminer le nombre de classes. Pour cela, nous avons voulu réaliser une discrimination par le BIC (Bayesian Information Criterion) afin de sélectionner le modèle. Dans ce cas précis, le modèle à n classes qui minimise le BIC sera retenu. Il est évident que plus nous ajoutons de paramètres dans le modèle, plus les données risquent d'être bien ajustées. C'est pour cela, que le BIC m'a semblé être l'outil de sélection de modèle le plus pertinent car il permet de pénaliser par rapport au nombre de classes, et ainsi, discriminer de manière la plus juste possible.

Lorsque j'ai cherché à quantifier le nombre de fonction gaussienne à compter dans mon modèle, j'ai réalisé une étude de sélection de modèles sur le BIC (fig. 4.3). L'application XLSTAT de Excel permet de calculer l'évolution du BIC sur un nombre

de classes défini par l'utilisateur, et ainsi renseigner le nombre de paramètres le plus juste à utiliser. Sur $n=15$ classes testées, l'algorithme a trouvé un minimum local du BIC pour 5 classes. Ainsi, un modèle à 5 fonctions gaussiennes, donc à 5 populations serait le plus pertinent pour ajuster ma distribution des $\log D_{60ms}$ pour la condition CT1 wt. Mais que représentent ces 5 populations ? Est-il possible de leur donner un sens biologique ?



Les tests ont été réalisés avec l'application XLSTAT.

FIGURE 4.3 – Sélection de modèle par le BIC pour la distribution des $\log D_{60ms}$ de CT1 wt

L'état de l'art [60], expose des limitations pour $n=3$ classes, donc ces limitations seraient d'autant plus présentes pour $n=5$. Ce nombre de paramètres m'a semblé non pertinent à utiliser, et dans tous les cas pour $n=2, 3, 4$ et 5 nous observons que deux populations restent centrées autour de deux valeurs $D_{60ms}=0,08\mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D_{60ms}=1,20\mu\text{m}^2/\text{s}$. De plus, il est d'usage de considérer un facteur 2 entre les BIC pour les qualifier de différents et privilégier un modèle par rapport à un autre. Nous pouvons nous interroger sur la légitimité de choisir le modèle à 5 gaussiennes qui présente un BIC présentant 1,8% de différence avec celui du modèle à 2 gaussiennes. Ainsi, afin de limiter le nombre de classes, j'ai limité le nombre de classes à 2 populations qui semblent rester constantes pour $n>2$ classes. Bien qu'il est évident que cette distribution complexe et qui est probablement plus complexe qu'un mélange de

gaussiennes, n'est pas parfaitement descriptible par un modèle à 2 classes. Cependant, faute de meilleurs outils pour déterminer la distribution la plus adéquate, nous utiliserons ce modèle à 2 populations, en évoquant le principe de parcimonie.

La figure 4.4 représente alors l'ajustement par un mélange de 2 gaussiennes 1D. Les résultats de l'ajustement nous donnent donc une première sous-population qualifiée de « lente » contenant 38% des trajectoires pour un coefficient moyen $D_{60ms}=0,08\mu\text{m}^2/\text{s}$ (SEM=0,005), et la seconde population plus rapide, contenant 62% de l'ensemble pour un $D_{60ms}=1,23\mu\text{m}^2/\text{s}$ (SEM=0,010).

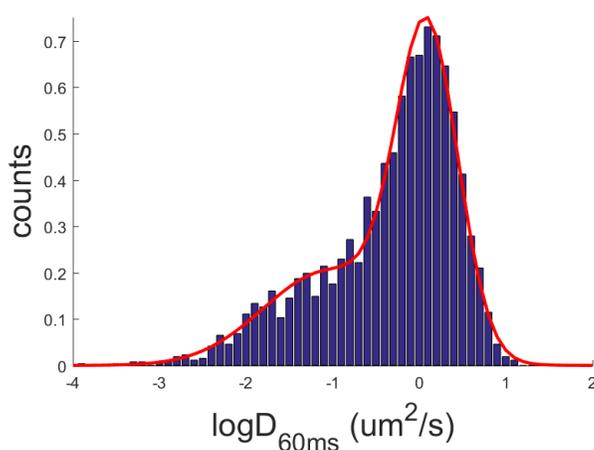
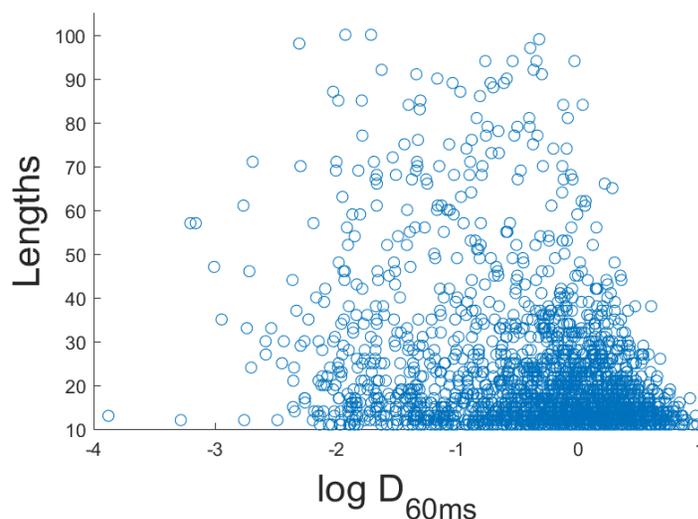


FIGURE 4.4 – Ajustement d'un mélange de 2 fonctions gaussiennes 1D pour décrire la distribution des $\log D_{60ms}$

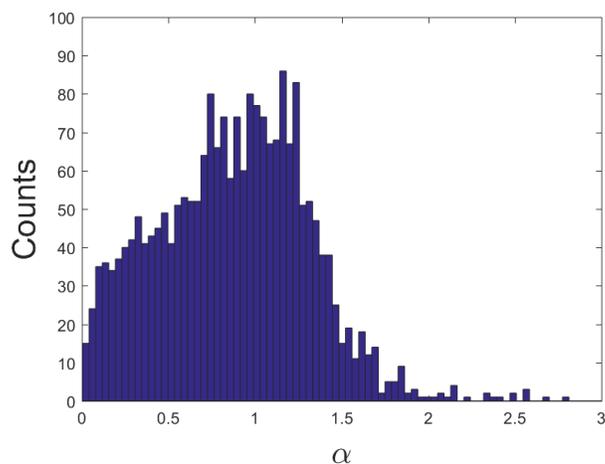
Nous avons vérifié si la durée des trajectoires variait en fonction du coefficient de diffusion. J'ai tracé D_{60ms} versus la longueur de la trajectoire, afin d'observer une possible corrélation. La figure 4.5 nous montre que les molécules les plus rapides (D_{60ms} au-delà de 1) ont des trajectoires moins longues que les molécules les plus lentes (D_{60ms} jusque $1\mu\text{m}^2/\text{s}$). Cette observation est importante, notamment pour l'ajustement des MSD individuelles. En effet, d'un point de vue statistique, le moyennage des déplacements quadratiques est moins bon pour une trajectoire courte qu'une trajectoire longue. Cela peut avoir des incidences sur l'ajustement des MSD pour calculer D_{60ms} ainsi que α .



Nuage de points représentant le nombre de détection par trajectoire (temps entre deux détections = 10ms) fonction du coefficient de diffusion (échelle log)

FIGURE 4.5 – Longueur des trajectoires selon le coefficient de diffusion

L'histogramme de distribution des coefficients d'anomalie (α) est représenté figure 4.6. L'ajustement de la distribution des α par une (ou plusieurs fonction(s) gaussienne(s)) échoue dans ce cas. En effet, la distribution paraît comme un continuum et n'est pas dans cette représentation simplement décomposable en une somme de distributions gaussiennes. Il n'est donc pas simple de déterminer par la distribution des coefficients d'anomalie, s'il y a potentiellement des sous-populations dans notre échantillon, et d'en déterminer les paramètres de diffusion utilisant cette technique. On remarque cela dit une plus forte occurrence des α autour de la valeur 1. On observe également la présence de coefficient d'anomalie supérieur à 1, ce qui est en partie caractéristique du caractère stochastique des valeurs. Afin d'avoir un ordre d'idée du coefficient d'anomalie à attribuer à CT1 wt, j'ai donc calculé la valeur médiane de α qui vaut 0,888 (SEM=0,009) pour CT1 sauvage de référence.



Représente la distribution des coefficients d'anomalie calculés selon la méthode décrite précédemment (chapitre 3.2.2)

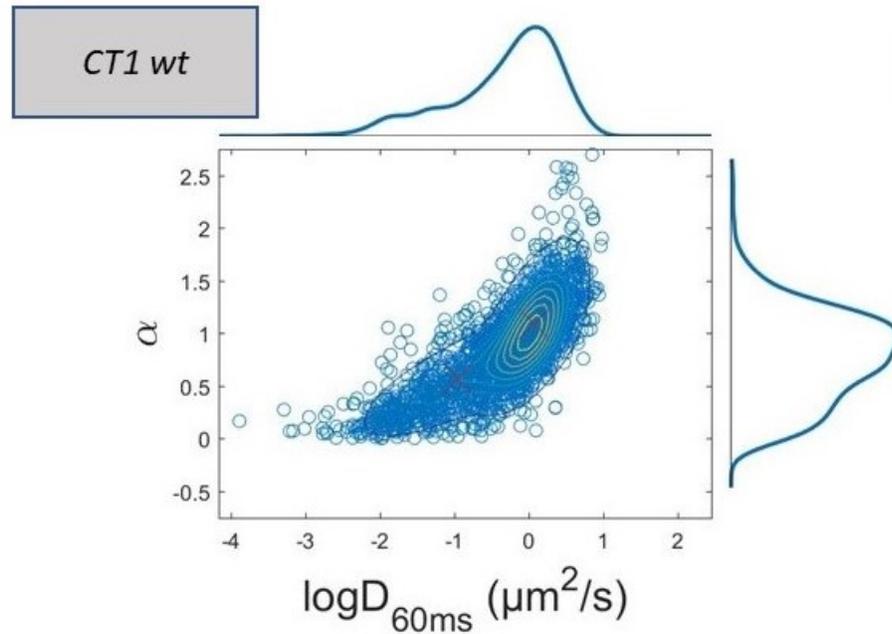
FIGURE 4.6 – CT1 wt, histogramme des coefficients d'anomalie α

4.2.1.2 Analyse couplée D_{60ms} et α

Les analyses en histogrammes présentent des limitations car elles ne nous informent pas sur la corrélation D_{60ms} et α de chaque trajectoire individuelle. Représenter chaque trajectoire par le couple de paramètres (D_{60ms} et α) sous la forme d'un nuage de point avec D_{60ms} en abscisse et α en ordonnée, nous permettrait d'évaluer l'impact de chaque trajectoire dans les distributions. Ajuster un modèle de mélange de fonctions gaussiennes 2D sur cette représentation nous permet d'attribuer aux deux populations détectées sur la représentation histogramme des D_{60ms} une valeur caractéristique du coefficient d'anomalie.

Pour cela, j'utilise la technique d'analyse couplée en nuage de point comme décrite précédemment.

La figure 4.7 représente le nuage de points D_{60ms} versus α pour chacune des 2208 trajectoires. Les projections suivant les axes x et y sont représentées et correspondent aux distributions lissées des histogrammes vus précédemment.



Chaque cercle bleu représente une trace et est représentée par ses valeurs de D_{60ms} en abscisse et α en ordonnée. Sous les axes sont représentés les histogrammes lissés correspondants. En accord avec nos analyses précédentes, un ajustement par 2 fonctions gaussiennes 2D est réalisé. Les croix rouges représentent les centres de chaque gaussienne, et les courbes de couleurs les courbes de même densité.

FIGURE 4.7 – CT1 wt, nuage de points α vs D_{60ms}

Suite à un ajustement à deux fonctions gaussiennes 2D, nous obtenons d'une part une sous-population lente de 39 % avec $D_{slow} = 0,10\mu m^2/s$ (SD=0,20) et $\alpha_{slow} = 0,55$ (SD=0,10). D'autre part, une autre sous-population plus rapide (61% des trajectoires) avec un $D_{fast} = 1,20\mu m^2/s$ (SD=0,36) et $\alpha_{fast} = 1,08$ (SD=0,15).

En comparaison avec l'analyse indépendante de D_{60ms} et α , les coefficients de diffusion et les fractions de populations restent très similaires. Cela suggère que le couplage des données de α avec les $\log D_{60ms}$ correspondant lors de l'analyse 2D ne modifie pas les populations observées, par rapport à l'étude en 1D. Pour ce cas précis, la distribution des α serait neutre et n'aurait peu ou pas d'impact dans la détermination des sous-populations. Ces analyses montrent alors que nous avons au minimum deux populations, dont une libre avec un coefficient de diffusion relativement rapide ($D_{fast} = 1,20\mu m^2/s$), tandis que l'autre est moins rapide ($D_{slow} = 0,10\mu m^2/s$) mais

pas fixée, et présente une anomalie forte ($\alpha = 0,55$).

Maintenant que nous avons caractérisé la dynamique moléculaire à l'échelle des molécules uniques pour la condition de référence CT1 wt, nous allons nous servir de mutations et d'inhibiteurs pour essayer de mieux comprendre l'importance des partenaires de CT1 dans sa dynamique.

Pour chaque condition testée, nous avons utilisé le même protocole d'analyse que celui appliqué pour CT1 wt qui sera notre référence. Afin de comparer nos distributions à celles de notre référence CT1 wt, j'ai appliqué systématiquement un test de Komolgorov-Smirnoff (K-S) bilatéral afin de déterminer si nos distributions suivent les mêmes lois. Chaque résultat des tests est donné avec un taux de significativité de 95%. Un bilan comparatif entre nos 4 conditions d'analyse sera décrit section 4.2.5.

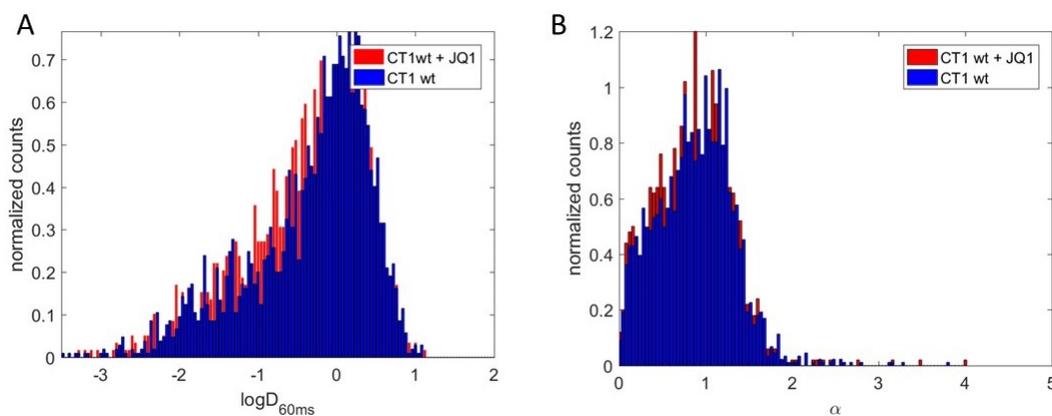
4.2.2 Analyse de la dynamique moléculaire de CT1 en présence de JQ1, inhibiteur de Brd4

Pour rappel, *Brd4* est une protéine à bromodomaine qui régule positivement le complexe *P-TEFb* et stimule l'activité transcriptionnelle de l'ARN Pol II [70]. Étudier la dynamique moléculaire de CT1 en inhibant l'activité de *Brd4* nous permettrait de comprendre le mécanisme spatio-temporel de ce phénomène de régulation.

Après détection et tracking des trajectoires des molécules de CT1 pour cette condition, j'ai récolté 1554 trajectoires de plus de 10 points.

Le test K-S a montré que les distributions des $\log D_{60ms}$ et de α pour la condition CT1 + JQ1 étaient significativement différentes de celles de CT1 wt.

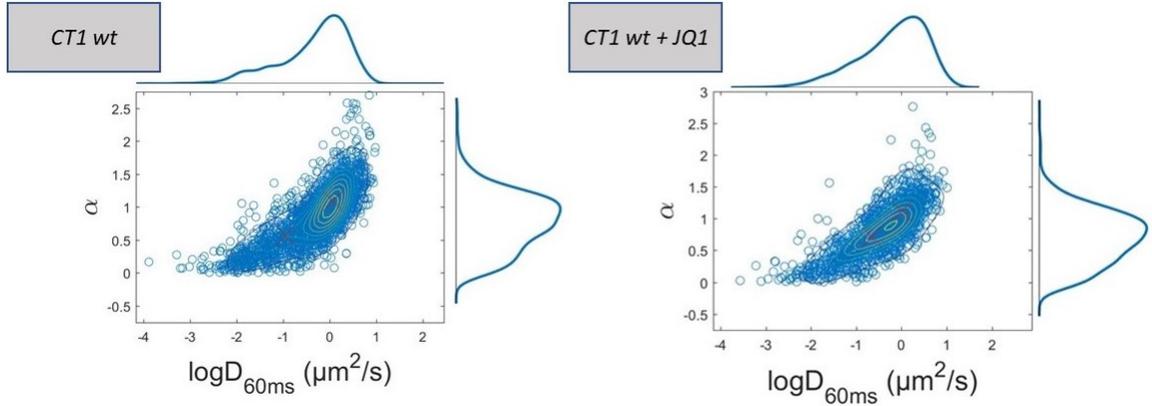
Nous remarquons figure 4.8A que la distribution de $\log D_{60ms}$ présente également une gaussienne centrée autour de 1 et d'amplitude semblable à celle de CT1. La différence semble se situer sur les populations les plus lentes. La population lente de la condition CT1 wt + JQ1 semble d'autant plus importante en termes de proportion, elle semble également centrée sur des valeurs de $\log D_{60ms}$ plus rapide. Concernant l'histogramme de α , nous observons une légère différence autour de $\alpha=0,5$, là où la condition CT1 wt + JQ1 montre une proportion légèrement plus importante.



(A) Distributions des D_{60ms} (B) Distributions des α

FIGURE 4.8 – Distributions normalisées comparées de CT1 wt (bleu) et CT1 wt + JQ1 (rouge)

La figure 4.9 représente la comparaison des nuages de points D_{60ms} pour la condition de référence CT1 wt et la condition CT1 wt + JQ1. Nous remarquons que les distributions lissées sont différentes entre les deux conditions : les distributions de D_{60ms} et α de CT1 wt + JQ1 présentent des différences moins marquées que la référence.



Chaque cercle bleu représente une trace définie par $(D_{60ms}; \alpha)$. Sous les axes sont représentés les histogrammes lissés correspondants. Les croix rouges représentent les centres de chaque gaussienne, et les courbes de couleurs les courbes de même densité.

FIGURE 4.9 – Comparaison des nuages de points α vs D_{60ms} CT1 wt (à gauche) CT1wt + JQ1 (à droite)

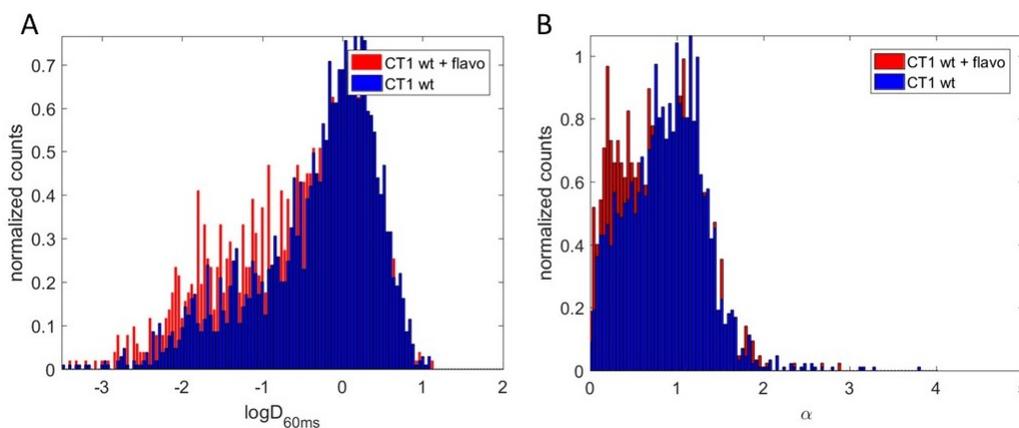
L’ajustement du nuage de points pour la condition CT1 wt + JQ1 par un modèle mélange de fonctions gaussiennes nous renvoie deux populations. La population rapide représente 55% des trajectoires, avec un $D_{fast} = 1.00\mu m^2/s$ (SD=0,35) et un $\alpha_{fast} = 1.02$ (SD=0,13). Mis à part un pourcentage de trajectoires rapides moindres par rapport à notre référence, les paramètres diffusifs sont statistiquement non-différents. Concernant la population lente, comme la figure 4.8 le suggérait, la fraction des trajectoires lentes est plus importante 65% (vs 39% pour CT1 wt). Le coefficient de diffusion moyen D_{slow} vaut $0,20\mu m^2/s$ (SD=0,40) pour un coefficient d’anomalie $\alpha_{slow} = 0,7$ (SD=0,13). Ce qui suggère que la population lente de CT1 wt, lorsque Brd4 est inhibé, devient plus rapide et plus libre.

4.2.3 Analyse de la dynamique moléculaire de CT1 sous Flavopiridol, inhibiteur de CDK9 et de sa fonction kinase

Pour rappel, *P-TEFb* est un dimère composé de *CT1* (*Cyclin T1*) et de *Cdk9* (*Cyclin Dependant Kinase 9*). *P-TEFb* a pour objectif principal de phosphoryler l'ARN *Pol II*, ainsi que *NELF* et *DSIF* pour lever la pause transcriptionnelle et relancer le processus d'élongation. Etudier la dynamique de *CT1* en inhibant *Cdk9* par la présence de la molécule pharmacologique Flavopiridol [22] pourrait permettre d'identifier les comportements diffusifs liés à la phosphorylation.

L'analyse de la condition CT1 wt + flavopiridol comporte au total 1060 trajectoires de plus de 10 points.

Les histogrammes des D_{60ms} et des α semblent très différents de la référence comme le montre la figure 4.10.

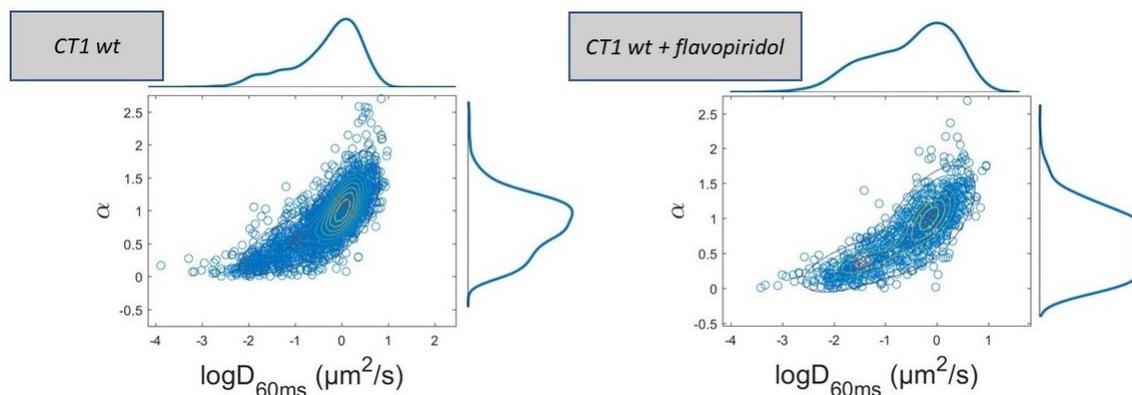


(A) Distributions des D_{60ms} (B) Distributions des α

FIGURE 4.10 – Distributions normalisées comparées de CT1 wt (bleu) et CT1 wt + flavopiridol (rouge)

L'observation a été vérifiée par le test K-S, qui nous retourne que les lois de distributions de D_{60ms} et α sont statistiquement différentes. En ce qui concerne les paramètres diffusifs de notre condition CT1 + flavopiridol, nous observons une plus grande présence de trajectoires les plus lentes (entre $D_{60ms}=0,001$ et $0,05\mu m^2/s$) (fig. 4.10 A), et plus anomales (α entre 0 et 0,5) (fig. 4.10 B).

L'analyse couplée des paramètres D_{60ms} - α (fig 4.11) et l'ajustement pour un modèle de 2 fonctions gaussiennes 2D pour notre condition CT1 wt + flavopiridol confirment ces observations.



Chaque cercle bleu représente une trace définie par $(D_{60ms}; \alpha)$. Sous les axes sont représentés les histogrammes lissés correspondants. Les croix rouges représentent les centres de chaque gaussienne, et les courbes de couleurs les courbes de même densité.

FIGURE 4.11 – Comparaison des nuages de points α vs D_{60ms} CT1 wt (à gauche) CT1wt + flavopiridol (à droite)

La population rapide présente une fraction sensiblement égale à notre référence (38%), les paramètres diffusifs de notre population rapide valent $D_{fast} = 0,73\mu m^2/s$ (SD=0,35) et $\alpha_{fast} = 1,02$ (SD=0,13). Le coefficient de diffusion de la population rapide est inférieur à la référence, mais reste libre, ce qui suggère qu'en présence de flavopiridol, CT1 diffuse moins rapidement. La population lente, quant à elle, présente une grande différence par rapport à la référence, que ce soit sur le coefficient de diffusion $D_{slow} = 0,03\mu m^2/s$ (SD=0,03) (vs $0,1\mu m^2/s$ référence) ou sur le coefficient d'anomalie $\alpha_{slow} = 0,36$ (SD=0,05) (vs 0,55 référence). Globalement, nous pouvons conclure que sous présence de flavopiridol, la diffusion globale des molécules est fortement ralentie, et la population anormale se confine davantage.

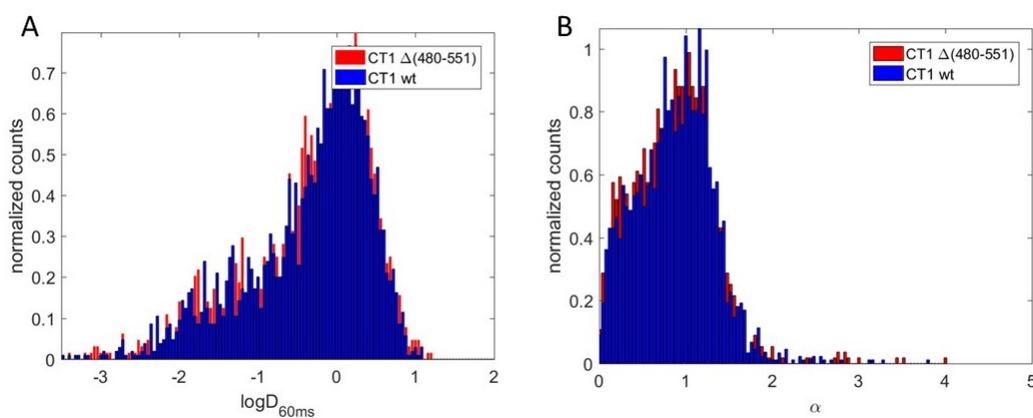
4.2.4 Analyse de la dynamique moléculaire du mutant CT1 Δ (480 – 551)

Pour rappel, CT1 est composé de différents domaines (voir fig. 4.12). Le domaine HR (AA : 506-530) est « riche en histidine » et est responsable de l'interaction avec RNA Pol II. Afin d'étudier l'impact de cette interaction sur la diffusion du complexe P-TEFb, nous avons décidé d'étudier la dynamique moléculaire de mutant CT1 Δ (480 – 551).



FIGURE 4.12 – Représentation de la mutation étudiée

Pour cette analyse, j'ai récolté 1672 trajectoires de plus de 10 points.

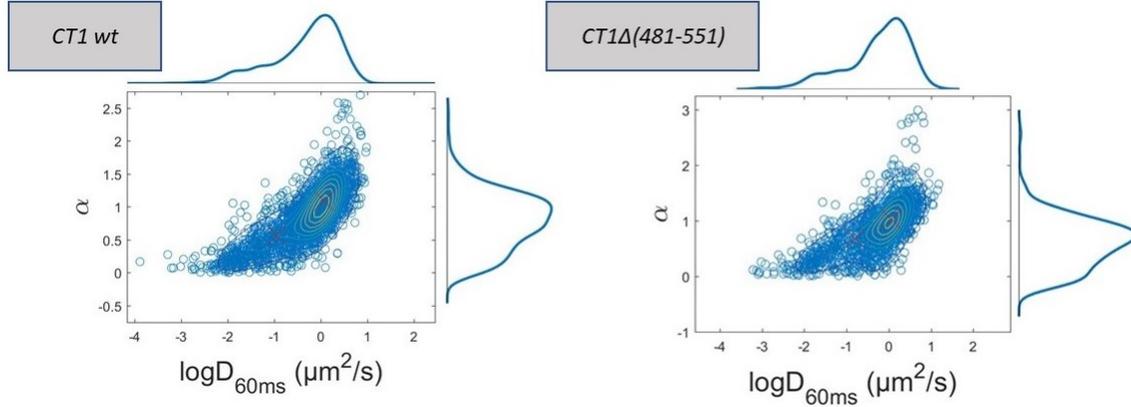


(A) Distributions des D_{60ms} (B) Distributions des α

FIGURE 4.13 – Distributions normalisées comparées de CT1 wt (bleu) et CT1 wt + JQ1 (rouge)

Nous observons sur les distributions de D_{60ms} et de α que les distributions de CT1 wt et CT1 Δ (480 – 551) sont très similaires (fig. 4.13). Le test K-S nous retourne que les distributions de D_{60ms} et α pour CT1 Δ (480 – 551) suivent la même loi que CT1 wt : il n'y a donc pas de différence statistique entre la version sauvage et son mutant.

Néanmoins lorsque nous observons les contributions des molécules individuelles dans le graphique D_{60ms} vs α , nous observons des différences (fig. 4.14).



Chaque cercle bleu représente une trace définie par $(D_{60ms}; \alpha)$. Sous les axes sont représentés les histogrammes lissés correspondants. Les croix rouges représentent les centres de chaque gaussienne, et les courbes de couleurs les courbes de même densité.

FIGURE 4.14 – Comparaison des nuages de points α vs D_{60ms} CT1 wt (à gauche) CT1 Δ (480 – 551) (à droite)

L’ajustement des données nous retourne que la population lente de CT1 Δ (480 – 551) a un comportement moyen légèrement plus rapide $D_{slow} = 0,16\mu m^2/s$ (SD=0,43) et plus libre $\alpha_{slow} = 0,67$ (SD=0,14), bien que cette différence ne soit pas significative.

Les paramètres D_{60ms} et α étant issus d’ajustements des MSD individuelles, il est intéressant de vérifier si nous avons ou non une différence significative au plus proche des données brutes.

Nous pouvons observer sur cette représentation des TA-MSD individuelles des trajectoires (fig. 4.15), que l’allure des deux versions de CT1 semblent différentes notamment pour des échelles de temps longues. A partir de $10^{-0,5} = 0,3s$, deux comportements distincts semblent se dessiner. Une étude des distributions des $MSD(n\Delta t)$ sur des échelles de temps courtes ($n=2$ et 5) a montré des différences significatives par test K-S entre CT1wt et son mutant. Nous pouvons alors nous interroger sur le protocole d’ajustement des données que j’ai utilisé. En effet, les paramètres D_{60ms} et α sont globalement ajustés sur des échelles de temps courtes. Néanmoins, pour le calcul de D_{60ms} , nous faisons l’approximation que l’allure des courbes des TA-MSD

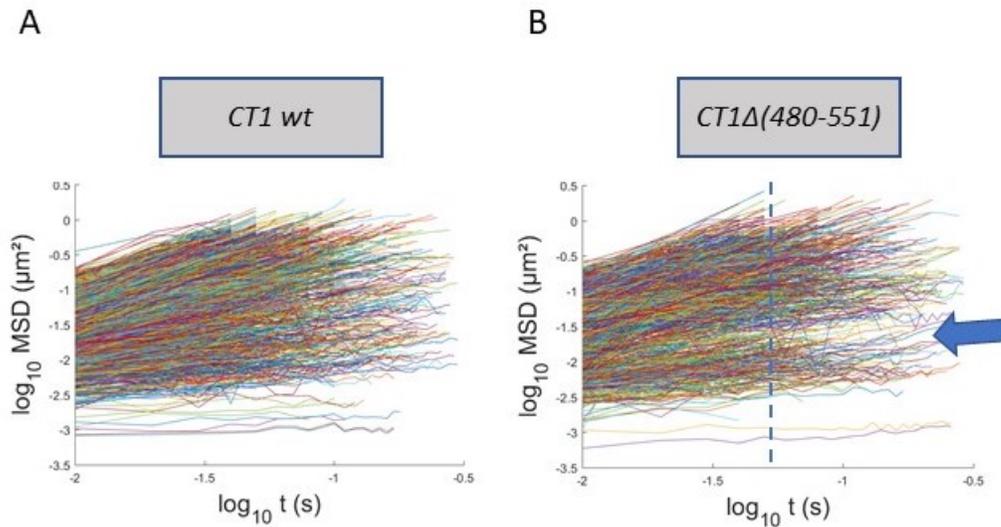
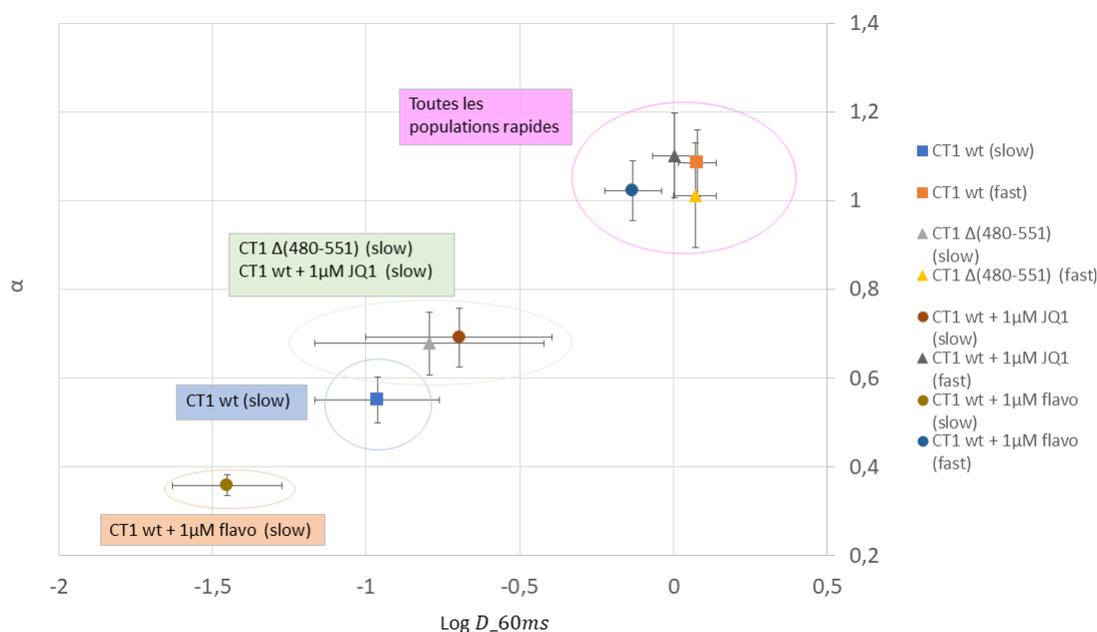


FIGURE 4.15 – Ensemble des TA-MSD individuelles pour les conditions CT1 wt et CT1 Δ (480 – 551) en représentation logarithmique

individuelles est linéaire sur les 60 premières millisecondes, ainsi nous considérons que le mouvement est brownien sur cette échelle de temps . Cette approximation est peut-être trop forte et viendrait possiblement « lisser » les comportements diffusifs à ces échelles de temps. A tel point que nous voyons des différences significatives sur les distributions des MSD, et que celles-ci disparaissent après ajustement des données. Il est possible que les différences entre CT1wt et son mutant soient faibles, et que nous devrions trouver un autre protocole d'ajustement des données, notamment en travaillant sur des distributions des MSD($n\Delta t$) directement. Nous continuons à travailler sur ce point.

4.2.5 Récapitulatif des analyses

Afin d'avoir un meilleur aperçu des paramètres $(D_{fast}, D_{slow}, \alpha_{fast}, \alpha_{slow})$ comme figure bilan, j'ai choisi de tracer le graphique α vs $\log D_{60ms}$ pour chaque population lente et rapide de chaque condition. Ce graphique me permet d'associer la valeur de D (écart-type grand) avec sa valeur de α associé (écart-type plus faible) pour chaque population et pour ainsi mieux différencier les couples de paramètres (voir fig 4.16). Nous observons sur cette figure que les populations rapides présentent globalement toutes les mêmes paramètres diffusifs D_{fast} et α_{fast} . Mis à part la condition CT1 en présence de Flavopiridol qui présente un coefficient de diffusion plus lent. Les différences observées se trouvent sur les populations lentes et anomales, ce qui est d'autant plus intéressant car l'anomalie est caractéristique des interactions spécifiques et non spécifiques.



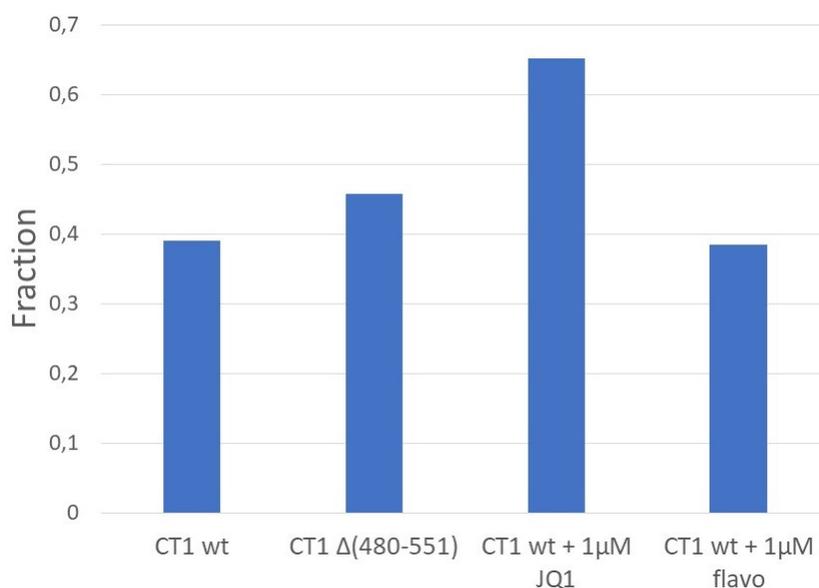
Sur ce graphique sont représentées les valeurs moyennes $(D_{fast}; \alpha_{fast})$ et $(D_{slow}; \alpha_{slow})$ pour chaque condition ainsi que les écarts-types correspondants.

FIGURE 4.16 – Représentation $\alpha = f(\log D_{60ms})$ pour chaque valeur moyenne des couples $(D_{fast}; \alpha_{fast})$ et $(D_{slow}; \alpha_{slow})$

Nous observons que les populations lentes des conditions CT1 $\Delta(480 - 551)$ et CT1+JQ1 sont sensiblement identiques, à savoir légèrement plus rapide en moyenne que CT1 wt, et plus libre. Néanmoins, il ne faut pas oublier que nous avons la fraction

de population lente pour la condition JQ1 qui augmente de manière significative (65% vs 39%). Concernant la condition flavopiridol, une diminution des coefficients de diffusion d'anomalité et de diffusion est à observer sur la population lente.

Concernant l'évolution des deux populations caractéristiques de CT1 wt pour nos trois conditions testées, nous observons globalement une différence nette qui décrit l'augmentation de la fraction lente pour CT1 en présence de JQ1 (voir fig. 4.17)



Ce graphique représente les fractions des populations lentes récupérées pour chaque condition testée. La fonction MATLAB 'fitgmdist' utilisée pour l'ajustement des histogrammes avec un mélange de gaussiennes 2D ne nous permet pas d'avoir la variance (écarts-types) des valeurs de fractions.

FIGURE 4.17 – Histogramme des fractions F_{slow} selon les différentes conditions testées

Voici un tableau récapitulatif des différentes études menées sur la dynamique de CT1 :

Expériences	Interactions/réactions testées	Fraction lente	D slow ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	α slow
CT1 wt	Référence	39%	0,10 (SD=0,2)	0,55 (SD=0,1)
CT1 Δ (480-551)	Perte d'interaction avec RPB1	45%	0,16 (SD=0,43)	0,67 (SD=0,14)
CT1 wt + JQ1	Perte de l'interaction avec Brd4	65%*	0,20* (SD=0,4)	0,7* (SD=0,13)
CT1 wt + flavo	Perte phosphorylations multiples (CTD de l'ARN Pol II, DSIF, NELF)	38%*	0,03* (SD=0,03)	0,36* (SD=0,05)

* Distributions des log D et des α significativement différents (taux de significativité 95%) par rapport à CT1 wt (test bilatéral de Kolmogorov-Smirnov sur deux échantillons)

FIGURE 4.18 – Tableau de synthèse des études menées

Pour plus de détails sur les valeurs calculées, voici le tableau récapitulatif des paramètres récoltés lors de l'analyse :

Experiences	Nombre de traces	F slow	D slow ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	SD	α slow	SD	F fast	D fast ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	SD	α fast	SD
CT1 wt	2208	0,39	0,10	0,20	0,55	0,10	0,61	1,20	0,36	1,08	0,15
CT1 Δ (480-551)	1672	0,45	0,16	0,43	0,67	0,14	0,55	1,17	0,40	1,02	0,23
CT1 wt + 1 μM JQ1	1554	0,65	0,20	0,40	0,7	0,13	0,35	1,00	0,36	1,10	0,19
CT1 wt + 1 μM flavo	1060	0,38	0,03	0,03	0,36	0,05	0,62	0,73	0,35	1,02	0,13

FIGURE 4.19 – Tableau récapitulatif des valeurs calculées

4.3 Comportements des trajectoires individuelles

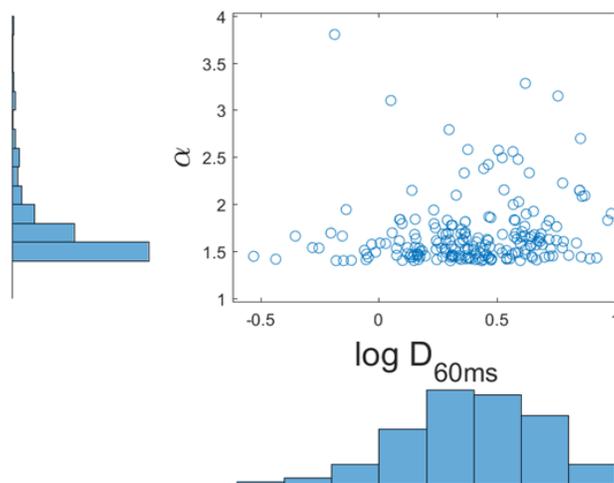
L'avantage de la technique de SPT est que nous avons un aperçu des multiples comportements de chacune des traces. Cela peut nous donner davantage d'informations sur la dynamique fine de CT1.

Suite à l'analyse de CT1 wt, nous avons cherché à comprendre davantage les différents comportements de nos molécules, nous avons mis en avant au moins deux sous-populations caractéristiques dans l'étude précédente, mais il en existe probablement bien d'autres. A ce jour, il n'existe pas de solution automatique de classification de ces trajectoires. Afin d'avoir une idée des différentes « classes » possibles, j'ai essayé de les regrouper à la main selon leur caractéristiques apparentes. J'ai analysé 500 trajectoires (250 de CT1 wt, et 250 de CT1 Δ (480 – 551)). J'ai observé que les comportements de CT1 wt sont très divers, et même si globalement sur un grand nombre de molécules (environ 2000 dans l'étude précédente) on peut observer une corrélation entre D et α , sur un petit échantillon de 250 trajectoires, nous observons globalement un continuum de paramètres pas forcément corrélés. A ce stade de l'étude, il est donc évident que des outils de classifications des trajectoires sont nécessaires afin de donner davantage d'informations sur l'analyse individuelle de trajectoires.

Néanmoins, et afin de donner des pistes de réflexion sur les perspectives à envisager pour la suite de cette étude, je souhaitais mettre en valeur deux comportements présents dans les traces que j'ai analysées. J'ai mis en évidence par ma précédente étude la présence de deux populations : une qualifiée de « rapide » avec un mouvement libre, et l'autre qualifiée de « lente » avec un mouvement contraint ($\alpha = 0,55$). Parmi ces deux populations se cachent deux autres comportements très distincts si ce n'est aux antipodes : les molécules à l'allure confinée qui sont présentes mais non majoritaires, et d'autres molécules avec un mouvement très dirigé. La suite de ce paragraphe ne se veut pas être une étude exhaustive, car n'ayant pas les outils informatiques adéquats pour poursuivre l'étude en ce sens, mais l'idée est de mettre en évidence des comportements régulièrement observés lors de l'étude des trajectoires, en tant que pré-étude pour de travaux futurs.

Dans la littérature [41], les trajectoires présentant un $\alpha > 1,4$ sont systématiquement mises de côté, car considérées comme artefactuelles. J'ai décidé d'analyser ces trajectoires afin d'essayer de comprendre si cette exclusion est vraiment justifiée.

Ces trajectoires représentent 9% des données, ce qui n'est pas négligeable. Lorsque l'on s'intéresse de plus près à ces trajectoires (fig. 4.20), nous remarquons qu'il s'agit principalement des trajectoires rapides (entre 1 et $10\mu\text{m}^2/\text{s}$).



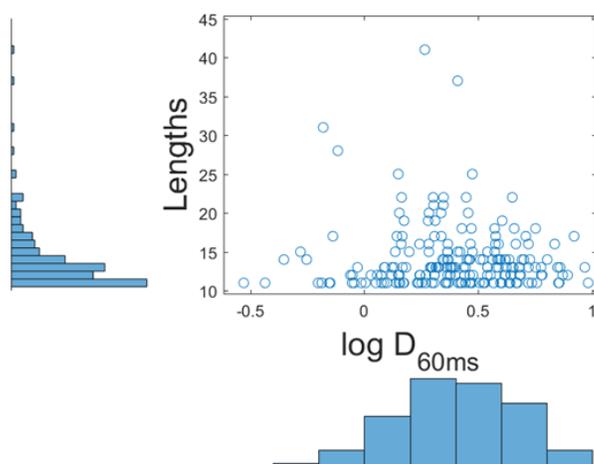
Chaque cercle bleu décrit une trajectoire sur-diffusive et est définie par un couple de paramètres (D_{60ms}, α) .

FIGURE 4.20 – CT1wt, étude des paramètres des trajectoires sur-diffusives

Afin de déterminer si les paramètres calculés de ces trajectoires résultent d'un mauvais ajustement, il faut vérifier en premier lieu si le nombre de points par trajectoire est acceptable.

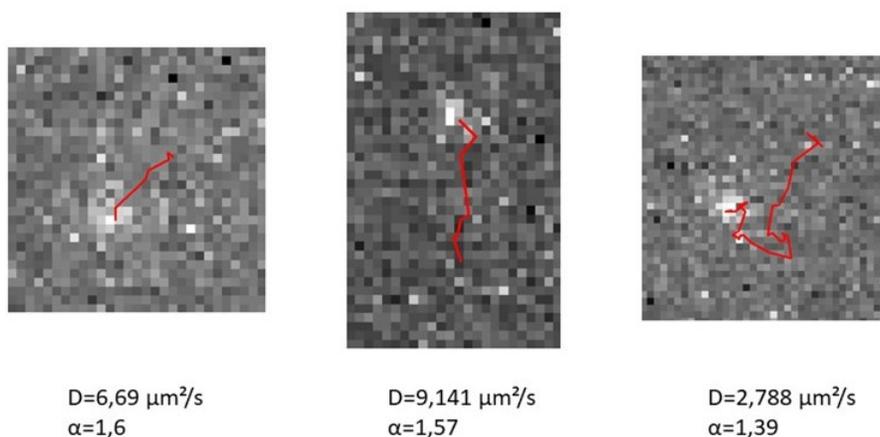
Nous observons sur la figure 4.21 que les longueurs des trajectoires sur-diffusives se situent entre 10 et 20 détections, ce qui signifie des trajectoires présentes dans le champ pendant environ 100 à 200 ms, ce qui est tout à fait dans les valeurs moyennes de CT1. A ce stade, il n'y a pas de raison que les paramètres issus des ajustements soient erronés à cause de statistiques trop faibles concernant le nombre de détections.

J'ai ensuite essayé de visualiser ces trajectoires sur les données brutes que sont les stack images. J'ai constaté que des trajectoires à l'allure sur-diffusive ou dirigée existent bien parmi mon ensemble de trajectoires (voir fig 4.22).



Chaque cercle bleu décrit une trajectoire avec en abscisse le coefficient de diffusion D_{60ms} , et en ordonnée la longueur de trajectoire

FIGURE 4.21 – CT1wt, étude de la longueur des trajectoires sur-diffusives



Ces images ont été réalisées grâce au logiciel EvalSPT écrit par C.P. Richter de l'université d'Osnabrueck qui permet notamment de superposer les trajectoires calculées par le logiciel SLIM_Fast au film de départ. Les paramètres D et α calculés ici résultent d'un ajustement à 2 variables sur la courbe de MSD.

FIGURE 4.22 – Illustration trajectoires sur-diffusives

Comme le suggère la figure 4.22 qui illustre l'allure de quelques-unes de ces trajectoires présentant un $\alpha > 1,4$: elles peuvent être très dirigées comme les deux premières, ou alors dirigées seulement sur une portion de trajectoire comme sur la dernière image. Cette constatation à l'échelle de la molécule unique nous renseigne

un peu plus sur le modèle de diffusion de CT1. En effet, ces trajectoires suggèrent qu'environ 10% de molécules détectées présentent un caractère sur-diffusif, du moins sur le temps de la captation, ce qui pourrait être représentatif d'une diffusion facilitée (translation sur un brin d'ADN ou sur une surface, qui « guiderait » CT1).

Une autre hypothèse sur CT1 implique la notion de compacité : d'après Izeddin et al. [69], CT1 aurait la capacité de rester à proximité de ses cibles et de sonder l'espace de manière non-égale. Cependant, il a une probabilité de s'échapper de ces zones qu'il suréchantillonne. Une première manière de le faire serait par un mouvement brownien où il serait comme envoyé sur une autre zone à sonder de manière aléatoire, ou alors, une deuxième hypothèse, serait peut-être que l'échappement de CT1 hors de ces zones serait facilité par la chromatine afin de réattribuer les molécules à des endroits stratégiques.

De l'autre côté du spectre, nous observons des particules présentant un fort confinement (voir fig. 4.23)

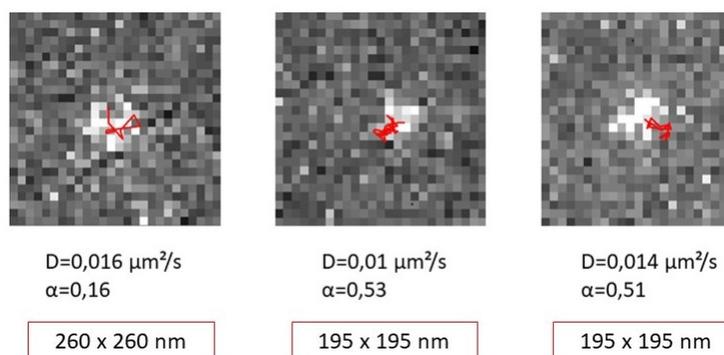
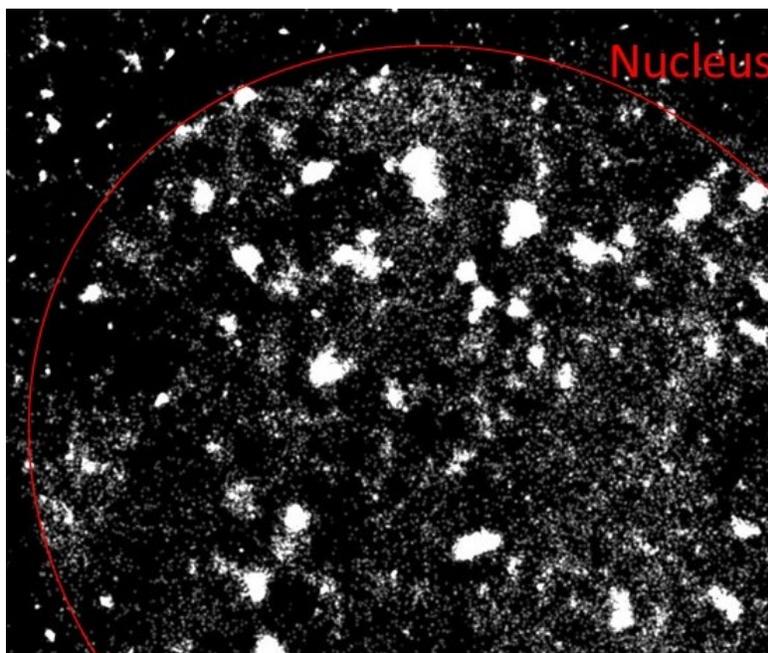


FIGURE 4.23 – Illustrations molécules confinées

Ces molécules présentent des trajectoires très spécifiques : elles sont confinées sur une zone de quelques pixels (de 9 à 16 sur ces trois exemples), ce qui équivaut à une recherche de cible sur environ 200 par 200nm, sachant que l'erreur de pointé est de 50 nm, on peut estimer que ces molécules scrutent une zone de $0,04\mu\text{m}^2$, sans pour autant être parfaitement statiques. Nous avons remarqué lors de notre analyse couplée de $D_{60ms} - \alpha$ que la population lente détectée n'est pas caractéristique d'une population fixée. Connaissant l'erreur de localisation statique, j'estime à moins de 4% le nombre de trajectoires fixées pour CT1wt. CT1 sur son action de sondage des cibles présenterait un caractère diffusif lent et anomal mais se fixerait peu (valeur

moyenne du coefficient de diffusion de la population lente = $0,10\mu\text{m}^2/\text{s}$, $\alpha = 0,55$) suggérant une exclusion du modèle CTRW (où les molécules alternent entre diffusion libre et état fixé).



Le stack images brut présentait 2000 images (10ms entre deux images).

FIGURE 4.24 – Image de super-résolution représentant les détections des particules de CT1 dans un noyau de cellules U2OS

Nous observons figure 4.24 la présence de zones de fréquentation élevée de CT1 sur des zones précises du noyau. Cette observation préliminaire serait en accord avec un modèle de concentrateur spatio-temporel [30, 29] où les molécules de P-TEFb viendraient sonder de manière localisée les *transcription factories* avec une fréquence de passage élevée, sans pour autant se fixer sur la chromatine. Cette hypothèse est soutenue par des travaux que j'ai commencés au laboratoire concernant les clusters temporels de CT1 et leur caractérisation, que nous aimerions poursuivre.

Il est évident que les outils de classifications en constante évolution permettront un jour d'identifier de manière plus précise les différentes classes de molécules ici présentes. A ce jour, les outils de classifications de type Bayésien à chaînes de Markov cachées sont relativement limités car ils nécessitent des trajectoires avec un grand nombre de points (minimum 20 ou 30 points par trajectoire) pour faire converger l'algorithme. Pour nos trajectoires de CT1, et nos facteurs de transcription nucléaires

en général, nous avons des longueurs de trajectoires autour de 13-15 détections. Sélectionner davantage nos trajectoires en ne gardant que les trajectoires longues (> 20 pts) nous prive forcément des données exploitables et peut privilégier une population par rapport à une autre.

4.4 Couplage avec la FCS

J'ai réalisé des mesures de FCS afin de mesurer la mobilité de CT1 wt -N-Halo marquée JF 503 sur des cellules U2OS. J'ai effectué 3 mesures différentes, à 3 jours d'intervalle sur environ 30 cellules. Nous avons récolté environ 150 courbes d'auto-corrélations, que nous avons ajustées par un modèle anormal à deux paramètres D_α et α comme décrit chapitre 3. Nous obtenons sur notre CT1 wt marqué HALO en N-terminal un coefficient de diffusion moyen de $2,67\mu\text{m}^2/\text{s}$ et un coefficient d'anomalie de 0,55.

	SPT		FCS	
Valeurs de D	D_{60ms} slow (39%)	$0,10\mu\text{m}^2/\text{s}$	D_α	$2,67\mu\text{m}^2/\text{s}$
	D_{60ms} fast (61%)	$1,20\mu\text{m}^2/\text{s}$		
Valeurs de α	α slow (39%)	0,55	α	0,55
	α fast (61%)	1,08		

FIGURE 4.25 – Tableau comparatif des paramètres diffusifs de CT1wt en SPT et en FCS

Nous remarquons donc que la valeur de D_α est supérieure à $D_{60ms,fast}$ d'un facteur 2,2. D'après notre étude sur échantillons de référence (billes de 40nm dans des milieux de viscosités différentes), nous avons observé qu'il était possible qu'on ait un facteur 2 entre la valeur de D théorique et la valeur de D calculée par l'ACF. Il est ainsi possible que la population détectée à $1,20\mu\text{m}^2/\text{s}$ en SPT corresponde à celle détectée à $2,67\mu\text{m}^2/\text{s}$ en FCS. Nous avons montré que le SPT avait une fenêtre de détection quasi-optimale entre 1 et $4\mu\text{m}^2/\text{s}$. S'il y avait présence dans cette gamme une population autre que celles détectées (par exemple une population à 2,5 ou $3\mu\text{m}^2/\text{s}$), nous devrions être capable de la détecter. Cependant, il est également possible que la valeur de D_α détectée en FCS correspond à une moyenne entre les populations détectées en SPT et une minorité de trajectoires rapides qui ne seraient pas détectées en SPT (c'est-à-dire avec un coefficient de diffusion très supérieur à $4\mu\text{m}^2/\text{s}$).

La FCS n'est pas adaptée pour décrire des populations très lentes. Le modèle

de diffusion le plus lent que nous avons dans nos échantillons de référence (article : « **Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell** ».) était de $0,4\mu\text{m}^2/\text{s}$ théorique, ce qui reste 4 fois plus élevé que la population lente de CT1 détectée en SPT. Néanmoins, même pour une population théorique à $0,4\mu\text{m}^2/\text{s}$, la FCS la détectait à $1,13\mu\text{m}^2/\text{s}$ soit quasiment le triple. Nous pouvons donc affirmer que la population détectée à $0,10\mu\text{m}^2/\text{s}$ en SPT est probablement sur-estimée en FCS.

Concernant la valeur du coefficient d'anomalie, nous avons mesuré en SPT deux valeurs de α : 0,55 pour la population lente (39% des trajectoires) et 1,08 pour la population rapide (61% des trajectoires). Il est plus difficile de comprendre la pertinence de la valeur calculée en FCS en rapport aux deux valeurs trouvées en SPT. La moyenne des α pondérée avec leur fraction, nous donne une valeur autour de 0,8, ce qui est semblable à la valeur de la médiane de tous les coefficients d'anomalie détectés en SPT. Néanmoins, il a été montré par simulations que la FCS pouvait percevoir une anomalie artefactuelle dans le cas où 2 ou 3 populations libres étaient mélangées, ce qui est possiblement le cas ici. Il est prévu de réaliser des simulations avec des populations décrivant les paramètres diffusifs trouvés en SPT, et d'analyser ce que détecterait la FCS comme comportement moyen.

Chapitre 5

Discussion

Mes travaux sur la dynamique moléculaire se sont décomposés en trois temps :

1. Caractérisation des systèmes de mesure de la dynamique moléculaire FCS et SPT avec des échantillons de référence.
2. Caractérisation de la sensibilité de ces systèmes FCS et SPT pour des modèles expérimentaux à deux populations (échantillons de référence (billes) et application à RPB1), proposition d'un protocole d'analyse pour la détermination des sous-populations en présence.
3. Etude de la dynamique moléculaire de CT1 wt, son mutant CT1 Δ (480 – 551) délété du domaine HR responsable de l'interaction avec RPB1, ainsi que deux conditions de drogues (JQ1, inhibiteur des bromodomains et Flavopiridol inhibiteur de CDK9 et de sa fonction kinase).

Les deux premiers points ont été illustrés dans l'article « **Characterization of diffusion measurements by SPT and FCS and application to the study of RNA Pol II in U2OS cell** » présent dans cette thèse.

Etant donné que ces deux points ont servi de base à l'analyse de la 3ème question, il m'a paru logique de regrouper l'ensemble des éléments de discussion associés pour une discussion plus linéaire.

5.1 Caractérisation des sensibilités de FCS et SPT par échantillons mono-populations

Les techniques de SPT et de FCS ont des sensibilités différentes parce qu'elles sont pratiquées sur des capteurs aux propriétés d'échantillonnage spatio-temporel très différentes. Les techniques de dynamique nécessitant un champ large comme le SPT utilisent des caméras ultra-rapides comme les EMCCD ou les sCMOS. Ces détecteurs permettent d'avoir un large champ de vue, à l'échelle de la cellule entière pour une résolution temporelle de l'ordre de 1-10ms pour les sCMOS, par exemple. De ce fait, le SPT présente des difficultés à échantillonner correctement les trajectoires des particules présentant un coefficient de diffusion supérieur à $4\mu\text{m}^2/\text{s}$ [61]. Afin de surmonter cette limitation, il est possible de diminuer davantage le temps d'acquisition, au détriment de la taille du champ, surtout pour les EMCCD qui viennent lire la matrice pixel par pixel tandis que les sCMOS fonctionnent principalement en mode « *rolling shutter* » donc lecture ligne par ligne de pixels. L'autre avantage du SPT, est de pouvoir résoudre au-delà de la limite de diffraction la position des molécules. La caractérisation de l'erreur de pointé sur échantillon biologique fixé (RPB1-N-Halo, JF 549) de 50 nm environ permet de positionner la réponse impulsionnelle des molécules avec précision sur un champ large (jusque $10\times 10\mu\text{m}^2$).

La FCS de son côté fonctionne grâce à un capteur ponctuel de type SPAD. Bien que la résolution temporelle de ces capteurs soit exceptionnelle (de l'ordre de la ns- μs), d'un point de vue spatial, la FCS acquiert le signal provenant du volume focal (environ $200\times 200\text{nm}^2$ dans le plan $x - y$, 500nm dans le plan z), qui est très limité par rapport au volume global d'une cellule. De plus, le volume focal correspondant à un micro-environnement local hétérogène, nous n'observons en FCS que la résultante d'un comportement moyen des molécules.

Pour des échantillons simples comme des mono-populations de billes de polystyrène fluorescentes en suspension dans une solution d'une certaine viscosité, la FCS présente une sensibilité précise (écarts-types faibles) et sur une plage de coefficients de diffusion assez large ($0,4-15,1\mu\text{m}^2/\text{s}$). Néanmoins on remarque que la FCS a une tendance à surestimer le coefficient de diffusion, surtout lorsque ceux-ci sont les plus lents.

Concernant le SPT, nous avons une fenêtre de sensibilité adéquate jusque des

valeurs de coefficients de diffusion de $4\mu\text{m}^2/\text{s}$. Au-delà, le SPT retourne des valeurs de moins en moins exactes. Ceci s'explique par la difficulté à laquelle l'algorithme de tracking fait face pour détecter la position des particules qui présentent un flou de bougé. En effet, lorsque la fréquence d'acquisition n'est pas assez rapide par rapport à la vitesse de la particule, nous observons des PSF étalées, en forme de comète résultante du flou de bougé. Lorsque la détection a lieu, l'erreur est d'autant plus grande que le flou de bougé est présent [124, 157]. Le SPT présente une sensibilité particulière aux particules lentes ou fixées, car statistiquement, elles sont censées rester plus longtemps dans le champ de vision. Ce point de discussion est également abordé dans l'article de Hansen et al. sur le logiciel Spot On [60]. En effet, ce logiciel prend en compte et corrige ce phénomène, grâce à une abaque réalisée sur la base de simulations. De manière générale, nous observons que le SPT a une tendance à sous-estimer la valeur des coefficients de diffusion. On peut expliquer ce phénomène par le fait que nous étudions les images 2D qui ne représentent pas le déplacement 3D des molécules : il y a absence d'informations sur l'axe en z . Avec une profondeur de champ de 500nm, nos particules peuvent diffuser en z sur une telle distance sans que l'on puisse le détecter sur nos images.

J'ai testé deux méthodes d'analyse de nos trajectoires : le TEA-MSD couramment utilisé et qui est la moyenne des MSD temporels de chaque trajectoire, et le H-MSD basé une analyse individuelle des trajectoires, issu des travaux de Etoc et al [41]. Les deux méthodes présentent des résultats similaires et sont autant exactes l'une que l'autre pour des échantillons mono-populations.

5.2 Caractérisation de la sensibilité du SPT pour des échantillons de référence et biologiques à deux populations

Dès que le modèle se complexifie et que l'échantillon présente non pas une, mais deux populations, l'analyse par TEA-MSD ne peut être utilisée de manière quantitative. En effet, comme le TEA-MSD représente un comportement moyen d'un mélange de deux populations, cette méthode nous renvoie alors une courbe résultante du moyennage mais qui n'a pas de réalité physique, car dans l'échantillon, aucune particule n'en est à l'origine.

La technique d'analyse en histogramme (H-MSD) s'est révélée être efficace pour distinguer deux populations distinctes. Différentes conditions à deux populations ont été testées : condition A ($D1=4,0\mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D2=0,1\mu\text{m}^2/\text{s}$), condition B ($D1=0,9\mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D2=0,1\mu\text{m}^2/\text{s}$), condition C ($D1=4,0\mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D2=0,9\mu\text{m}^2/\text{s}$) et condition D ($D1=4,0\mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D2=3,8\mu\text{m}^2/\text{s}$), avec pour chaque condition trois mélanges représentant des proportions de populations différentes. Pour les conditions A, B et C, l'algorithme s'est révélé très efficace pour calculer les coefficients moyens, avec au maximum 10% d'erreur pour l'ensemble des conditions testées. Concernant les proportions, l'algorithme a également montré une grande capacité à déterminer le pourcentage de trajectoires présentes dans chaque population, avec une erreur de 5% en moyenne. Pour la condition D, qui représente la condition où les deux populations moyennes sont très proches, l'algorithme a échoué. L'effet stochastique qui régit l'analyse individuelle des trajectoires a pour conséquence de provoquer un écart-type conséquent autour des valeurs moyennes (1 log de différence), les deux gaussiennes se recouvrent alors, ne permettant pas de les distinguer. Concernant les coefficients d'anomalie, l'algorithme a également retourné des valeurs cohérentes avec nos conditions de mélanges, bien que la difficulté soit moindre pour des populations browniennes comme des billes en diffusion dans un milieu homogène. La technique de H-MSD est une technique quantitative qui permet d'évaluer différentes populations en présence dans un échantillon inconnu. Néanmoins, dès lors que des populations aux propriétés similaires se chevauchent, un problème majeur se pose : comment choisir le nombre de fonctions gaussiennes à ajuster ? Sur des données expérimentales, nous avons éprouvé des difficultés à appliquer les sélections de modèles classiques comme le BIC. Dans notre

étude, nous avons évoqué le principe de parcimonie pour choisir le nombre de classes à sélectionner.

La représentation couplée $D_{60ms} - \alpha$ comme décrit par Etoc et al. [41] permet de représenter en deux dimensions les comportements individuels de chaque trajectoire, ce qui n'est pas le cas pour les représentations en histogrammes des paramètres D_{60ms} et α . Par l'ajustement d'un modèle de mélange de fonctions gaussiennes 2D, cette représentation permet d'attribuer à chaque population caractéristique les valeurs de D_{60ms} et α moyennes. Ces informations sont importantes pour décrire le comportement diffusif des populations caractéristiques en présence. Le principal avantage de cette technique d'analyse est qu'elle ne fait pas d'approximation en ce qui concerne l'anomalie des trajectoires. En effet, contrairement à Spot On [59], qui analyse les trajectoires avec un modèle brownien, notre méthode a l'avantage de traiter l'anomalie de chaque trajectoire individuelle. Pour caractériser le comportement diffusif des molécules, et notamment leur niveau d'interactions spécifiques et/ou non spécifiques, le calcul du coefficient d'anomalie est un facteur clé qu'il ne faut pas négliger.

J'ai ensuite utilisé ces techniques d'analyse mises en place afin d'étudier une de nos molécules d'intérêt : l'ARN Polymérase II, ou plus précisément la sous-unité RPB1 porteuse de l'activité polymérase. Les analyses de la diffusion de RPB1-Halo (avec marquage JF549) ont montré que sur notre plage spatio-temporelle de détection, les molécules pouvaient avoir deux comportements distincts, à savoir, une population très confinée ($D_{60ms} = 0,01\mu m^2/s, \alpha = 0,23$) et une autre population diffusante $D_{60ms} = 0,43\mu m^2/s$ présentant une légère anomalie ($\alpha = 0,73$), dans des proportions assez proches (46% et 54% respectivement). En FCS, et pour la même molécule (marquée avec JF 503) nous obtenons une valeur de D de $1,4\mu m^2/s$ et un alpha de 0,5. De cette expérience, j'ai conclu que comme les valeurs de coefficients de diffusion sont sur les plages de sensibilité des deux méthodes, FCS et SPT voyaient les mêmes populations, mais donnaient lieu à une interprétation différente. Dans ce cas précis, la FCS nous a servi de contre-mesure afin d'attester que le SPT pouvait globalement détecter toutes les populations décrivant notre molécule d'intérêt. Concernant les valeurs de coefficient de diffusion apparents obtenues par les deux techniques, on peut constater que le coefficient de diffusion obtenu en FCS ne correspond pas à la valeur moyenne des deux coefficients de diffusion calculés en SPT. Sachant que la population la plus lente et très confinée est composé à 53% de molécules fixées, il est fort probable que la FCS ne l'ait pas pris en compte. En

effet, la FCS est une technique basée sur la mesure des fluctuations de fluorescence. De ce fait, une molécule qui est fixée dans le volume focal va contribuer au signal de fluorescence par la création d'un offset, mais ne va pas apparaître dans la courbe d'autocorrélation, car une constante additive dans le signal ne se corrèle pas. Ainsi, les molécules fixées bien qu'elles puissent contribuer au signal de fluorescence ne participent pas à la courbe d'ACF.

Concernant la dynamique moléculaire de RPB1, l'état de l'art est relaté dans l'article de Boehning et al., dans l'article « **RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation** » [15]. L'auteur trouve un coefficient de diffusion rapide d'environ $3\mu\text{m}^2/\text{s}$ (vs $0,43\mu\text{m}^2/\text{s}$ dans mes expériences). Il est à noter qu'il a utilisé un marquage JF photo-activable différent du nôtre, et qu'il a procédé par un processus d'acquisition et d'analyse différent, ce qui peut en partie expliquer le décalage dans les valeurs obtenues. En effet, Boehning utilise la méthode spa-SPT, une méthode d'illumination stroboscopique qui permet de limiter le flou de bougé et les imprécisions de mesures, alors que nous avons une illumination continue. Ensuite, Boehning utilise pour son analyse des trajectoires le logiciel Spot On, qui corrige pour l'ambiguïté sur l'axe z et les aller-retours des molécules dans le plan d'observation : les valeurs calculées par Spot On sont légèrement supérieures. Pour vérifier si la différence provenait de mon protocole d'analyse, j'ai analysé mes trajectoires de RPB1 par Spot On (+ de 5500 trajectoires de plus de 3 points). Le logiciel renvoie un $D_{bound} = 0,008\mu\text{m}^2/\text{s}$ (+/-0,0001), $D_{fast} = 0,536$ (+/-0,0014), et $F_{bound} = 0,728$ (+/-0,0004). Les valeurs des coefficients de diffusions sont assez proches des nôtres, et nous observons que la valeur de D_{fast} calculée par Spot On est légèrement supérieure comme attendu. La différence entre nos valeurs et celles de Boehning ne vient donc pas de la méthode d'analyse, mais probablement du protocole d'acquisition et la diminution du flou de bougé.

Concernant la dynamique de RPB1, mes résultats mettent donc en avant le fait que nous avons une population de RPB1 qui est fixée sur la chromatine (20% total des trajectoires) et donc en interaction. Environ 26% des molécules présentent un comportement diffusif très lent et confiné, tandis que les 54% restantes sont diffusantes avec un mouvement légèrement contraint. Ce résultat peut être mis en parallèle avec les modèles de clusters décrits par Cissé et Cho [30, 28] qui correspondent à des zones spatialement définies au sein du noyau, dans lesquelles les molécules de RPB1 présentent une forte affluence. Cho décrit deux types de clusters dans son article, un

premier type (type 1) qui correspond à des petits concentrateurs d'environ 12 molécules qui sont activement engagées dans la synthèse de l'ARNm de la bêta-actine. Le deuxième type (type 2) décrit des clusters plus imposants qui sont composés de 81 molécules en moyenne et qui correspondraient à des concentrateurs transitoires, plus rares dans la cellule. Nos résultats complètent l'état de l'art sur la dynamique moléculaire de RPB1.

Mon avis est qu'il est possible que les clusters de type 1 correspondent aux molécules fixées que j'ai détecté. Les 26% de molécules lentes et anormales peuvent correspondre aux clusters transitoires plus gros mais plus rares. Tandis que la population diffusante légèrement contrainte peut représenter les molécules en recherche de cibles. La légère anomalie est en accord avec la spatialité des *transcription factors* au sein de la cellule. Comme ils sont placés stratégiquement et non aléatoirement dans le noyau, il est donc logique que la part des molécules diffusantes présentent une anomalie, suggérant que RPB1 diffusant est guidé en quelque sorte sur ses cibles.

5.3 Etude de la dynamique moléculaire de CT1

La description de CT1 en terme de sous-populations s'est révélée être plus fastidieuse que pour RPB1. En effet, CT1 semble présenter une distribution complexe de comportements diffusifs. Néanmoins, nous avons remarqué deux populations caractéristiques : une sous-population libre avec un coefficient de diffusion autour de $1\mu\text{m}^2/\text{s}$ et une autre plus confinée ($\alpha = 0,55$) caractérisée de lente mais non fixée ($D = 0,1\mu\text{m}^2/\text{s}$). Sur le même échantillon, la FCS voit une population moyenne allant à $2,6\mu\text{m}^2/\text{s}$ avec une anomalie de 0,55. A ma connaissance, l'état de l'art en ce qui concerne l'étude de la dynamique de CT1 est relaté dans l'article « **Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus** » de Izeddin et al.

Cette étude de CT1 s'est basée sur l'histogramme des translocations, TEA-MSD, et l'analyse de la distribution angulaire entre les segments d'une même trajectoire. Avec un marquage moléculaire grâce à la protéine photoconvertible Dendra2, les auteurs obtiennent des trajectoires présentant en moyenne 4 détections. Ils trouvent dans un premier temps par l'étude du TEA-MSD que P-TEFb a un comportement sous-diffusif avec $\alpha = 0,6$. Notons que l'analyse en TEA-MSD de mes données donne également un comportement moyen avec $\alpha = 0,6$. Néanmoins, la différence se trouve sur les coefficients de diffusion : Izeddin propose un modèle à 2 populations pour P-TEFb avec une population lente ($D=1\mu\text{m}^2/\text{s}$) et une rapide ($D=15\mu\text{m}^2/\text{s}$) avec un modèle de type Kon/Koff issu d'une comparaison avec des simulations. Mes résultats et SPT et FCS ne sont pas en accord avec ces valeurs de coefficients de diffusion. Si je confronte les valeurs de SPT, il aurait été possible d'expliquer la différence de valeurs par le marquage fluorescent utilisé : le marquage endogène par Dendra2 donne des trajectoires relativement courtes (4 points en moyenne) par rapport au marquage de type Halo-Tag associé aux ligands organiques Janelia Jarm (14 points en moyenne), ce qui rend les trajectoires plus longues statistiquement plus exploitables. Néanmoins, les diverses études se rejoignent sur l'aspect sous-diffusif de P-TEFb.

Concernant les modèles de diffusion que P-TEFb pourrait suivre, mes résultats semblent exclure l'hypothèse CTRW. En effet, je trouve en SPT la présence de deux populations, mais aucune d'entre elles ne possède un comportement moyen qui est fixé, ce qui de fait n'est pas compatible avec le modèle CTRW. La population lente de CT1 présente une anomalie, suggérant qu'il y a une partie de la population qui sur-

échantillonne l'espace à la recherche de cibles, tandis que l'autre diffuse librement. Les images super-résolues des positions des particules de CT1 suggèrent qu'il y a des zones spatialement définies dans le noyau où la fréquentation est supérieure. Il est fort probable, et il serait intéressant de le vérifier, que ces zones de forte fréquentation de CT1 soient superposées aux '*transcription factories*'. Les populations lentes de RPB1 et P-TEFb sont différentes et évoquent que P-TEFb a moins tendance à se fixer que RPB1 (4% des trajectoires totales pour P-TEFb vs 20% pour RPB1). Il est probable que les molécules P-TEFb à proximité de ces '*transcription factories*' adoptent un comportement sous-diffusif et qu'une portion se fixe transitoirement pour effectuer les phosphorylations. Une étude des clusters RPB1 et P-TEFb à double marquage serait envisageable pour valider cette hypothèse.

L'étude de CT1 wt en présence de JQ1 nous montre une augmentation de la fraction de la population lente. Il a été montré que la présence de BRD4 régule le recrutement de P-TEFb sur RPB1 [70]. Plusieurs modèles ont été proposés, notamment celui de Jang et al. qui suggère que BRD4 régule l'association de P-TEFb avec le complexe RNP 7SK/Hexim1/P-TEFb et serait à l'origine du recrutement de P-TEFb sur RPB1. Jang avait montré qu'une sous-expression de BRD4 entraîne une séquestration plus importante de P-TEFb dans le complexe RNP 7SK. Dans notre étude et sur nos échelles de sensibilité, nous observons une augmentation du coefficient d'anomalie concernant la population lente de CT1 en présence de JQ1, ce qui affirme que Brd4 contribue au comportement anomal de P-TEFb. De l'autre côté, l'augmentation de la fraction de la population lente pourrait évoquer que P-TEFb ait besoin de BRD4 pour se re-complexer avec le RNP 7SK. Ainsi, Brd4 n'interviendrait pas uniquement dans le recrutement de P-TEFb sur RPB1 mais également dans son relargage.

L'étude de CT1 en présence de flavopiridol, inhibiteur de CDK9, met en avant une population lente avec un coefficient de diffusion inférieur à celui de la référence (3 fois inférieur), mais également une anomalie supérieure ($\alpha = 0,36$). Cela suggère que lorsque l'activité kinase de P-TEFb est inhibée, ce dernier reste davantage à proximité de ses cibles. Cette information est en accord avec une observation faite au microscope : l'ajout de flavopiridol sur les cellules crée systématiquement des « *dots* » de CT1 (voir fig. 5.1 suggérant qu'il y a concentration de CT1 dans certaines régions du noyau. Le flavopiridol dans son action d'inhibiteur de kinase, réduirait la probabilité de P-TEFb de se libérer de ses partenaires et augmenterait ainsi son

confinement. Cette observation soutiendrait le fait que P-TEFb n'est pas distribué de manière égale dans la cellule, mais présente une augmentation de présence à proximité des clusters de RPB1.

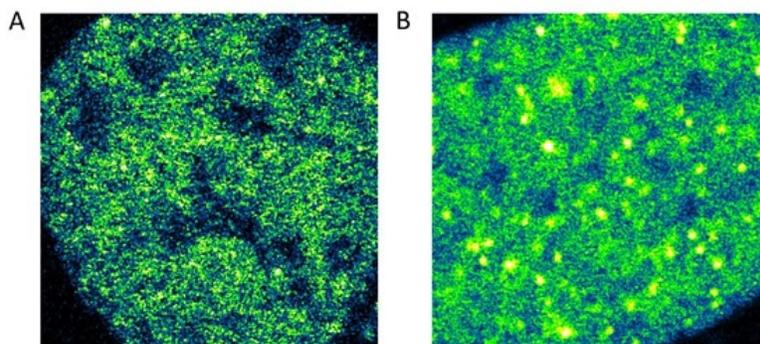


FIGURE 5.1 – Cellules U2OS exprimant CT1-GFP en présence (A) ou en absence de flavopiridol (B)

De ce fait, nous pouvons associer l'anomalie en partie à la réaction de phosphorylation et à l'interaction avec l'ARN Pol II, NELF, et DSIF. Ce résultat est, en ce sens, à rapprocher des derniers éléments qui indiquent que les mécanismes de phosphorylation de RPB1 contrôlent la formation de clusters avec ses partenaires par un processus de séparation de phase (Boehning et al, 2018) [15].

Concernant l'analyse du mutant CT1 Δ (480 – 551), l'étude des distributions des MSD à courte échelle de temps montre que sa dynamique est statistiquement différente par rapport à CT1 wt, ce que la FCS n'avait pas détecté. Dans cette thèse, le calcul des paramètres D et α suggèrent une différence, qui n'est cependant pas significative. Il semblerait néanmoins que cette différence impacte la population lente, notamment avec une diminution de l'anomalie. Le protocole d'ajustement des MSD individuelles, ainsi que les approximations réalisées, sont peut-être trop forts pour quantifier des différences fines, comme cela semble être le cas pour ce mutant. Cependant, ces premiers résultats sont encourageants car l'observation d'une perte d'anomalie sur la population lente évoque une perte d'interaction due à l'ablation du domaine HR, ce qui n'avait jamais été démontré. Des travaux d'approfondissement sont en cours.

Troisième partie

Développement d'un microscope multi-modal pour l'étude de la dynamique moléculaire

Chapitre 1

Introduction

L'ingénierie optique a évolué pour s'adapter aux besoins des biologistes. Les applications de la microscopie ne se limitent plus qu'à la simple imagerie cellulaire : depuis environ 20 ans, nous cherchons davantage à quantifier nos images, à localiser de manière précise, et à étudier la dynamique de nos molécules d'intérêt et leurs interactions à l'échelle moléculaire. Les techniques d'étude de la dynamique moléculaire sont nombreuses, les plus connues étant les techniques de : FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) [4], FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*) [98], et SPT (*Single Particule Tracking*) [52]. Comme nous l'avons vu dans la première partie de la thèse, notamment pour la FCS et le SPT, chaque technique de mesure de la dynamique moléculaire offre ses avantages et permet une compréhension à des échelles spatio-temporelles différentes de ces phénomènes complexes et non-linéaires que sont les déplacements et les interactions moléculaires. La FCS nous donne une mesure rapide et fiable du comportement moyen de nos protéines d'intérêt, mais peut difficilement caractériser un mélange de populations lorsque leur paramètres de diffusion sont très proches ($< 1\log$). De plus, la résolution spatiale des mesures de FCS, qui correspond au volume focal d'un LASER en sortie d'objectif est très inférieur à l'ordre de grandeur d'une cellule, et ne permet de caractériser l'état de la diffusion qu'en un seul point. Cependant, la résolution temporelle des mesures FCS (de l'ordre de la nanoseconde) nous permet d'avoir un échantillonnage de précision inégalable pour la caractérisation du mouvement. Une mesure de FCS dure environ 30 secondes, suffisant longtemps pour observer des dynamiques très lentes. Il est donc compliqué de faire une image par mesures successives de FCS point par point. Cependant, des techniques émergent comme ImagingFCS [74] et permettent

grâce à des caméras ultra-rapides d'obtenir une cartographie des paramètres de diffusion calculés par pixel. De l'autre côté, le SPT nous permet d'observer les cellules entières, et de mesurer spatialement de manière précise et super-résolue, les mouvements de nos protéines d'intérêt. Cela dit, la résolution temporelle des caméras sCMOS ou EMCCD couplée à la brillance des sondes fluorescentes d'aujourd'hui ne permettent pas un échantillonnage temporel en dessous de la milliseconde, ce qui limite la sensibilité de le SPT au dessus de $5\text{-}10\mu\text{m}^2/\text{s}$. Des méthodes comme le SPT en illumination stroboscopique émergent pour essayer de repousser cette limitation (Elf et al. 2007) [40]. Une combinaison des techniques FCS et de SPT est donc intéressante pour avoir une vision aussi complète que possible des phénomènes que l'on souhaite observer. Cependant, ces deux techniques de mesure de la dynamique moléculaire nécessitent respectivement des illuminations de type TIRF/HiLo [6][147] ou feuille de lumière (champ large)[90] pour la première et confocale [143] pour la seconde. A notre connaissance, il n'existe pas à l'heure actuelle de dispositif commercial permettant de permuter entre plein champ (TIRF HiLo ou feuille de lumière) et confocal, et tous les laboratoires ne peuvent pas se permettre d'avoir plusieurs microscopes commerciaux pour des applications de dynamique moléculaire soit pour des raisons financières ou alors des raisons d'espace. Afin de permettre aux scientifiques de notre communauté d'avoir une solution à ce problème, nous avons décidé de nous lancer dans la fabrication d'un prototype de microscopie multimodale, appelé StellarScan, qui nous permet de choisir entre différents types d'illumination afin d'opérer des mesures de dynamique moléculaire de manière séquentielle, sur le même échantillon.

Dans cette partie de la thèse, beaucoup plus orientée ingénierie optique que recherche fondamentale, nous allons voir et décrire les différentes parties de la conception de ce prototype : du cahier des charges, aux modélisations, en passant par la fabrication, les tests et la caractérisation. Le design de ce module a été réalisé en collaboration avec l'entreprise Errol, qui est spécialisée dans la fabrication, la miniaturisation et l'optimisation des systèmes optiques. Le développement informatique du logiciel ScanVision utilisé pour piloter ce module a été sous-traité par la société Styrel. Des micro-miroirs ont été réalisés à l'IEMN Lille en collaboration avec Yannick Coffinier, qui a contribué aux choix techniques et à la réalisation.

Chapitre 2

Description du besoin - Cahiers des charges

2.1 Description du besoin

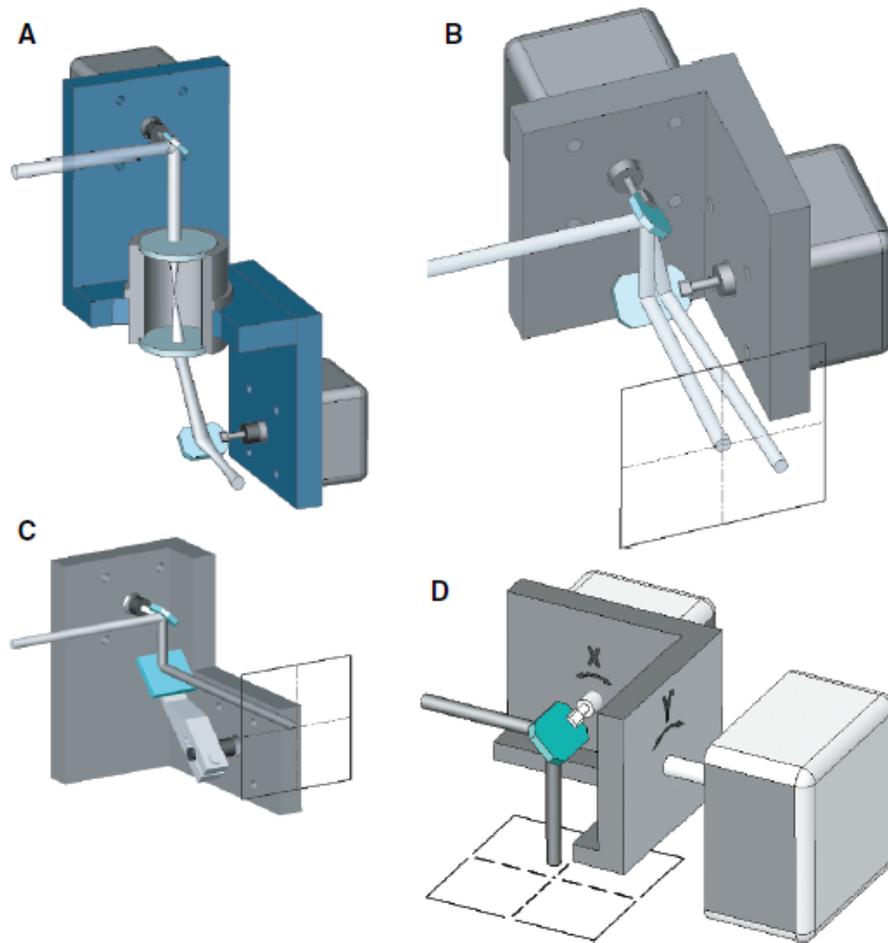
En association avec la société Errol, nous avons cherché à réaliser un module optique de mesure de dynamique moléculaire en cellule adaptable au delà de nos besoins spécifiques. Nous avons souhaité que ce module soit compact, adaptable sur tout les statifs de microscope, peu coûteux, facile à installer et il doit disposer de trois modes d'illuminations : TIRF-HiLo, feuille de lumière et CLSM. Chaque type d'illumination requiert des spécifications bien précises et nécessitent d'être définies avant l'étape de conception. Nous allons détailler dans ce paragraphe les points critiques à considérer pour chaque illumination.

2.1.1 CLSM : Confocal LASER Scanning Microscopy

Comme expliqué section 1.2.3 la microscopie actuelle repose sur le principe d'un balayage LASER 2D ou 3D dynamique rendu possible grâce à des scanners galvanométriques qui oscillent rapidement. Stelzer [143] propose différentes solutions de systèmes de balayage par scanners pour le mode confocal (fig.2.1) : (1) Deux scanners orthogonaux sont positionnés sur les plans télécentriques d'un relais optique. Ainsi l'image du premier miroir est situé sur le plan du second miroir : la rotation du premier miroir est donc projeté sur le second qui lui même tourne, cela produit donc un balayage en deux dimensions. Ce dispositif est optiquement le plus parfait

d'un point de vue théorique, mais d'un point de vue expérimental, il est compliqué à mettre en oeuvre. En effet, il faut que le relais optique soit parfaitement conjugué avec les scanners pour que cela fonctionne, et il faut absolument que les optiques produisent des images parfaites à la longueur d'onde choisie. (B) Deux scanners orthogonaux très proches sans relais optique. On s'arrange pour placer un des plans télécentriques du microscope au centre des deux miroirs, de cette manière, les deux scanners sont approximativement situés sur un plan télécentrique. L'avantage d'un tel dispositif réside bien sûr dans la compaction du système de scan. Cependant, ce dispositif n'est fonctionnel que pour des petits miroirs qui vont balayer sur des petits angles. Un des soucis majeurs avec cette configuration est que lorsque le premier miroir tourne, il se désaxe de sa position d'origine. De ce fait, le faisceau va intercepter le second miroir non pas centré sur l'axe, mais légèrement à côté, provoquant un décalage qui va se répercuter tout le long du trajet optique, et notamment dans le plan focal arrière de l'objectif. Ce phénomène est référencé sous le nom de « pupil shift » [10]. (C) Doublet de scanners on- et off- axis. Il s'agit d'une version améliorée de l'exemple précédent. En effet, le second miroir appelé également 'paddle scanner' est monté sur un pivot hors axe, lors de son mouvement, le miroir va effectuer une rotation mais également une légère translation qui lorsqu'elle est correctement alignée va aider à compenser le pupil shift. [101] (D) Un miroir monté sur un rotor 2 axes. Pour cela, il faut monter un petit et rapide galvanomètre sur un autre plus grand, et donc plus lent. Cette technique est idéale dans un cas où on ne cherche pas à intervertir les commandes sur les axes X-Y.

La partie confocale de notre dispositif optique consistera donc en un système de scanner 2D, corrigé pour le pupil shift, suivi d'un télescope de grossissement pour adapter la taille du faisceau avant injection dans un objectif NIKON Plan Fluor x40 1,0 NA . Pour des raisons d'espace et de coût, notre choix s'orientera vers un système de scanner de type (B) qui sera optimisé pour l'annulation du pupil shift.



Tiré de Stelzer et al. 2015

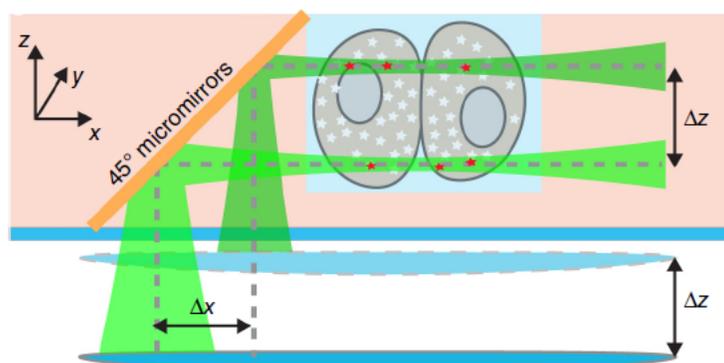
FIGURE 2.1 – Différents types de scanners 2D [143]

2.1.2 Feuille de lumière

Inventée en 1993 par Voie et al., l'illumination par feuille de lumière s'est déclinée en une multitude de variantes [57]. Initialement, la feuille de lumière est mise en forme grâce à une lentille cylindrique qui focalise le faisceau dans une seule direction, le signal de fluorescence étant récupéré par un objectif perpendiculaire à l'axe optique du faisceau d'excitation. Cette technique ingénieuse a permis l'imagerie d'un échantillon biologique épais (cochlée de cobaye) avec un sectionnement optique intéressant pour l'époque, et une résolution latérale de $10\mu\text{m}$ et axiale de $26\mu\text{m}$.

Cependant, cette technique présente différentes limitations, premièrement, les montages optiques avec excitation et émission orthogonales prennent de l'espace et ne sont pas adaptés pour de l'imagerie cellulaire. De plus, l'intensité du faisceau restant gaussienne dans toutes les directions, les images récupérées ne sont pas uniformes. Pour pallier à ce dernier problème, Keller et al. a publié en 2008 [75] une méthode de feuille de lumière par balayage appelé '*Digital Scanned Light Sheet Microscopy*'. Cette technique repose sur un balayage rapide de l'échantillon dans une direction afin de remplacer la lentille cylindrique qui induit la distribution gaussienne du signal image. Si la vitesse de balayage est très supérieure à la vitesse d'acquisition de la caméra, l'illumination va apparaître comme un moyennage uniforme sur l'image.

Pour adapter l'illumination en feuille de lumière à des échantillons biologiques très plats, comme les cultures cellulaires 2D, Galland et al. propose un système d'illumination par feuille de lumière par la tranche avec l'ajout d'un système de micro-miroirs à 45° appelé so-SPIM (single-objective Selective Plane Illumination Microscopy). De cette manière excitation LASER et émission de fluorescence passent par le même objectif. (voir fig.2.2)



Tiré de Galland et al. 2015. Représente la mise en forme du faisceau laser en sortie d'objectif. Le faisceau est réfléchi sur le miroir à 45° . Un décalage du faisceau en Δx correspond à un décalage en Δz du fait de la transformation à 90° .

FIGURE 2.2 – single-objective Selective Plane Illumination Microscopy [50, 139]

Grâce à un bon sectionnement optique, la microscopie à feuille de lumière sous la forme 'so-SPIM' est intéressante pour l'étude sur culture cellulaire 2D ou petit organoïde (3D). Cette technique réalisable sous deux modes : (1) un mode 'statique' en utilisant une lentille cylindrique ou (2) un mode 'scanning' par un balayage LASER nous permet de visualiser nos particules d'intérêt sans contrainte par rapport à l'échantillonnage de leur mouvement. Cette technique nécessite le développement en salle blanche de micro-miroirs orienté à 45° pour dévier le faisceau perpendiculairement à l'axe optique de l'objectif.

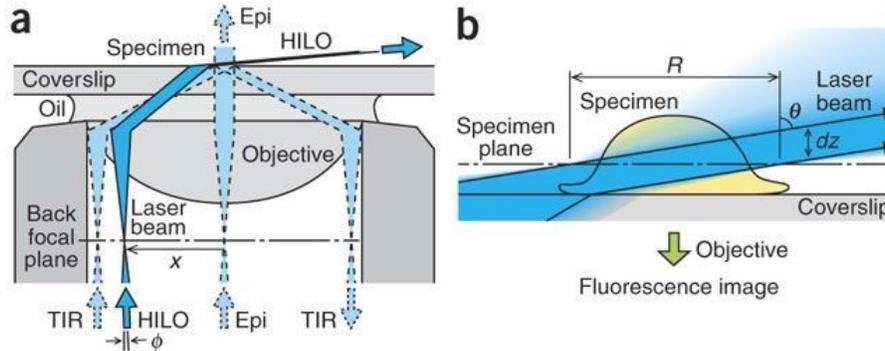
Concernant la mise en forme du faisceau LASER, à part la mise en place d'une lentille cylindrique au besoin, elle est semblable au schéma optique de l'excitation confocale à deux détails près : (1) en mode feuille de lumière le faisceau doit focaliser plus loin qu'en mode confocal qui possède la caractéristique d'avoir une distance de travail très courte, et (2) la distance de Rayleigh qui correspond à la distance sur laquelle le faisceau converge doit être plus grande qu'en confocal. Pour cela, deux modifications sont à apporter :

- Pour que le faisceau converge plus loin qu'à la distance de travail, le faisceau doit arriver légèrement divergent dans le plan arrière de l'objectif.
- Pour que la distance de Rayleigh soit plus grande qu'en confocal, il ne faut pas que la pupille arrière de l'objectif soit totalement remplie : la longueur de la distance de Rayleigh est inversement proportionnelle à l'occupation de la pupille arrière. Mais la longueur de la distance de Rayleigh est proportionnelle

à l'épaisseur du waïst. Ainsi un faisceau qui converge sur une distance plus longue, va créer une épaisseur de feuille de lumière plus épaisse. Il faudrait donc pouvoir ajuster à façon le diamètre du faisceau à l'entrée de l'objectif pour pouvoir créer des feuilles de lumière de longueurs et d'épaisseurs différentes.

2.1.3 HiLo/TIRF

Les microscopies TIRF et HiLo ont été respectivement inventées par Axelrod [6] et Tokunaga [147] et sont différentes des modes confocal et feuille de lumière d'un point de vue optique (voir fig. 2.3). En effet, concernant la mise en forme du faisceau, ces modes requièrent que le LASER soit focalisé dans le plan focal arrière de l'objectif. L'inclinaison du faisceau est dû à un décalage en X-Y du point focal dans le BFP. Pour cela, le mode TIRF/HiLo nécessite également une paire de miroirs scanners X-Y, cependant, contrairement au confocal, la vitesse d'oscillation et le temps de réponse des scanners est moins importante ici, car une fois le faisceau placé dans le plan, il ne bougera plus. La différence entre TIRF et HiLo réside simplement dans la valeur de l'angle d'inclinaison du faisceau. En TIRF, on se place à l'angle critique $\theta_c = \arcsin \frac{n_{milieu}}{n_{lame}}$ avec n_{milieu} l'indice optique du milieu biologique et n_{lame} l'indice optique de la lame de microscope. De cette manière, le faisceau sera totalement réfléchi dans l'objectif de microscope, mais de ce phénomène naît à l'interface lame/milieu une onde évanescente statique, dont l'amplitude décroît de manière exponentielle à mesure qu'on s'éloigne du dioptre et indépendamment du temps. Pour nos applications de microscopie, l'onde évanescente se propage sur moins de 200nm n'excitant de cette manière uniquement les objets se situant sur la lamelle. Ce type de microscopie est très adaptée pour l'imagerie de phénomènes membranaires, mais beaucoup moins pour l'étude de la diffusion de facteurs de transcription dans le noyau, contrairement à l'illumination HiLo qui permet une flexibilité quant à la pénétration du faisceau dans l'échantillon.



Tiré de Tokunaga et al. 2008 (a) Description des différents types de microscopie champ large. L'épifluorescence : le faisceau est parallèle à l'axe optique. L'HiLo création d'une feuille de lumière locale très inclinée, comme le montre le zoom en (b). Et le TIR : le faisceau est réfléchi à l'intérieur de l'objectif, générant une onde évanescente à la surface de la lame sur 200 nm. (b) Cette figure montre l'inclinaison du faisceau en sortie d'objectif : le faisceau LASER d'épaisseur dz , se retrouve incliné d'un angle θ . Le champ d'illumination de dimension R correspond donc à l'intersection entre le faisceau et le plan d'imagerie de l'objectif.

FIGURE 2.3 – TIRF/HiLo : Différences trajets optiques entre TIRF et HiLo [147]

En configuration HiLo, l'angle d'inclinaison se situe juste avant l'angle critique : c'est-à-dire que la position du point focal dans le BFP de l'objectif sera moins décentré par rapport à l'axe optique qu'en TIRF. En HiLo, il n'y a pas d'angle d'inclinaison à privilégier : en effet, selon l'emplacement de l'objet dans le plan de l'échantillon, on peut être amené à incliner plus ou moins le faisceau afin d'optimiser l'illumination et le rapport signal-sur-bruit. D'un point de vue de la mise en forme du faisceau TIRF et HiLo possèdent les mêmes caractéristiques à une différence près : autant qu'en TIRF les propriétés de l'onde évanescente décroissante en z dépendent de l'angle d'incidence et de l'indice du milieu dans lequel l'onde se propage, en HiLo l'épaisseur du faisceau dépend directement du diamètre du faisceau dans le plan télécentrique du microscope et du grandissement de l'objectif. [147] Afin de pouvoir modifier l'épaisseur du faisceau fonction de l'échantillon, il serait utile d'avoir un système permettant de modifier le diamètre du faisceau sans modifier le trajet optique ni réaligner le système.

2.2 Cahier des charges - dispositif optique

2.2.1 Mode CLSM

Le chemin optique du mode CLSM se décompose en 2 parties : l'excitation (représentée en bleu) et l'émission + la détection confocale (représenté en vert) comme suit (voir fig.2.4)

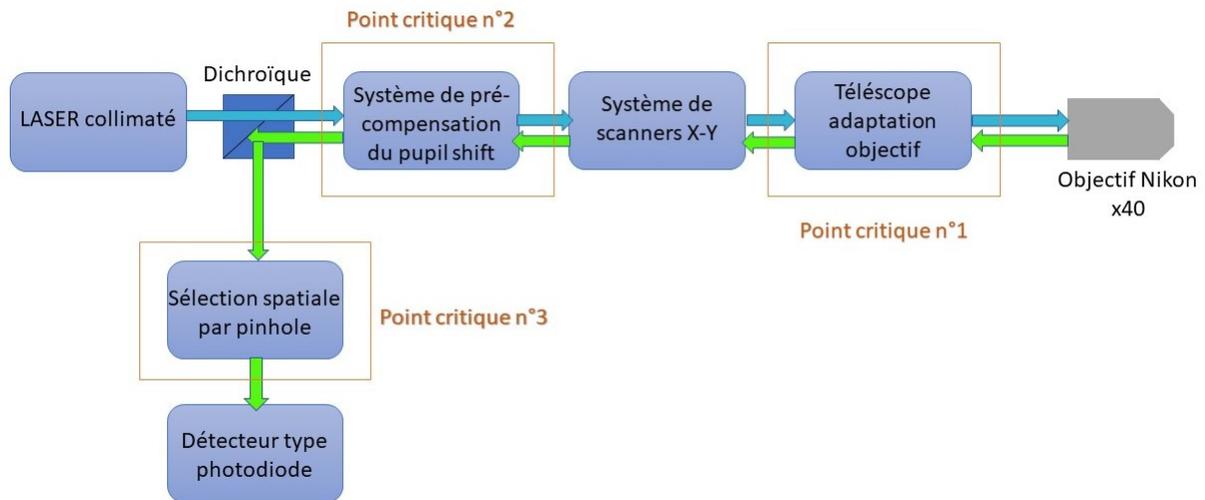
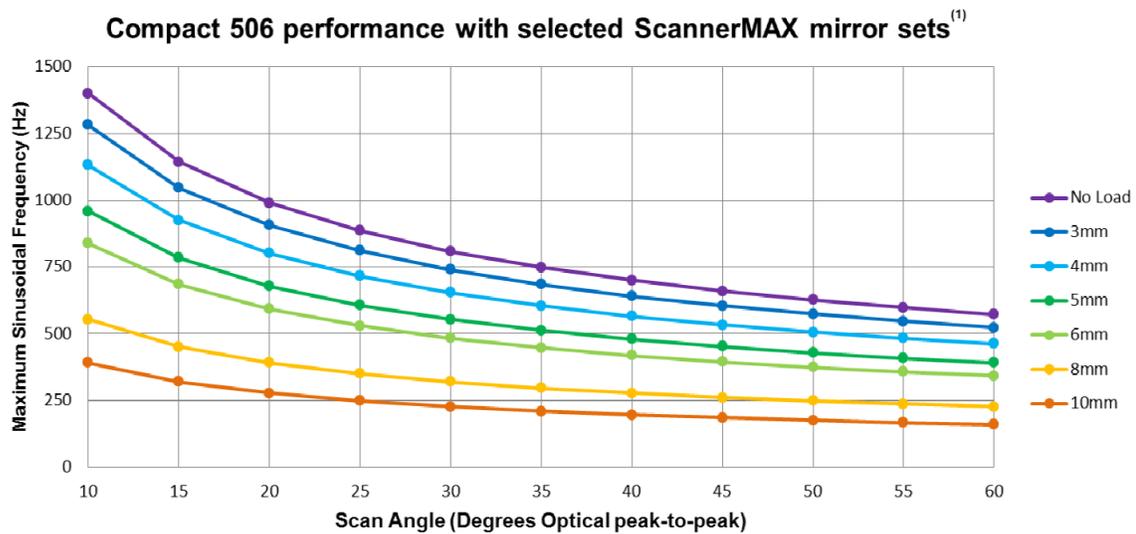


FIGURE 2.4 – Schéma bloc de notre mode d'illumination confocale

2.2.1.1 Point critique numéro 1 : adaptation de la taille du faisceau à la pupille arrière de l'objectif pour se placer en condition « diffraction limited ».

Comme précisé plus haut, pour avoir la meilleure résolution possible, il faut que la diamètre du faisceau à $1/e^2$ soit semblable à la taille de la pupille arrière de l'objectif. Nous utilisons un objectif NIKON Plan Fluor x40 1.0 NA avec une pupille arrière de 10mm. Pour la mise en forme du faisceau, nous avons choisi d'utiliser des lentilles standards de chez ThorLabs (plano-convex, en N-BK7, A-coated, diamètre 2,56cm) : les montures optiques ne sont donc pas limitantes et ne risquent pas de vignetter le faisceau. Cependant, les éléments pouvant induire du vignetage sont les miroirs scanners. En effet, il existe différentes tailles de miroirs : par exemple chez ScannerMax (Sanford, USA), la série « Compact 506 » propose un panel de miroirs galvanométriques de forme rectangulaire allant de 3mm jusque 10mm. Néanmoins,

toutes les tailles de scanners ne sont pas équivalentes. Le poids des miroirs joue un rôle primordial, car plus ils sont lourds, plus ils ont d'inertie et moins le rotor va réussir à les faire tourner rapidement et sans artefact mécanique (oscillation, inertie...). Il existe donc une relation entre la fréquence maximale de rotation selon l'angle et la taille du miroir, qu'il faut prendre en compte pour la conception du système optique. Pour notre dispositif, des scanners de 8mm ont été choisis : pour des petits angles ($<10^\circ$ optique) ils sont capables d'osciller à 520Hz (voir fig. 2.5).



Tiré des datasheets de ScannerMAX Compact 506. Compare la fréquence sinusoïdale maximal atteinte par les scanners fonction de l'amplitude de l'angle considéré.

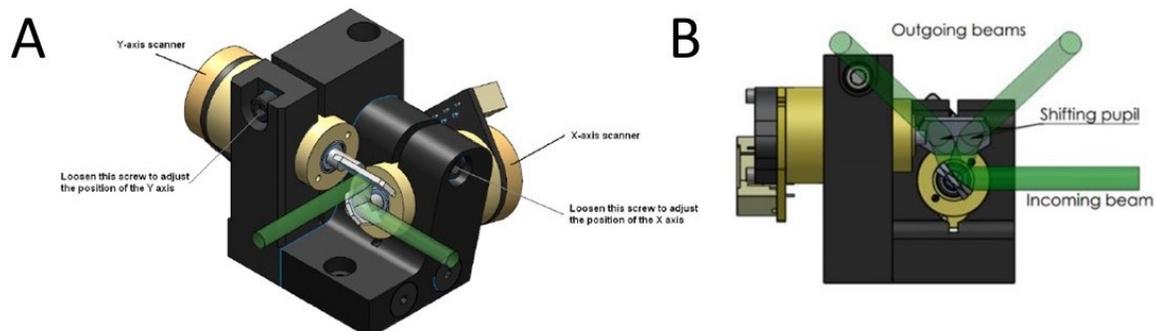
FIGURE 2.5 – Performance des scanners Compact 506 selon la taille des miroirs

Considérons donc que le diamètre maximal du faisceau est limité par les dimensions du scanner, cela signifie donc que pour remplir la pupille arrière de l'objectif totalement, il faut rajouter un télescope dont le grandissement est au moins égal à 1,4, entre les scanners et l'objectif pour pouvoir réaliser le mode confocal correctement.

2.2.1.2 Point critique numéro 2 : annulation du pupil shift dans le plan focal arrière de l'objectif

Pour des raisons de coût et d'espace, nous avons sélectionné un couple de scanners X-Y placés de manière orthogonale l'un par rapport à l'autre sur un seul et même

support de la marque ScannerMax (réf : Compact 506 package) (voir fig. 2.6)



Tiré de « Laser Scanners : How They Work, and How They Can Work for Your Product : Technologies and Applications » de W. R. Benner. (A) La figure montre un système de scanners X-Y. Le faisceau vert représente le faisceau LASER. (B) Zoom sur le deuxième miroir : le faisceau intercepte le 2nd scanner à deux positions différentes selon l'angle du premier.

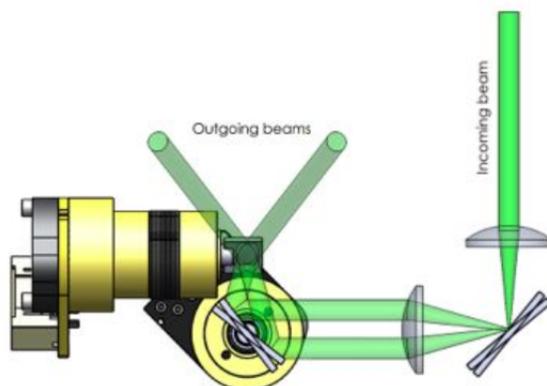
FIGURE 2.6 – (A) Système de scanners utilisé 2D - (B) Description du pupil shift [10]

Avec ce genre de dispositif intégré, nous devons placer le plan télécentrique du microscope au centre géométrique des deux scanners, afin qu'il soit conjugué au BFP de l'objectif. Cela dit, cette configuration n'est qu'une approximation, car la théorie voudrait que le BFP soit conjugué avec les plans respectifs des deux miroirs. Lorsque le premier miroir va osciller, la position du faisceau LASER va également osciller sur le deuxième scanner (fig.2.6), créant le décalage de la pupille, ou *pupil shift*.

Comme le plan télécentrique où apparaît le pupil shift est conjugué au plan focal arrière de l'objectif, le décalage de pupille apparaît également à l'entrée de l'objectif. La taille du faisceau étant mise en forme pour occuper l'intégralité de la pupille arrière de l'objectif, au lieu d'observer un plan fixe axe de rotation du faisceau LASER, nous observons une légère translation du faisceau, donnant lieu à des variations d'intensité LASER dues à un vignettage lors du mouvement. En sortie d'objectif, le faisceau est donc déformé (perte de la nature gaussienne du faisceau LASER), l'intensité n'est pas homogène lors du balayage ce qui peut induire des erreurs de localisation lors des expériences de Single Particle Tracking.

Pour contrer ce phénomène, nous nous sommes inspirés des solutions proposées par William R. Benner Jr, président et CTO de Pangolin Laser Systems, maison

mère de ScannerMax. Ce spécialiste des scanners et du balayage LASER préconise un système de pré-compensation du pupil shift afin d'annuler les effets de ce phénomène, comme suit (fig.2.7) :



Insertion d'un système de compensation du pupil-shift composé d'un troisième scanner et d'une paire de lentilles, situé en amont.

FIGURE 2.7 – *Système de pré-compensation du pupil-shift par William R. Benner Jr [10]*

Un troisième scanner de pré-compensation est rajouté au système. Le but de ce troisième scanner est de modifier la position du faisceau sur le premier scanner fonction de son angle de balayage afin que l'incidence du faisceau sur le deuxième scanner soit centré sur la même position peu importe l'angle. De cette manière, l'image du deuxième scanner sur le plan focal arrière de l'objectif est statique et n'entraîne pas de distorsion du faisceau en sortie d'objectif. Cette solution a déjà fait ses preuves dans l'industrie de la microscopie, puisque cette solution a été intégrée avec succès par Leica dans le confocal SP5.

Notre système comportera donc un système de scanner pré-compensateur de pupil shift, couplé à un relais optique de grandissement $G=1$. L'étude et le dimensionnement de ce système sera explicité dans la suite du manuscrit.

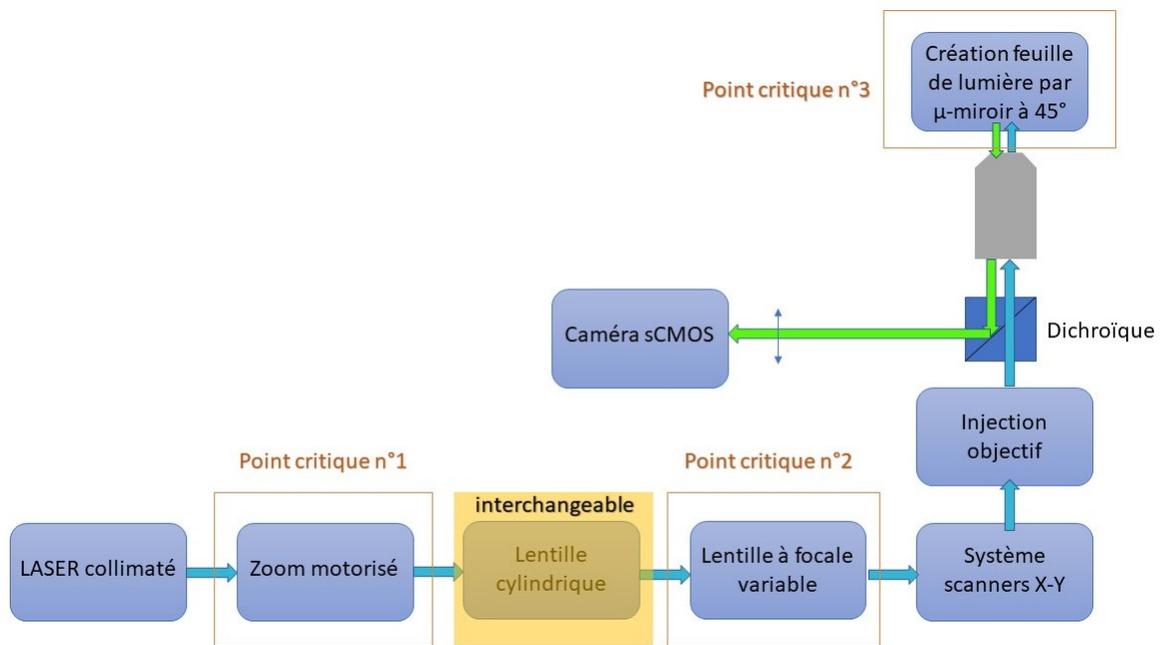
2.2.1.3 Point critique numéro 3 : sélection spatiale par pinhole

Le signal de fluorescence sera récolté sur un compteur de photons uniques de marque Excelitas, avec une taille de détecteur de $180\mu\text{m}$. Afin de récolter la fluo-

cence de manière la plus efficace possible, le constructeur Excelitas nous recommande d'utiliser une fibre multimode de $100\mu\text{m}$, que nous avons choisi de la marque Thor-Labs avec une $\text{NA}=0,22$ afin d'avoir un cône de collection des photons le plus large possible. Le signal de fluorescence recolté après sélection spectrale par un dichroïque sera spatialement filtré dans le plan de Fourier grâce à une première lentille plano-convexe utilisée pour focaliser le faisceau. Dans ce plan, un pinhole dont le diamètre sera dimensionné au système optique sera positionné dans le plan de Fourier et sera ajustable en X-Y et Z grâce à des montures translationnelles. Le signal ainsi filtré spatialement sera injecté dans le coeur de la fibre grâce à des optiques adaptées afin de faire coïncider les ouvertures numériques.

2.2.2 Mode feuille de lumière

Le schéma optique du mode feuille de lumière est semblable à celui du mode confocal, à quelques exceptions près : rajout d'un zoom motorisé pour modifier le diamètre du faisceau, d'une lentille cylindrique pour focaliser le faisceau dans un seul axe, et d'une lentille à focale variable pour modifier l'allure du front d'onde dans le plan de la pupille arrière de l'objectif. L'utilisation du mode feuille de lumière nécessite également la fabrication de puce silicium permettant le repliement du faisceau perpendiculairement à l'axe optique grâce à la gravure de miroir à 45°.



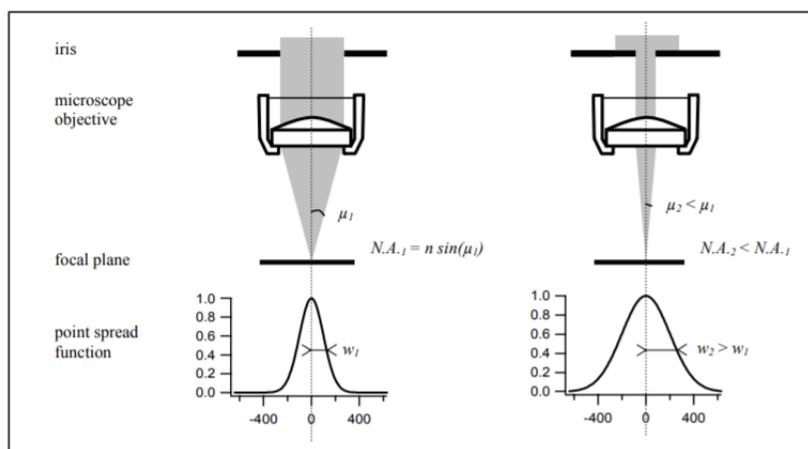
Les flèches vont dans le sens du trajet de la lumière dans le microscope.

FIGURE 2.8 – Schéma bloc de notre mode d'illumination feuille de lumière

2.2.2.1 Point critique numéro 1 : fabrication d'un « zoom » motorisé

Afin de pouvoir changer le diamètre du faisceau sans devoir rajouter des télescopes de grossissements différents sur le trajet optique, nous avons demandé à notre collaborateur Errol de nous faire une étude pour la construction d'un zoom motorisé. Notre première idée a été de prendre un zoom classique manuel, d'ajouter une bague grippante sur l'embout rotatif et de relier cela à un moteur afin que l'on puisse faire tourner la bague de manière automatique, sans toucher au système

optique. Cette idée, qui n'a pas donné suite, a été mise de côté pour plusieurs raisons : (1) l'encombrement du système, (2) des alignements optiques complexes, et (3) problème de conception mécanique pour entraîner la rotation de la bague du zoom. Notre collaborateur nous a donc proposé la solution suivante, inspirée des travaux de Wawrezienieck et al. [151, 150]. Cette solution technique repose sur le principe suivant : afin de changer la taille du faisceau de manière automatique, une iris à diamètre variable est ajoutée juste après la collimation du faisceau LASER dans le système optique. Ainsi, lorsque l'iris est ouvert à son maximum, la pupille arrière de l'objectif est remplie à son maximum, permettant de se placer en condition « *diffraction limited* » afin d'avoir un waist le plus petit possible et une distance de Rayleigh courte (grande ouverture numérique du faisceau). Lorsque l'on diminue la taille de l'iris variable, nous sous-remplissons la pupille arrière de l'objectif, de ce fait, le faisceau en sortie d'objectif à une ouverture numérique plus faible, donc une distance de Rayleigh et un waist plus grands.

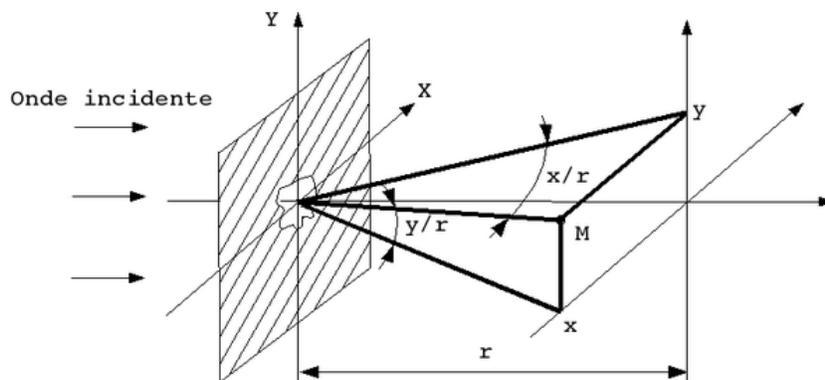


Tiré d'une présentation de Laure Wawrezienieck (2004). Lorsque la totalité de la pupille arrière de l'objectif est remplie, la réponse impulsionnelle, ici la PSF est limité par la diffraction, donc sa taille est la plus petite possible. Moins la pupille arrière est remplie, plus large est la réponse impulsionnelle.

FIGURE 2.9 – Variation du diamètre du faisceau par iris variable

Cependant, diaphragmer un faisceau gaussien de la sorte n'est pas sans conséquence. D'après la théorie de la diffraction de Fraunhofer (voir fig. 2.10), dans le cas d'un objet diffractant placé dans le plan XY éclairé par une onde plane parallèle à

l'axe Oz, l'amplitude complexe de l'onde diffractée à l'infini est proportionnelle à la transformée de Fourier de la transmittance de l'objet diffractant.



L'onde incidente arrive par la gauche. Dans le plan x-y est placée une ouverture diffractante O. Après propagation, l'allure de l'onde à une distance r très supérieure aux dimensions de O, dans la direction z, vaut donc la transformée de Fourier de la transmittance de l'ouverture.

FIGURE 2.10 – Théorie de la diffraction de Fraunhofer

La transformée de Fourier de l'ouverture circulaire de l'iris est donc proportionnelle à une tâche d'Airy (fonction de Bessel d'ordre 1). On s'attend donc à observer une figure de diffraction sur des petites ouvertures de l'iris motorisée. Pour des grandes ouvertures de l'iris, le phénomène de diffraction est négligeable.

D'après le site internet Melles Griot, on peut définir le ratio de troncature T, tel que $T = \frac{D_b}{D_t}$, D_b étant le diamètre du faisceau gaussien à $1/e^2$, et D_t le diamètre de l'ouverture diffractante. Si $T=1$, le faisceau est tronqué à $1/e^2$, et le faisceau en sortie est un hybride entre faisceau gaussien et tâche d'Airy. Si $T>2$, l'allure du faisceau en sortie approche la tâche d'Airy, et si $T<0,5$, le faisceau n'est quasiment pas tronqué, l'allure du faisceau en sortie approche une distribution gaussienne.

Un système de variation du diamètre du faisceau par iris motorisée sera donc développé sur notre prototype, adaptée au dimensionnement de notre système optique. Les désagréments liés au phénomène de diffraction seront observés pour déterminer les limites d'utilisation de l'iris, si besoin. A l'heure actuelle, cette solution reste à notre sens, le meilleur choix, car l'ajout manuel de télescope de différents grossissements reste très fastidieux et nécessitent un ré-alignement à chaque changement. Tandis que les zooms motorisés restent soit très cher, soit non adaptés à nos applications.

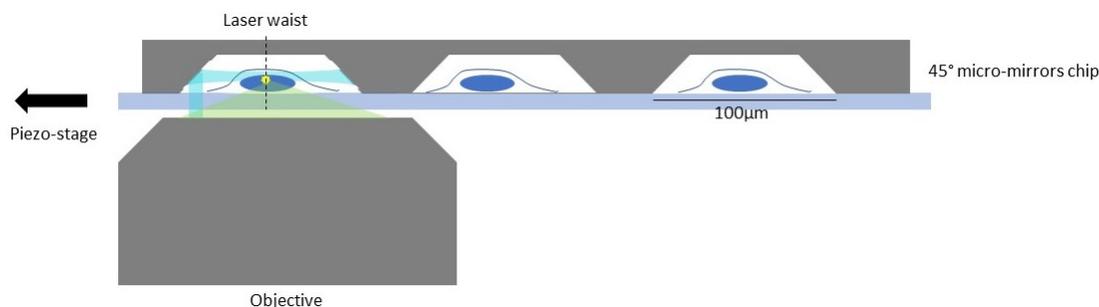
2.2.2.2 Point critique numéro 2 : mise en place d'une lentille à focale variable

Notre mode d'illumination feuille de lumière est semblable à un mode d'illumination confocale d'un point de vue du trajet optique. L'ouverture numérique du faisceau, ainsi que la dimension de son waist et la distance de Rayleigh sont déterminés par (1) l'objectif choisi et (2) l'occupation de la pupille arrière comme décrit précédemment. Classiquement en microscopie la pupille arrière de l'objectif est éclairée par un faisceau collimaté et donc la lumière est focalisée dans le plan focal de l'objectif (distance de travail indiqué sur l'objectif). L'illumination de la pupille arrière par un faisceau légèrement divergent permet d'écarter le point de focalisation de la lentille et donc d'augmenter la distance de travail de l'objectif. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser une lentille à focale variable pour pouvoir ajuster cette distance de travail. Cette solution est celle précédemment retenue dans le montage So-SPIM également [50]. Les lentilles à focale variable de chez Optotune fonctionnent de la manière suivante : les lentilles sont faites d'un polymère élastique particulier qui lorsque qu'on lui applique un courant modifie le rayon de courbure de son dioptré, ce qui a pour conséquence de changer la distance focale. La puissance optique (en dioptrie), inversement proportionnelle à la distance focale, est proportionnelle au courant apporté. De cette manière, contrôler de manière précise le courant fourni à la lentille revient à contrôler la distance focale en temps réel. Il est possible d'asservir la lentille variable avec des fonctions de courant (rampe, sinusoïde) afin d'observer une oscillation périodique du point focal en sortie d'objectif.

Notre système optique disposera donc d'une lentille à focale variable. Lorsque la lentille sera non effective, c'est à dire, à vergence nulle, le faisceau sera parallèle en pupille arrière de l'objectif et en sortie d'objectif le faisceau focalisera à distance de travail. Lorsqu'elle sera active, on observera une divergence et/ou convergence du faisceau en BFP fonction de la distance de focalisation en sortie d'objectif choisie et en sortie d'objectif, le faisceau focalisera respectivement après ou avant la distance de travail.

2.2.2.3 Point critique numéro 3 : fabrication de micro-miroirs à 45° pour repliement du faisceau

Notre mode d'illumination en feuille de lumière fonctionne avec des micro-miroirs orienté à 45° pour replier le faisceau perpendiculairement à l'axe optique comme explicité figure 2.11.



L'excitation LASER est décrite en bleu : le faisceau est replié grâce à la réflexion sur les miroirs à 45°. Le waist intercepte l'échantillon par la tranche. Les fluorophores ainsi excités vont émettre et les photons sont collectés dans l'ouverture numérique de l'objectif.

FIGURE 2.11 – Description des micro-miroirs à 45° pour le repliement du faisceau en feuille de lumière

Afin de simplifier au maximum les étapes de fabrication en salle blanche pour des raisons de temps de fabrication et de coût, nous avons décidé de réaliser un système de micro-miroirs réutilisable et facile à produire, à venir déposer directement sur les cellules. Les micro-miroirs seront réalisés sur des puces en silicium de 10 par 10 mm, chaque puce étant constituée de 10 puits rectangulaire de 10mm de long et 100µm de large. Le matériau à privilégier sera le silicium et contrairement à Galland et al. nous souhaitons éviter l'étape de métallisation par de l'argent (qui est cytotoxique) ou de l'or (moins bon réflecteur dans nos longueurs d'onde). Nous envisageons donc de graver à même le silicium les miroirs à 45° en optimisant la composition du bain de gravure au maximum afin d'obtenir des flancs les plus lisses possible (limitation des résidus de gravure) pour éviter les réflexions diffuses qui distordraient la feuille de lumière.

Le mode feuille de lumière sera disponible sous la forme statique grâce au positionnement d'une lentille cylindrique dans le trajet optique, mais également sous la forme balayage (ou scanning) grâce aux miroirs galvanométriques.

2.2.3 Mode TIRF/HiLo

Concernant la mise en forme du faisceau pour le mode HiLo/TIRF, le but est de venir focaliser le faisceau dans le plan focal arrière de l'objectif contrairement aux modes précédents. L'inclinaison du faisceau en sortie d'objectif dépend du décalage du point focal dans le BFP. Les scanners galvanométriques présents dans les modes CLSM et feuille de lumière seront utilisés pour cette tâche. Nous devons veiller à dimensionner le système pour que le décalage du faisceau en BFP soit assez grand pour pouvoir atteindre l'angle critique, sachant que nous utiliserons un objectif spécial TIRF 100x (NIKON, oil, NA=1,49) avec une pupille arrière de 8mm.

Afin de pouvoir ajuster l'épaisseur du faisceau en HiLo, nous utiliserons le système de zoom motorisé par iris variable.

2.2.4 Choix des composants techniques

2.2.4.1 Banc LASER

Pour des raisons de simplicité, les différentes sources LASER seront injectées dans le dispositif optique via une fibre optique monomode à maintien de polarisation (fibre FUKUJIRA PM diamètre de coeur 3,5 μ m, NA=0,11). Notre banc LASER est un Compact Laser Combiner L6Cc (Oxxius, Lannion, France) muni de quatre LASER : 405nm (100mW - réf LBX-405-100-CSB-OE-900 - Oxxius, Lannion, France), 450nm (50 mW - réf BDS-450-SM - Becker, Berlin, Germany), 488nm (50 mW - réf BDS-488-SM - Becker, Berlin, Germany) et 561nm (200 mW - réf LCX-561L-200-CSB-OE-900 - Oxxius, Lannion, France).

2.2.4.2 Capteur - Caméra

Pour les microscopies « champ-large » qui nécessitent l'utilisation d'une caméra (HiLo, TIRF, feuille de lumière), une caméra PCO.EDGE 4,2 scientific CMOS Camera Link sera utilisée. Cette caméra a été choisie pour la cadence d'images (frame rate) élevée de 100fps en full chip (2048*2048px), sa taille de pixel de 6,5 μ m qui permet un bon échantillonnage de la PSF avec un objectif x100 sans rajouter de lentille supplémentaire, ainsi que son rendement quantique assez élevé de 82%, qui permet l'imagerie d'émetteur unique comme en SPT.

Pour la microscopie confocale qui réceptionne le signal de fluorescence par un capteur mono-point, un module compteur de photon unique a été choisi. Il s'agit d'un module compteur de photons de marque Excelitas référence SPCM-AQRH-13-FC. Il a été sélectionné pour sa résolution temporelle entre deux photons détectés de 350ps, son faible bruit de fond de maximum 250 coûts/seconde, et son efficacité quantique $>70\%$.

2.2.4.3 Cartes de commande et d'acquisition

Pour réaliser la commande et l'acquisition des signaux nous aurons besoin de 2 cartes DAQ :

- Une carte NI 6353 (Sample rate 1,25MS/s, 32 AI, 48 DIO, 4 AO) utilisée pour l'asservissement des scanners via les sorties analogiques, ainsi qu'à l'acquisition des données issues de la SPAD via une entrée analogique.
- Une carte DAQ MCC 3101 (100Hz, 8 AO), plus lente, qui contrôlera les LASERS (ON/OFF + intensité) et l'optotune via des sorties analogiques.

2.2.4.4 Statif de microscope

Le statif de microscope qui nous servira pour notre phase de caractérisation est un Eclipse TE2000-E de la marque Nikon (NIKON, Japan). Les objectifs utilisés pour le mode TIRF et HiLo sont des objectifs à grande ouverture numérique : x100, oil, NA=1,49 et x60, oil, NA=1,49 (NIKON, Japan). Pour les modes CLSM et feuille de lumière, nous utiliserons des objectifs : Plan Apo 40x NA=1 (NIKON, Japan). Le dispositif est adapté avec une platine PIEZOCONCEPT Z-insert (travel range =100 μ m).

Notre prototype se veut adaptable pour différents types de statif de microscope. Pour cela, notre collaborateur Errol prévoit de créer des embouts interchangeable selon la marque et les standards utilisés, afin de relier le système optique au bâti du microscope. La lentille de tube du microscope sera remplacée par une lentille plus adaptée à nos longueurs d'onde et de meilleure qualité, selon les conseils de Errol. Cette dernière sera intégrée au prototype.

Le prototype s'intégrera au statif par l'arrière et sera fixé par des vis.

2.2.5 Contrainte de dimensions et de poids

Le dispositif devra être compact et le plus petit possible (dimension type 40x40x40cm), avec possibilité de repliement du faisceau sur plusieurs étages. Les trajets optiques des différents modes pourront être concatenés. Le prototype devra être le plus léger possible car il sera fixé au statif par uniquement 4 vis. Nous veillerons à ce que le poids du dispositif n'entraîne pas de torsion au niveau de la fixation.

Afin de combiner les trajets optiques des trois modes et gagner de l'espace, nous intégrerons une bifurcation optique motorisée (miroir monté sur un rotor contrôlable par un bouton ON/OFF). De cette manière le mode TIRF/HiLo sera combiné aux modes confocal et feuille de lumière qui sont identiques par l'ajout d'une lentille supplémentaire.

2.3 Cahier des charges - logiciel de pilotage et d'acquisition du dispositif

Afin de piloter les trois différents modes du prototype StellarScan et d'acquérir les différents signaux, nous avons décidé de développer notre propre logiciel en langage LabView. Pour cela, l'étude et l'écriture des spécifications ont été réalisées par mes soins, et l'étape la réalisation informatique a été confiée à la société Styrel pour des raisons de moyens humains, mais aussi pour avoir une robustesse du logiciel de qualité industrielle.

Ce logiciel, appelé ScanVision, permet plusieurs fonctions :

- Piloter l'intégralité du système (prototype optique + banc LASER),
- Acquérir le signal confocal issu de la SPAD et le reconstruire
- Contrôler les paramètres caméra et acquérir le signal
- Enregistrer les données en format .TIFF avec un fichier métadonnée correspondant
- Effectuer des fonctions simples de transformation de l'image (ROI, changement de LUT, contraste...)

2.3.1 Exigence technique : interfaçage prototype/PC

2.3.1.1 Schéma fonctionnel du système complet

Le schéma fonctionnel du système est explicité comme suit (voir fig. 2.12) :

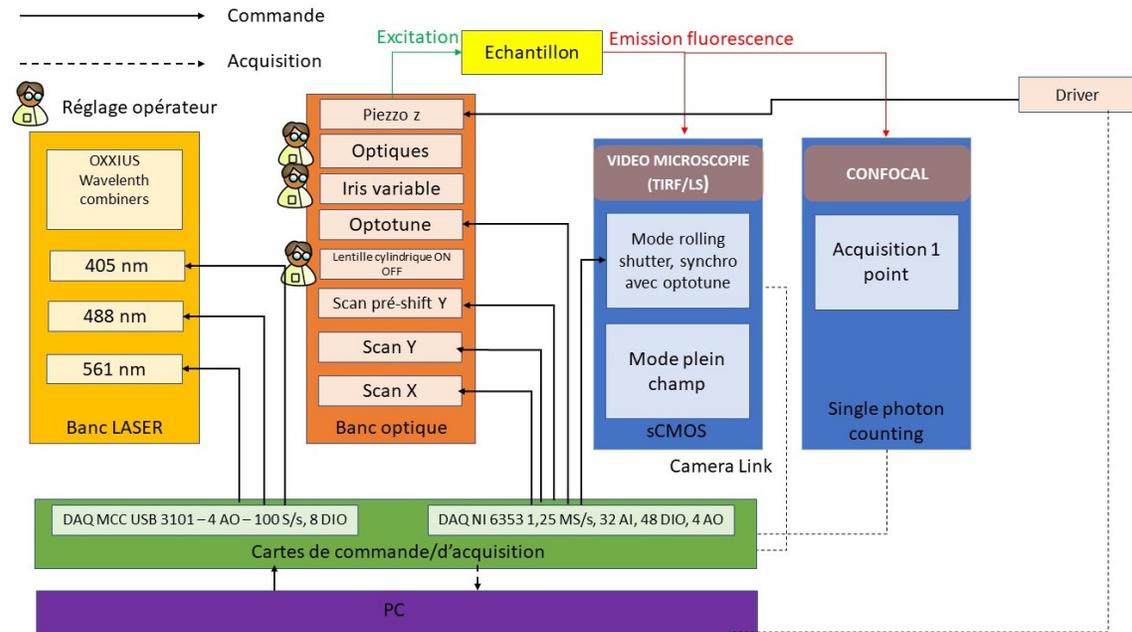


FIGURE 2.12 – Schéma fonctionnel du système complet

Le logiciel ScanVision, pour des raisons de simplicité devra présenter à l'utilisateur 4 modes différents :

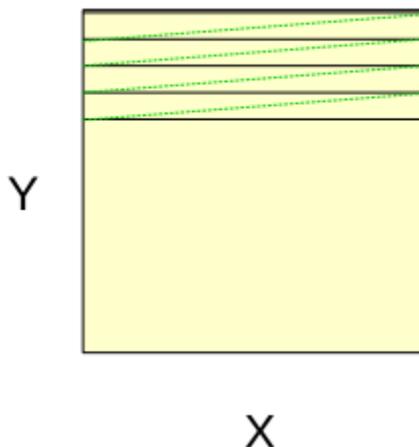
- CLSM
- Feuille de lumière
- Feuille de lumière rolling shutter
- HiLo/TIRF

Ainsi pour chaque mode d'illumination, le logiciel par lui-même activera ou non les liaisons avec le matériel concerné.

2.3.1.2 Mode CLSM

Pour piloter le mode confocal, nous utilisons la méthode de balayage point par point appelée GPSCAN développé par Ferrand et al. [43] de l'Institut Fresnel. Cette

méthode repose sur un scan ligne par ligne (ou *raster scan*) de l'échantillon comme suit :



En vert est décrit le retour du faisceau LASER pour une autre ligne de balayage.

FIGURE 2.13 – Méthode de scan ligne par ligne pour le mode CLSM

GPSCAN permet de paramétrer simplement le balayage laser en trois temps :

- Calibration préalable par les *VoltageFactors* (en X et Y) qui déterminent la relation entre la distance parcourue par le LASER et les tensions appliquées aux scanners (dépendant du système optique)
- Renseignement des paramètres temporels : le *pixel dwelltime* qui est le temps passé par pixel et le *low time* qui est le temps autorisé entre deux pixels.
- Renseignement des paramètres spatiaux : Nombre de pixels en X , Nombre de pixels en Y , taille du champ balayé en X , taille du champ balayé en Y

Avec ces paramètres, GPSCAN calcule ensuite une matrice de points contenant les valeurs de tension à injecter dans les scanners X et Y et qui correspondent physiquement à la position prise par le scanner au cours du temps.

La commande ainsi réalisée, il faut maintenant acquérir le signal et le reconstruire en temps réel. Le signal confocal étant récupéré par un capteur type compteur de photons mono-point, il faut donc redécouper le signal en matrice de pixels de taille (i, j) correspondant à la commande comme suit :

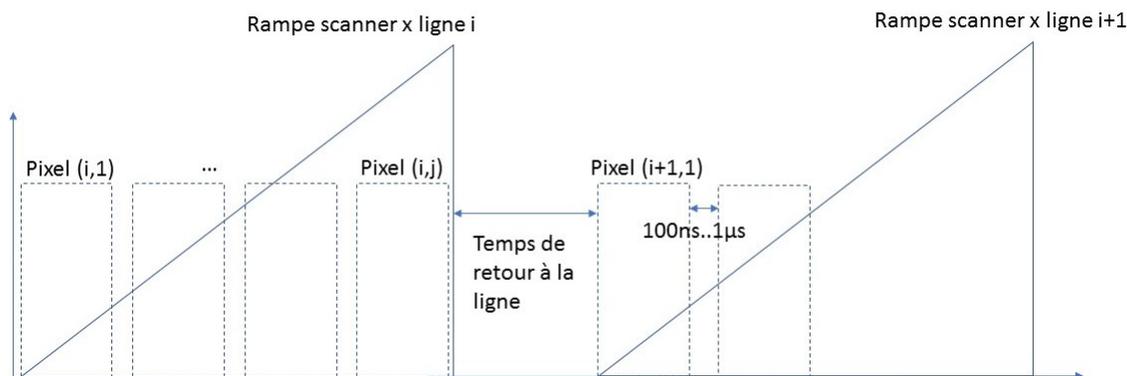


Schéma temporel de la reconstruction du signal en confocal. Lors de la rampe de tension, le scanner effectue un aller. Cet aller, ou ligne se décompose en pixel de taille choisi par l'utilisateur. Il est également possible de mettre un temps d'attente entre chaque pixel. Le temps de retour à la ligne peut être négligable si on traite des petits champs de vue.

FIGURE 2.14 – Reconstruction du signal en mode CLSM

Selon le *pixel dwelltime* (+ éventuellement le *low time*) multiplié par le nombre de pixel en X, GPSCAN calcule le temps de montée de la rampe de tension et crée une forme d'onde qui est envoyée aux scanners. S'en suit le retour à l'origine des scanners qui se fait généralement sur un temps court par rapport au temps de montée. Les photons issus de la fluorescence récupérés en simultané par la photodiode sont regroupés selon leur temps d'arrivée et placés dans une matrice sous forme de pixels.

Cette technique malgré sa robustesse et son efficacité reste des plus basiques dans le monde des microscopes confocaux. En pratique, on observe des artefacts sur les toutes premières rangées de pixels dûs aux retours à la ligne. En effet, le temps de retour à la ligne n'est pas toujours négligeable par rapport au temps de montée de la rampe de tension, cela dépend des paramètres de balayage. De ce fait, lors du retour à la ligne, le détecteur continue d'enregistrer les photons et les enregistre dans les premiers pixels de la ligne suivante. Cet artefact, bien connu des microscopistes, peut-être évité notamment en faisant un balayage dit « aller-retour », mais plus complexe en terme de traitement des données.

Il est évident que cette technique n'est pas au niveau de l'état de l'art d'un point de vue pilotage, mais elle est suffisante pour nos besoins, c'est-à-dire, réaliser une image confocal pour cibler les cellules et réaliser des mesures FCS.

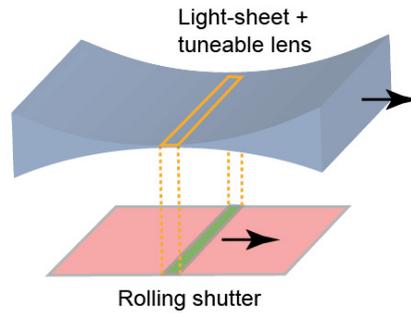
2.3.1.3 Mode feuille de lumière

Concernant le pilotage des scanners pour le mode feuille de lumière, il faut séparer nos deux configurations 'statique' avec la lentille cylindrique, ou 'scanning' avec un balayage LASER numérique.

- En mode statique, nous chercherons juste à pouvoir déplacer le faisceau en X et Y pour pouvoir le placer de manière précise sur les flancs des miroirs. Pour cela, une simple commande de tension est nécessaire sur les scanners. Si la feuille de lumière créée par la lentille cylindrique n'est pas parfaitement perpendiculaire à l'axe optique, il suffira simplement de faire tourner la lentille sur elle-même jusque satisfaction de l'opérateur.
- En mode scanning, nous chercherons à avoir un balayage en Y, qui sera le scanner le plus rapide, et aussi le scanner qui sera corrigé pour le pupil shift pour plus de précision. L'opérateur aura donc le choix de la largeur de la feuille de lumière à balayer, ainsi que de la vitesse de balayage. D'un point de vue informatique, l'asservissement des scanners se fera sous la forme d'un *raster scan* sur le même principe que le mode confocal. Il se peut que la feuille de lumière paraisse légèrement inclinée à l'écran de la caméra : elle n'est pas parfaitement horizontale. Pour pallier ce problème, nous intégrerons dans le logiciel un correcteur d'assiette numérique, qui permet d'activer le scanner X fonction du scanner Y et ainsi annuler l'angle, ce qui permet d'aplanir la feuille de lumière.

Concernant l'acquisition du signal, nous avons deux possibilités :

- Acquisition full-chip classique, avec possibilité d'effectuer des ROI (Region Of Interest)
- Acquisition en rolling shutter. Cette technique permet de paramétrer l'ouverture roulante de la caméra sur un nombre défini de lignes, à une vitesse choisie par l'utilisateur. L'idée est de synchroniser le déplacement du waist de la feuille de lumière sur l'ouverture roulante afin d'acquérir uniquement la fluorescence issue de la partie la plus fine de l'illumination. Pour cela, la caméra PCO EDGE 4.2 nous propose différents modes de rolling shutter dont le « single top down » qui permet une ouverture unilatérale du haut vers le bas sur tout le capteur.



L'ouverture des lignes de pixel de la caméra se superpose de manière synchronisée avec le waist du LASER. Uniquement les photons issus du waist LASER sont donc enregistrés.

Source : mesospim.org

FIGURE 2.15 – Principe du rolling shutter appliqué à la microscopie par feuille de lumière

Afin de réaliser le mode rolling shutter, il faut synchroniser l'ouverture roulante de la caméra sur le déplacement du waist, et pour cela, il faut que la caméra et la lentille à focale variable soit synchronisées sur le même signal trigger comme décrit figure 2.16 :

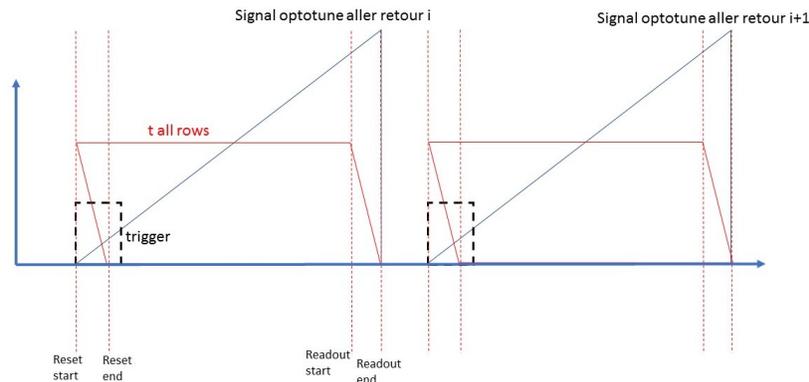


Schéma temporel de la synchronisation entre l'optotune (qui fait translater le waist) avec le rolling shutter. Le signal en tension envoyé dans le rolling shutter est une rampe. En rouge est représenté pour toutes les lignes de la caméra, le temps où la ligne va se réinitialiser, finir son initialisation, commencer sa lecture et finir sa lecture. Le trigger, ici en noir, déclenche le signal rampe de l'optotune, et l'initialisation de la première ligne de la caméra.

FIGURE 2.16 – Synchronisation du rolling shutter avec la lentille tunable

Le logiciel devra paramétrer les signaux trigger à envoyer à la carte MCC selon les paramètres utilisateurs. La carte MCC est maître de la caméra et de l'optotune, et lorsqu'elle reçoit le trigger, la caméra commence l'ouverture roulante en parallèle de l'activation de optotune qui reçoit un signal rampe synchronisé. Cette étape nécessitera une étape de calibration, car nous avons deux éléments à synchroniser qui sont chacun limités sur certaines plages d'utilisation. L'optotune supporte mal les signaux d'asservissement à une fréquence trop rapide, tandis que la caméra fonctionne mal sur des synchronisations trop lentes (tendance à créer des erreurs lorsque le temps d'attente du signal trigger est trop long).

2.3.1.4 ModeTIRF/HiLo

Ce mode est le plus simple à implémenter d'un point de vue informatique. Son pilotage réside uniquement dans un déplacement lent des scanners X Y géré par l'utilisateur. Des simples rampes de tensions sont à prévoir. Concernant l'acquisition du signal, il se fera par la caméra sCMOS en mode d'acquisition full chip.

2.3.2 Exigence technique : fonctionnement global du logiciel

2.3.2.1 Différents niveaux d'utilisation

Le logiciel prévoit différents niveaux d'utilisation. Un niveau expert avec une fenêtre de calibration avec la possibilité de changer les voies d'attributions des différents items sur les deux cartes, les tensions minimale et maximale pour chaque mode d'illumination, les facteurs correctifs de la correction d'assiette de la feuille de lumière. Le niveau expert aura la possibilité d'avoir accès à l'intégralité du système. L'autre niveau, le niveau opérateur, plus simple sera une version sans accès à la fenêtre calibration, et permettra une utilisation facilitée du logiciel.

2.3.2.2 Fonctionnement des modes d'illumination

Afin d'éviter les conflits entre les différents items, le logiciel fonctionnera de la manière suivante (voir fig. 2.17).

Lorsque l'utilisateur fera son choix d'illumination, le prototype se remettra parfaitement à zéro, faisceau position (x_0, y_0) , optotune à zéro. Ensuite, on lancera le mode LIVE afin de tester les paramètres d'illumination, et d'acquisition du signal. Une fois

les paramètres choisis, il sera possible de les transférer au mode ACQUISITION afin de lancer simplement l'acquisition des données sans redéfinir les paramètres. Une fois l'acquisition terminée, une fenêtre pop-up apparaîtra et suggérera d'enregistrer les fichiers en .TIFF avec un fichier métadonnée associé.

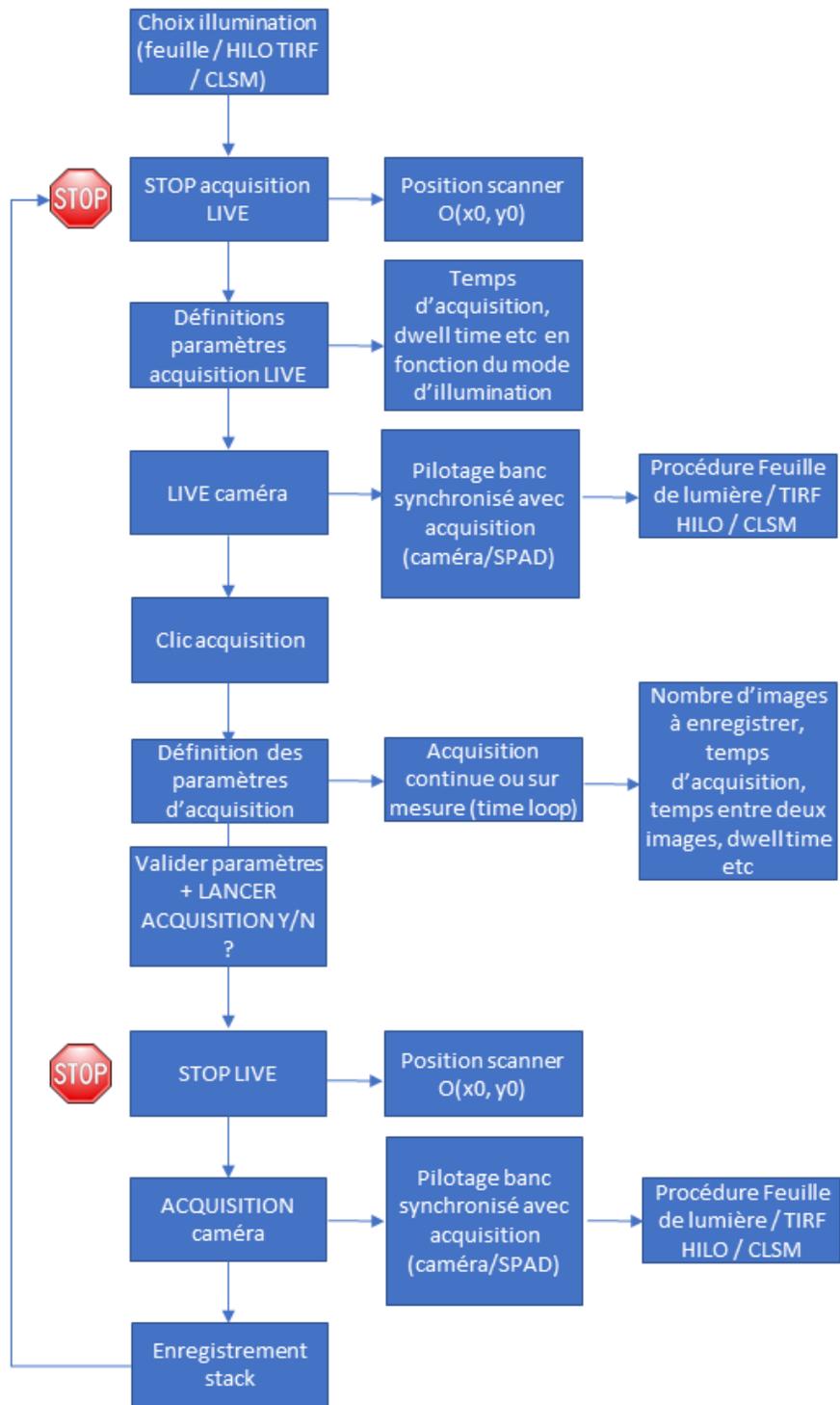


FIGURE 2.17 – Schéma fonctionnel du logiciel

Chapitre 3

Dimensionnement - CAO optique

3.1 Dimensionnement du prototype

3.1.1 CLSM

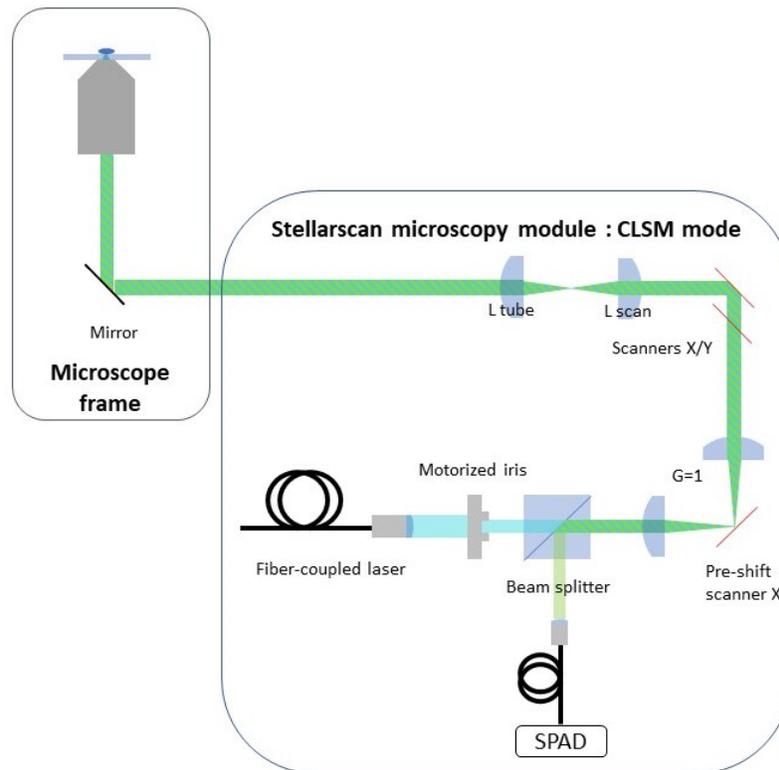
Il existe différents types de configuration confocale. Pour valider notre cahier des charges, nous nous avons choisi de travailler avec le schéma suivant (voir fig. 3.1).

Le premier relais optique sera de grandissement égal à 1. Pour des raisons d'encombrement nous avons choisi des lentilles THORLABS (AC254-050-A) de focale 50mm. Pour des raisons d'intégration au système, la lentille de tube du statif de microscope sera remplacée par une focale $f=250\text{mm}$ (réf : THORLABS AC254-250-A). Le grandissement de notre objectif NIKON Plan Fluor x40 1.0 NA est calculé pour une focale de tube de 200mm, car c'est un standard chez NIKON. Comme nous changeons volontairement la lentille de tube, nous devons recalculer le grossissement réel de l'objectif. Sachant que la focale de l'objectif vaut 5mm, $G = \frac{F_{tube}}{F_{obj}} = \frac{250}{5} = 50$. Le grossissement réel de notre objectif est donc de 50x.

Comme détaillé dans le cahier des charges, dans notre système la taille des miroirs scanners limite notre taille de faisceau à 7mm sur les scanners. Il faut donc que le relais optique Lscan-Ltube donne un grossissement d'au moins 1,4 pour remplir notre pupille arrière. Pour cela, nous avons choisi une lentille de focale de 125mm, et de cette façon $G=1,67$.

Calculons la taille du champ théorique que nous pouvons avoir sur l'échantillon avec une telle configuration.

Si notre faisceau fait 7 mm sur les scanners, le décalage $\Delta x'$ autorisé dans le plan



En bleu est représentée l'excitation LASER, en vert l'émission de fluorescence. Le faisceau d'excitation est collimaté en sortie de fibre avec une lentille placée à distance focale, un diaphragme motorisé permet de diminuer la taille du faisceau LASER si besoin. Le faisceau est ensuite transmis par un beam splitter, est focalisé sur le scanner pré-compensateur, puis re-collimaté, passe par le système de scanners X-Y, puis par un dernier télescope pour adapter la taille du faisceau, avant d'être injecté dans le plan focal arrière de l'objectif. L'émission fait le chemin inverse avant d'être réfléchi sur le beam splitter et focalisée dans le détecteur (SPAD).

FIGURE 3.1 – Schéma de notre mode CLSM

focal entre les lentilles de scan et de tube est de : $= \frac{\text{diamètre.lentille}}{2} - \frac{\text{diamètre.faisceau}}{2} = \frac{2,54}{2} - 0,35 = 0,92\text{cm}$

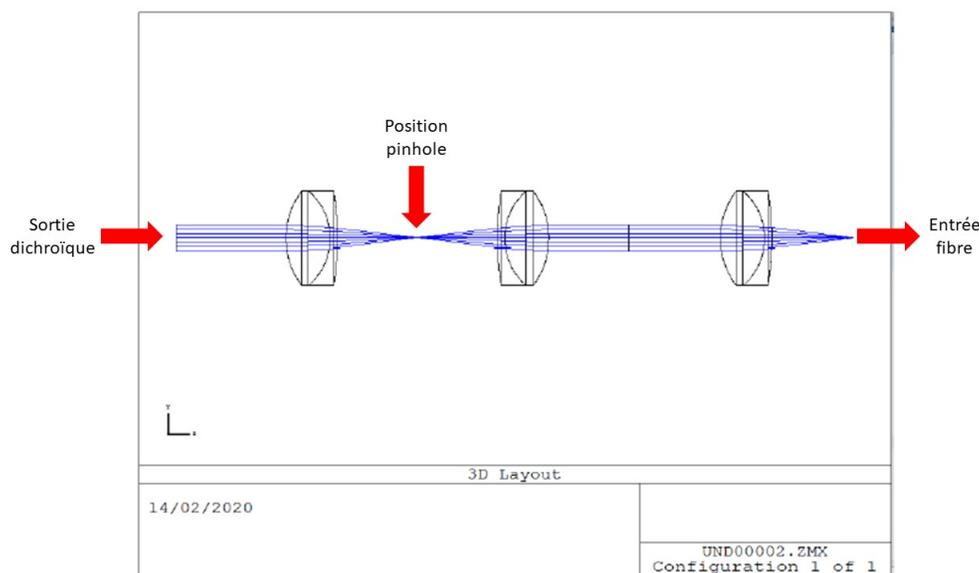
Ce décalage reporté sur l'échantillon vaut donc : $\Delta x = \frac{9200\mu\text{m}}{50} = 184\mu\text{m}$. Cela nous donne un champ total de $368\mu\text{m}$ au maximum.

L'angle d'attaque du faisceau dans le plan arrière de l'objectif vaut $\arctan\left(\frac{\Delta x}{F_{obj}}\right) = 2,10^\circ$. Ce qui équivaut à un angle de scan de : $\frac{F_{scan}}{F_{tube}} \arctan\left(\frac{\Delta x}{F_{obj}}\right) = 1,05^\circ$.

Nos scanners ScannerMax Compact 506 ont une vitesse de balayage de 520Hz pour des angles de 1° . Pour une image d'environ $512*512$ pixels, le balayage LASER

prendra donc environ 1 seconde.

Concernant la détection confocale, nous avons décidé de réaliser un montage à 3 lentilles comme suit :



Modélisation Zemax de la détection confocale. Les modèles de lentilles utilisées correspondent aux standards de ThorLabs AC254-035-A. Le faisceau collimaté fait 7mm de diamètre. Permet notamment de mesurer théoriquement les dimensions du point focal, à la position du pinhole, ou à l'entrée de la fibre.

FIGURE 3.2 – Modélisation détection confocale

Pour des raisons d'encombrements, nous avons décidé de prendre des lentilles avec des focales courtes de 35mm pour réaliser ce montage. Ainsi en sortie du miroir dichroïque, le faisceau est descanné par retour inverse du chemin optique, et collimaté, sa taille est donc de 7mm maximum. Une première lentille est donc utilisée pour focaliser le faisceau pour le filtrer spatialement. Afin de déterminer quelle était la taille de pinhole à utiliser pour le filtrage, j'ai réalisé une modélisation avec les paramètres réels des lentilles que nous allons utiliser (AC254-035-A). Dans le plan focal, je trouve une valeur du faisceau (*RMS spot size*) de 58 μ m. Le pinhole doit donc faire au minimum 58 μ m de diamètre. Cependant avec des lentilles à courtes focales comme celles-ci, j'observe sur les modélisations des aberrations sphériques, les rayons de courbure de la lentille étant élevé, par rapport à un faisceau de 7mm, les conditions paraxiales ne sont plus valides.

Nous aurions pu changer et prendre des lentilles avec des focales plus grandes pour être plus à l'aise, et moins sujets aux aberrations, cela dit, nous avons des contraintes mécaniques assez élevées : la détection confocale sera montée sur un système de cage et fixée par un seul côté. Si la longueur des tiges est trop importantes, le poids peut faire basculer le système, d'où l'intérêt d'avoir une détection confocale la plus courte possible. Autrement, il faudrait trouver un moyen de fixer sur la table avec des pieds la détection confocale, afin de pouvoir choisir des lentilles avec des focales plus longues.

Le point focal à l'entrée de la fibre vaut $21\mu\text{m}$, ce qui est adéquat pour une fibre de $100\mu\text{m}$ $\text{ON}=0,22$.

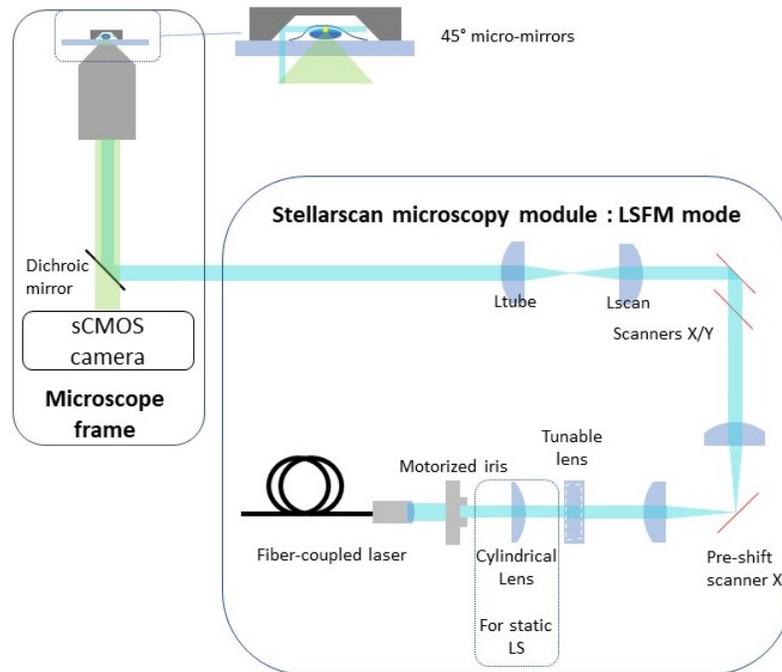
3.1.2 Feuille de lumière

Suivant notre cahier des charges, et comme nos modes feuilles de lumière et confocal sont combinés, le schéma du mode feuille de lumière est décrit comme suit (fig. 3.3).

Le premier relais optique, les scanners et le relais Lscan-Ltube sont fixes ($F_{scan} = 150\text{mm}$ et $F_{tube} = 250\text{mm}$). L'iris motorisée permet de modifier la taille du faisceau en pupille arrière de l'objectif. Nous avons choisi la référence SMARACT SID-18 motorized iris diaphragm (SmarAct, Germany) avec une ouverture maximale de 18mm et une résolution d'ouverture inférieure à $1\mu\text{m}$. L'iris variable est reliée à un bornier sur lequel on peut modifier le pas, et le diamètre de l'ouverture.

La lentille à focale variable est conjuguée au plan focal arrière de l'objectif. Avec un objectif NIKON Plan Fluor x40 1.0 NA, et une focale variable entre $-73,8$ et $+1200\text{mm}$ [139] nous avons une distance de défocalisation en sortie d'objectif de $128\mu\text{m}$, ce qui est nécessaire pour l'imagerie cellulaire.

La lentille cylindrique ($f=150\text{mm}$, ThorLabs), doit être placée stratégiquement pour focaliser le faisceau dans une direction dans le plan focal arrière de l'objectif [139]. Afin de pouvoir régler l'horizontalité de la feuille de lumière, elle sera placée sur une monture rotative.

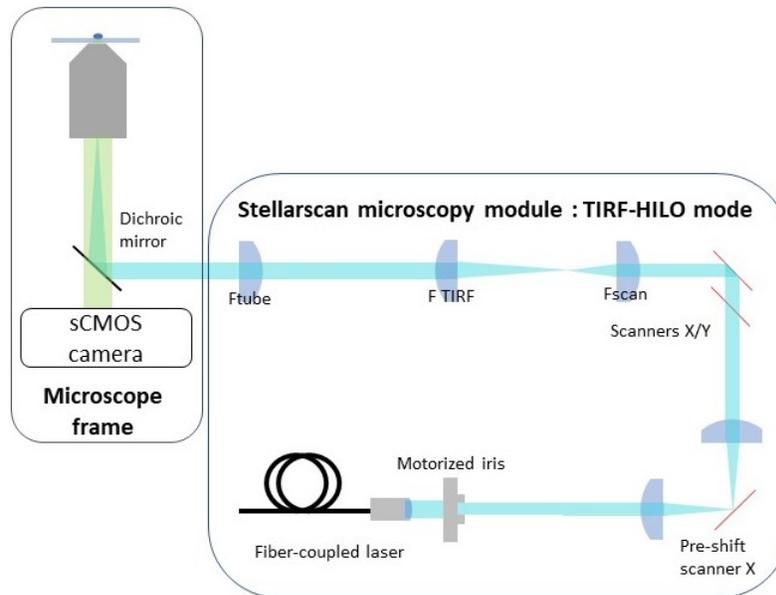


Le schéma n'est pas à l'échelle. En bleu est représentée l'excitation LASER, en vert l'émission de fluorescence. Le faisceau d'excitation est collimaté en sortie de fibre avec une lentille placée à distance focale, un diaphragme motorisé permet de diminuer la taille du faisceau LASER si besoin. Le faisceau ensuite passe par une lentille cylindrique (ou non, selon le mode de LS choisi), passe par une lentille à focale variable, est focalisé sur le scanner pré-compensateur, puis re-collimaté, passe par le système de scanners X-Y, puis par un dernier télescope pour adapter la taille du faisceau, avant d'être injecté dans le plan focal arrière de l'objectif. L'émission fait le chemin inverse avant d'être transmise par le miroir dichroïque et projetée sur une caméra (sCMOS).

FIGURE 3.3 – Schéma de notre mode feuille de lumière

3.1.3 TIRF/HiLo

Le schéma optique du mode TIRF devra reprendre en partie le chemin optique de mode CLSM. A l'aide d'une bifurcation motorisée sous forme de coin de cube, nous pouvons ajouter une lentille dans le chemin optique, le but étant d'avoir un faisceau convergent dans le plan focal arrière de l'objectif comme décrit fig. 3.4.



En bleu est représentée l'excitation LASER, en vert l'émission de fluorescence. Le faisceau d'excitation est collimaté en sortie de fibre avec une lentille placée à distance focale, un diaphragme motorisé permet de diminuer la taille du faisceau LASER si besoin. Le faisceau est focalisé sur le scanner pré-compensateur, puis re-collimaté, passe par le système de scanners X-Y, puis par un dernier télescope pour adapter la taille du faisceau, avant d'être focalisé dans le plan focal arrière de l'objectif. L'émission fait le chemin inverse avant d'être transmise par le miroir dichroïque et projetée sur une caméra (sCMOS).

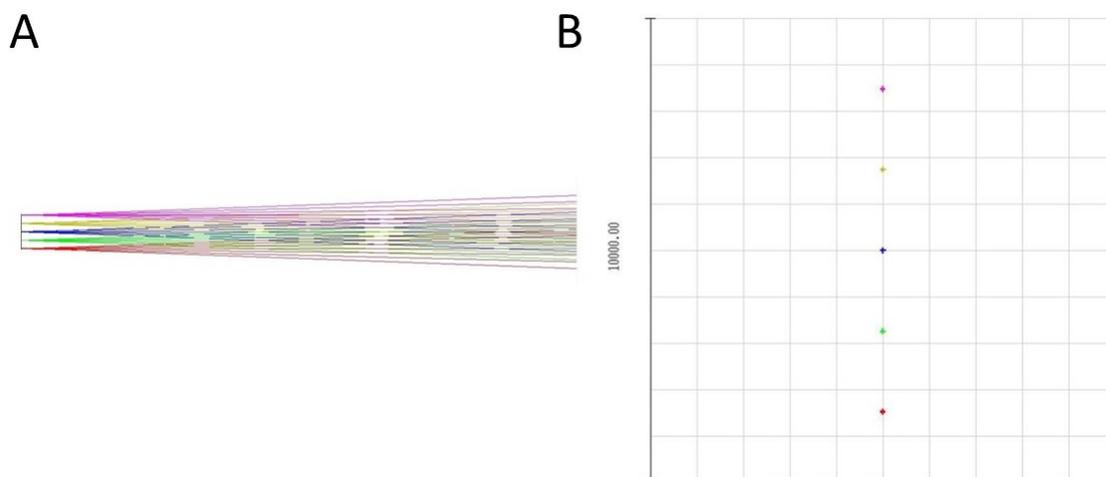
FIGURE 3.4 – Schéma de notre mode TIRF

Pour pouvoir réaliser une illumination TIRF, il nous faut un objectif spécifique à grande ouverture numérique. Nous utilisons donc un objectif TIRF NIKON 100x ON=1,49. Calculons le déplacement maximal nécessaire dans le plan arrière de l'objectif pour pouvoir avoir réflexion totale interne. Sachant que la focale de l'objectif vaut 2mm, que l'indice du milieu vaut 1,33 et que θ représente l'angle d'inclinaison du faisceau par rapport à la normale, le déplacement x maximal dans la pupille arrière

vaut $x = n.f_{obj}.\sin(\theta) = 2,66\text{mm}$. [147]

Pour des raisons d'encombrement, nous avons choisi notre lentille TIRF avec focale 60mm. Nous avons vérifié par modélisation Zemax si notre faisceau pouvait physiquement se déplacer sur $2 \times 2,66 = 5,32\text{mm}$ maximal. Nous avons modélisé pour cela, avec les caractéristiques réelles des lentilles, le déplacement d'un faisceau de diamètre 7mm dans le plan focal arrière de l'objectif. Le chemin optique se compose d'un relais optique de 2 lentilles Thorlabs AC254-050-A, de 2 miroirs orthogonaux l'un de l'autre et orientables, d'un relais optique composé de 2 lentilles de focales 60 et 150 mm (AC254-060-A et AC254-150-A, Thorlabs) avec un grossissement de 2,5, et d'une lentille de tube de 250mm (AC254-250-A, Thorlabs).

Comme nous le montre la figure 3.5, pour des angles maximaux de $\pm 1^\circ$, le faisceau se déplace dans le plan focal de $\pm 7\text{mm}$: ce qui valide notre condition.

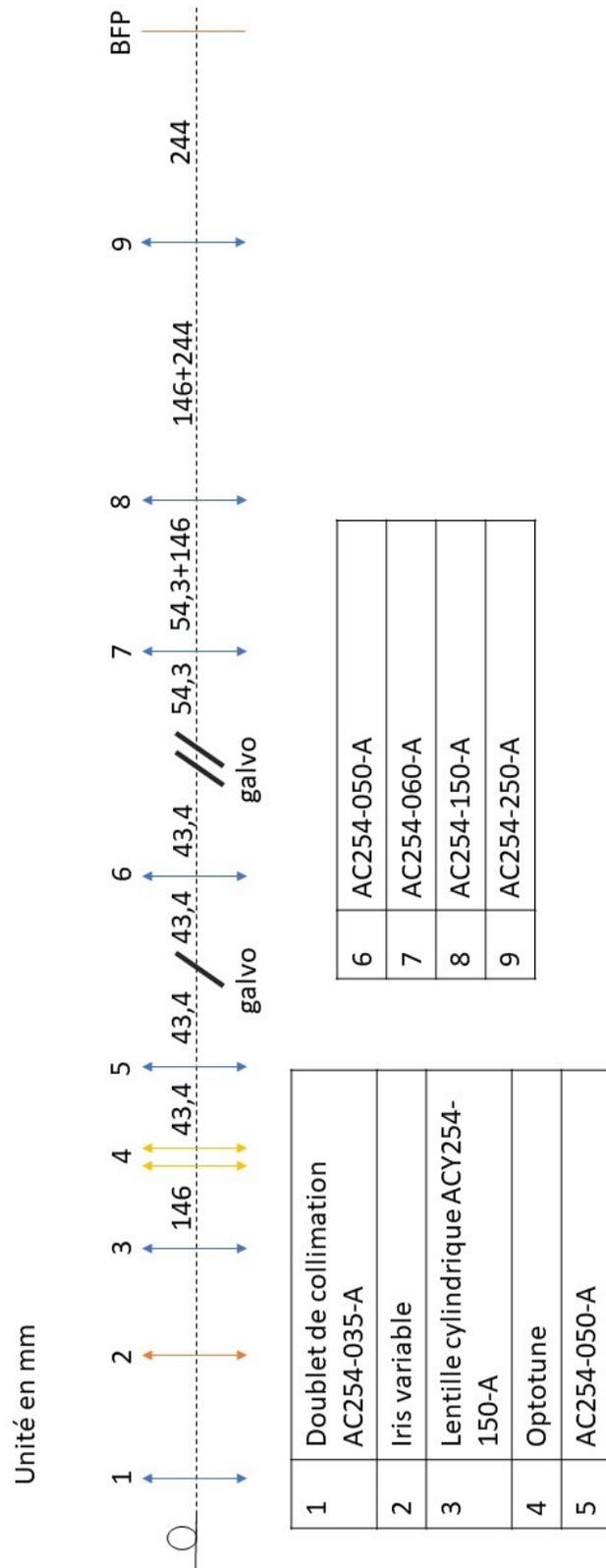


Modélisation Zemax des faisceaux (optique géométrique) dans le BFP de l'objectif. (A) vue orthogonale au BFP. En rose est représenté le faisceau pour un angle de $+1$, et rouge un angle de -1 . (B) vue de face du BFP, l'unité est en μm , un carreau vaut $1000\mu\text{m}$.

FIGURE 3.5 – Déplacement du faisceau en BFP pour la configuration TIRF

3.2 Modélisation du système

Maintenant que nous avons validé les paramètres optiques de notre système, selon le schéma suivant (voir fig.3.6), nous avons décidé de modéliser par Zemax le système optique dans son ensemble afin de déterminer ses caractéristiques optiques réelles. En effet, en optique, un calcul de dimensionnement basé sur l'optique géométrique ne suffit pas à déterminer les caractéristiques attendues d'un système : la structure réelle des optiques (rayon de courbure, façonnage, matériaux) peut amener des aberrations par exemple, ou des différences de trajets pour des longueurs d'onde différentes. Il est toujours bon de savoir en avance les points faibles de son système avant la construction.



Le trajet optique va de la gauche vers la droite. Echelle non représentative.

FIGURE 3.6 – Schéma global du dispositif

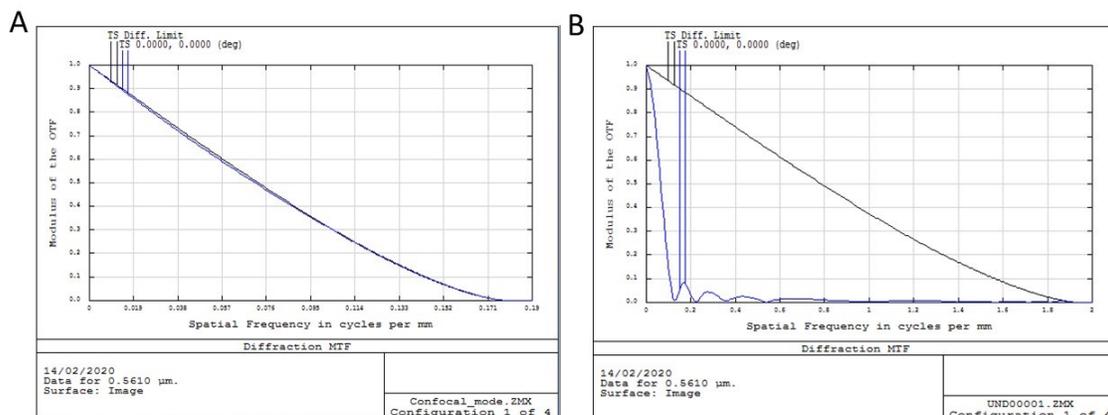
Il est utile de se munir de quelques critères de qualité qui nous permettront de valider la performance du système :

- Etude du « Spot Diagram » : notamment le *RMS radius* (distance moyenne entre le centre du spot et les points en périphérie) ou le *Geometric radius* (distance maximale entre le centre du spot et les points les plus éloignés). On cherchera alors à minimiser le RMS radius dans le cas d'un faisceau focalisé. Ce critère nous servira également à vérifier la taille du faisceau dans certains plans stratégiques du trajet optique.
- Etude des courbes de MTF (Modulation Transfert Function) : la MTF est le module de la transformée de Fourier de la PSF. La MTF nous permet de déterminer les fréquences spatiales transmises par le système optique par un critère dont la valeur varie entre 0 et 1 (MTF=0 la fréquence spatiale n'est pas transmise, MTF=1 la fréquence spatiale est transmise totalement). Zemax nous permet de calculer théoriquement la MTF à la limite de la diffraction, le but étant de s'en rapprocher autant que possible. La fréquence de coupure du système optique en cycles/mm correspond au premier point de l'abscisse pour lequel MTF=0. Cette valeur correspond au nombre de cycles par mm que le système optique peut transmettre, c'est la résolution maximale possible.
- Etude du Wavefront Error RMS par le critère de Maréchal : ce critère postule qu'un système optique soumis à tous types d'aberrations est considéré comme visuellement limité par la diffraction si l'erreur RMS sur le front d'onde est inférieure à $\frac{\lambda}{14} = 0,07\lambda$.
- Etude du diagramme de Seidel : Ce diagramme nous reporte chaque type d'aberrations apportées par chaque dioptré optique (sphérique, coma, astigmatisme, courbure de champ, distorsion, aberrations chromatique axiale et latérale), ainsi que la résultante de ces aberrations dans le plan image.

Le système a été modélisé pour un diamètre de faisceau collimaté maximal de 7mm. Concernant les longueurs d'onde, le banc Oxixus est composé de trois couleurs utiles à nos expériences de dynamique moléculaire (405, 488 et 561nm), ces trois longueurs d'onde seront donc testées. Les vues d'ensemble du montage modélisé (3D Layout) ne seront pas représentées dans cette thèse car peu visibles et peu parlantes : d'où la nécessité de faire des zooms sur le trajet optique.

3.2.1 Caractérisation du chemin optique CLSM/feuille de lumière

D'un point de vue du trajet optique CLSM et feuille de lumière sont identiques mis à part l'ajout de la lentille cylindrique pour le mode statique en feuille de lumière : les deux modes seront donc modélisés ensemble. Si l'on considère un alignement théoriquement parfait (fig.3.7A), on voit que la MTF du système (en bleu) superpose la MTF pour un système limité par la diffraction (en noir). En revanche, si l'on avance la lentille n°6 de 600 μ m (fig.3.7B), on voit que la MTF du système se dégrade énormément : la fréquence de coupure du système optique est réduite à 0,18 cycles/mm au lieu de 1,9 cycles/mm pour un système théoriquement limité par la diffraction.



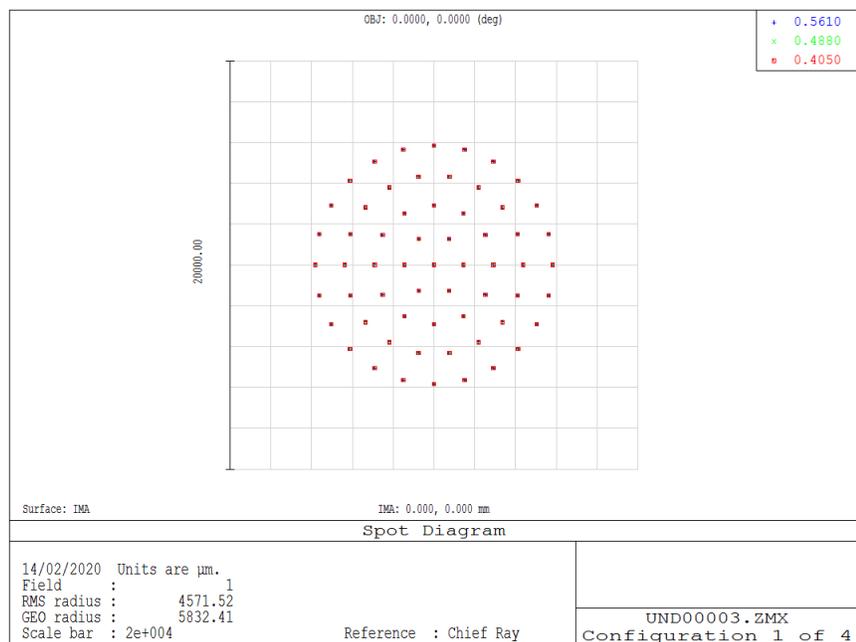
Graphique de calcul de la fonction de transfert de modulation (MTF), simulation Zemax. . En noir est représenté la MTF dans le cas parfait « limité par la diffraction ».

(A) en bleu système parfaitement aligné, (B) en bleu le premier relais optique $f50 :f50$ déréglé de 600 μ m

FIGURE 3.7 – MTF pour l'excitation confocale

De manière générale, il a été montré par modélisation que les distances inter-relais sont extrêmement critiques en ce qui concerne la qualité du système. Il faudra veiller à ce que la seconde lentille de chaque relais soit à la bonne distance et parfaitement conjugué. Cela dit, les conditions expérimentales ne nous permettent pas d'aligner avec une précision allant à la centaine de micromètres, sauf si toutes les lentilles

sont montées sur des platines de précision, ce qui n'est pas possible pour des raisons d'encombrement et de coût.

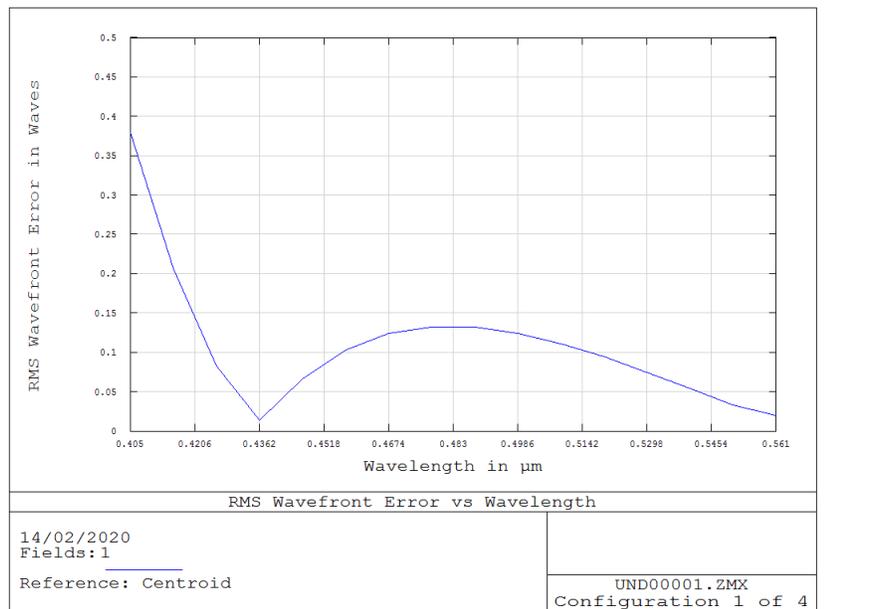


Calcul du spot diagram, qui correspond, dans le contexte de l'optique géométrique, aux positionnements des rayons lumineux issus de la source, dans le dernier plan optique, ici le plan focal arrière de l'objectif. En bleu est représentée la longueur d'onde 561nm, en vert le 488nm et en rouge le 405nm. Simulation Zemax.

FIGURE 3.8 – Spot diagram de l'excitation confocale pour différentes longueurs d'onde

Pour un système correctement aligné, on remarque que les trois faisceaux à 405, 488 et 561nm se superposent parfaitement (fig. 3.8). Le rayon géométrique est à 5832,41 μm ce qui équivaut à un faisceau de diamètre 11,864mm dans le plan focal arrière de l'objectif. Le RMS spot size ce qui correspond au diamètre efficace vaut 4571,52*2=9,143mm ce qui est légèrement inférieur à ce que l'on attendait dans le cas où l'on voudrait sur-remplir la pupille arrière.

Cependant, ce n'est pas parce que nos trois faisceaux de longueur d'onde se superposent d'un point de géométrie que le tour est joué, en effet, lorsque l'on regarde l'erreur RMS sur le front d'onde, on se rend compte que l'allure du front d'onde dans le plan focal arrière est très dépendante de la longueur d'onde (voir fig. 3.9).



Graphique correspondant au calcul de la valeur Wavefront Error RMS pour chaque longueur d’onde entre 405 et 561nm. Simulation Zemax.

FIGURE 3.9 – RMS wavefront error fonction de la longueur d’onde pour l’excitation confocale

Selon le critère de Maréchal (l’erreur RMS sur le front d’onde doit être inférieure à $\frac{\lambda}{14} = 0,07\lambda$ pour que le système soit considéré comme limité par la diffraction), nous remarquons que seules les longueurs d’onde situées entre 428nm et et 444nm, puis au delà de 530nm sont les plus adaptées pour notre système optique, c’est-à-dire que l’erreur RMS est inférieure à 0,07. Seul le front d’onde de notre faisceau à 561nm valide le critère de Maréchal, au contraire, le front d’onde de notre faisceau à 405nm est très dégradé (RMS error=0,38>>0,07) (voir fig. 3.9).

Nous avons également mesuré l’impact de l’inclinaison du faisceau sur l’allure du front d’onde dans le plan pupille arrière :

Angle inclinaison scanner x en degrés	RMS wavefront error
0	0,0194λ
0,5	198λ
1	2302λ
1,5	798λ

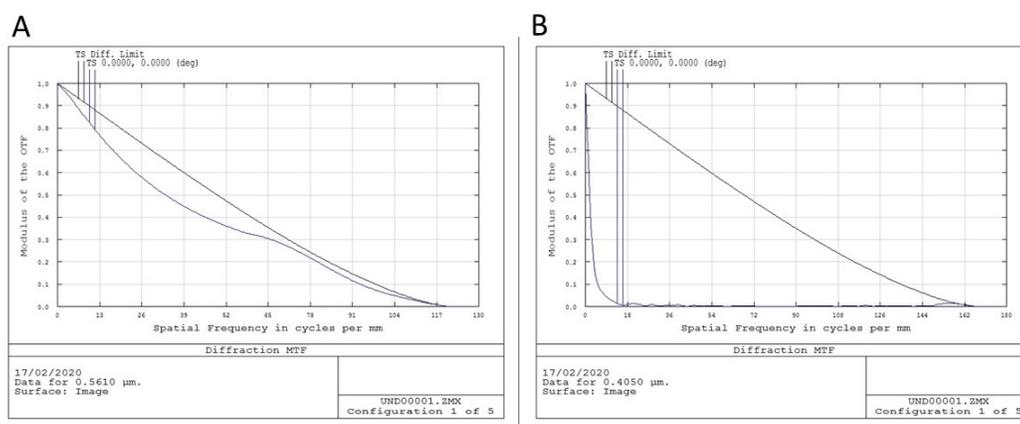
modélisé pour $\lambda = 561nm$

TABLE 3.1 – RMS wavefront error selon l’angle d’inclinaison du scanner x

Le critère de Maréchal n'est vérifié que pour un angle de balayage égal à 0° (*RMS wavefront error* $< 0,07\lambda$). Dès lors que l'on commence à balayer le LASER sur les optiques, nous remarquons que le *RMS wavefront error* est très supérieur à $0,07\lambda$. Les lentilles utilisées pour la première version de ce prototype ne sont pas adaptées pour le balayer LASER. Ce problème soulevé par Negrean et al. [116] est très récurrent dans les équipes qui développent des microscopes confocaux '*home-made*'. Negrean propose une méthode pour réaliser des optiques sur-mesures, mais forcément bien plus chères que les standards ThorLabs. Il est évident pour l'élaboration d'un premier prototype qu'il n'est pas judicieux de commencer directement avec un niveau de complexité tel que l'on conçoit nous même nos lentilles sur-mesures, mais c'est une option qui reste envisageable dans le cas d'une industrialisation de ce prototype.

3.2.2 Caractérisation du chemin optique TIRF/HiLo

Pour nos applications, il est intéressant d'utiliser le mode TIRF/HiLo pour des applications de SPT avec des fluorophores photoconvertibles. Pour cela nous utilisons pour nos expériences en routine trois longueurs d'onde : 405nm, 488nm et 561nm. Il est donc judicieux de vérifier comment réagit notre système pour de telles longueurs d'onde, avec nos lentilles avec un coating type A (pour les longueurs d'onde visibles). Comme nous le montre la figure 3.10A la MTF du dispositif à 561nm est très proche de la limite de diffraction. On remarque d'ailleurs que la fréquence de coupure de notre système optique de 117 cycles/mm est identique à la fréquence de coupure du système limité par la diffraction. Avec $\lambda = 405nm$ (fig. 3.10B), la fréquence de coupure tombe à 18 cycles/mm ce qui prouve que la résolution du système optique est largement dégradé en 405nm. Comme nous sommes en condition de photo-activation avec le 405nm et non en condition d'imagerie pure, si l'allure du faisceau responsable de la photoconversion est de moins bonne qualité, c'est moins problématique en comparaison au faisceau d'excitation en 561nm.

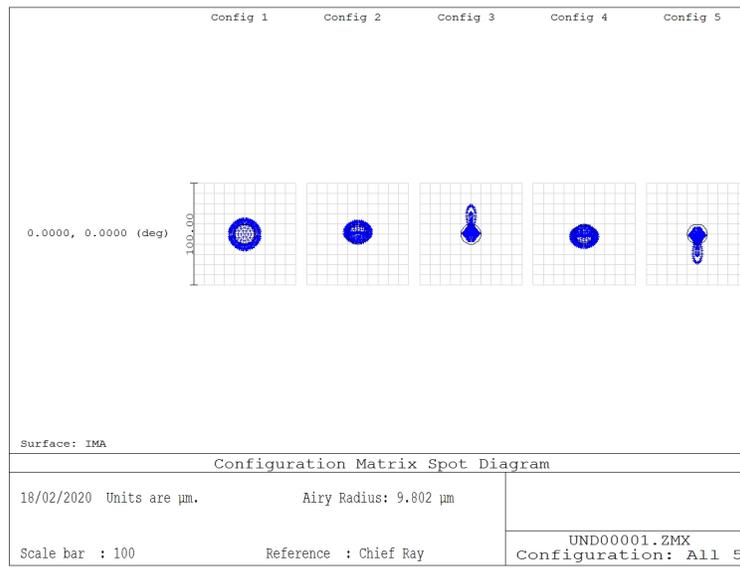


Graphique de calcul de la fonction de transfert de modulation (MTF), simulation Zemax. . En noir est représenté la MTF dans le cas parfait « limité par la diffraction ».

(A) MTF pour $\lambda = 561nm$ (B) MTF pour $\lambda = 405nm$

FIGURE 3.10 – MTF pour le chemin optique TIRF

Nous avons vu pour le mode confocal que les optiques n'étaient pas adaptée pour un balayage du faisceau. Regardons alors l'allure des points de focalisation du faisceau dans le plan pupille arrière de l'objectif (fig. 3.11)



Calcul du spot diagram, qui correspond, dans le contexte de l'optique géométrique, aux positionnements des rayons lumineux issus de la source, dans le dernier plan optique, ici le plan focal arrière de l'objectif. Les « config n » représentent l'allure du spot diagram selon différents angles de balayage (0 , $+0,5$, $+1$, $-0,5$ et -1°).

Simulation Zemax

FIGURE 3.11 – Spot diagram dans le plan pupille arrière de l'objectif en mode TIRF pour différents angles de balayage

Le spot diagram nous montre que pour plusieurs configurations l'allure du point focal dans le BFP change selon l'angle de balayage. La configuration 1 correspond à un angle de 0° , les configurations 2 et 3 correspondent aux angles $+0,5^\circ$ et $+1^\circ$, et respectivement les configurations 4 et 5 aux angles $-0,5^\circ$ et -1° . Nous remarquons dans un premier la symétrie des réponses par rapport à l'axe optique, ce qui est attendu. Mais plus l'angle de balayage est grand, plus le spot est distordu. Cependant, d'après ce diagramme et peu importe l'angle, la majorité du faisceau est contenu dans le cercle d'Airy décrit en noir (diamètre $21\mu\text{m}$), ce qui est bon présage malgré la présence d'aberrations pour les angles $\pm 0,5^\circ \pm 1^\circ$.

En ce qui concerne l'impact de l'inclinaison du faisceau sur l'allure du front d'onde, voici le tableau des erreurs RMS du front d'onde selon l'angle :

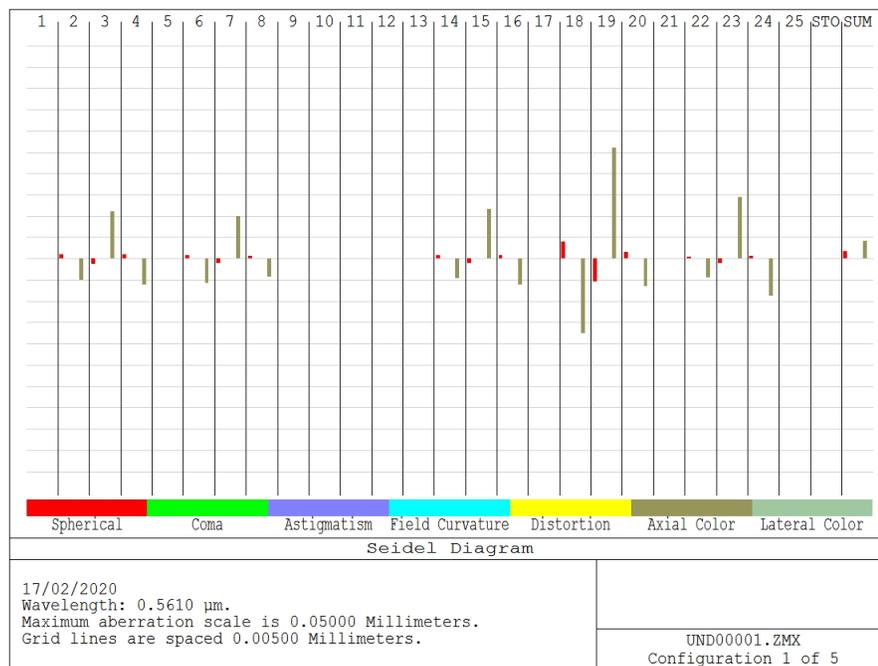
D'après ces valeurs, aucune condition ne vérifie le critère de Maréchal. Ainsi, les faisceaux sont soumis à des aberrations qui sont visibles. Il est judicieux de regarder le diagramme de Seidel pour savoir quelles optiques introduisent le plus d'aberrations

Angle inclinaison scanner x en degrés	RMS wavefront error
0°	0,0908λ
±0,5°	0,3157λ
±1°	0,1012λ

modélisé pour $\lambda = 561nm$

TABLE 3.2 – RMS wavefront error selon l’angle d’inclinaison du scanner x

et quelles sont les types d’aberrations prédominantes dans le système (voir fig. 3.12).



Les numéros en haut du graphique représentent l’index des dioptries optiques. Les couleurs en bas du diagramme correspondent aux différentes aberrations testées (sphérique, coma, astigmatisme, courbure de champ, distorsion, chromatique axiale et latérale).

FIGURE 3.12 – Diagramme de Seidel pour le système optique complet

Le diagramme de Seidel représente chaque dioptre par son indice dans le système optique (en haut du diagramme), les différents types d’aberrations (par couleur) et la valeur de chaque aberration. Il est possible comme nous le voyons d’avoir des aberrations « positives » ou « négatives » qui finiront par se compenser. Dans notre système optique, nous remarquons dans un premier temps que deux types d’aberrations sont prédominantes : les aberrations sphériques et chromatiques axiales. Dans

un second temps, nous observons que l'optique qui amène le plus d'aberrations est la lentille AC254-150-A. Dans le plan pupille arrière, nous avons présence des légères aberrations sphériques et chromatiques, ce qui n'est pas étonnant vu l'impact de la longueur d'onde sur notre système comme montré précédemment.

Avec Zemax ou CodeV il est possible de concevoir sur mesure des lentilles qui permettrons par exemple d'annuler certains types d'aberrations, ou d'améliorer la résolution optique du système, notamment grâce à la fonction 'optimisation' qui permet de mettre en variable les rayons de courbure, les épaisseurs, ou encore le matériau des lentilles, et ainsi trouver les caractéristiques adéquates pour nos applications.

3.2.3 Modélisation de système de pré-compensation du pupil-shift

De nombreux tests ont pu être réalisés grâce à la modélisation Zemax mais une des choses les plus pertinentes a été de montrer l'intérêt de ce troisième scanner pré-compensateur du pupil-shift, et surtout quelle commande lui administrer pour qu'il annule le décalage en pupille arrière.

Rappelons que le scanner pré-compensateur a pour but de modifier la position du faisceau sur le miroir Y (translation) afin que le faisceau intercepte le scanner X en une seule position peu importe l'angle de balayage du miroir Y.

Dans notre configuration, les calculs ont montré que pour compenser le pupil shift, l'angle de compensation devait être égal à :

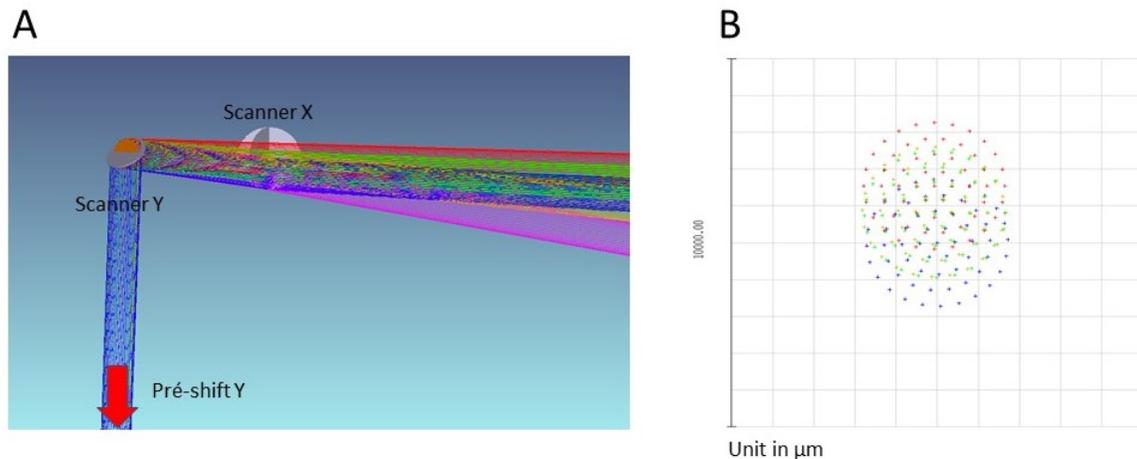
$$\theta_{pré-shift} = \arcsin\left(\frac{D1}{D2} \sin(\theta)\right)$$

avec D1 la distance entre le scan de pré-compensation et le premier doublet f50, D2 la distance entre les deux scanners Y-X, et θ l'angle induit par le scanner Y.

Dans le cas où θ décrit des petits angles et avec nos caractéristiques, nous obtenons par simplification :

$$\theta_{pré-shift} = \frac{\theta}{3,3}$$

Regardons maintenant l'impact du pupil-shift dans le plan focal arrière par modélisation (fig.3.13)

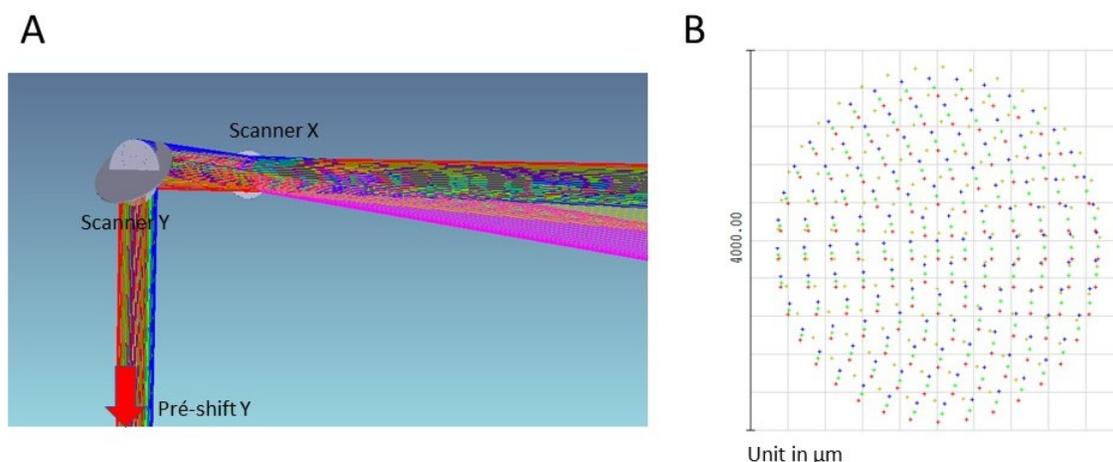


(A) Vision 3D par Zemax, zoomé sur le dernier miroir scanner. Les faisceaux de différentes couleurs représentent différents angles induits par le scanner Y. (B) Calcul du spot diagram, qui correspond, dans le contexte de l'optique géométrique, aux positionnements des rayons lumineux issus de la source, dans le dernier plan optique, ici le plan focal arrière de l'objectif. Les couleurs concordent avec la simulation 3D en (A). Le faisceau rose, correspondant à un angle -2° sort du système optique avant d'intercepter le BFP.

FIGURE 3.13 – Modélisation de mise en évidence du pupil shift

La figure (A) montre un zoom de la représentation 3D de la modélisation. Dans ce cas, le scanner de préshift est inactivé et le scanner Y décrit des angles entre $+1^\circ$ et -1° . On remarque très bien sur l'image du scanner X les différents points d'impact à différentes positions. Comme l'image du scanner X est reportée sur le plan focal arrière de l'objectif, nous pouvons observer les positions des faisceaux pour différents angles figure (B) (jusque 2mm entre les positions les plus extrêmes). Or, en mode confocal et feuille de lumière, il faut que peu importe l'angle d'incidence, le faisceau soit centré sur l'axe optique, ce qui n'est pas le cas ici.

Maintenant activons le scanner de pré-shift selon la formule décrite ci dessus (voir fig. 3.14)



(A) Vision 3D par Zemax, zoomé sur le dernier miroir scanner. Les faisceaux de différentes couleurs représentent différents angles induits par le scanner Y. (B) Calcul du spot diagram, qui correspond, dans le contexte de l'optique géométrique, aux positionnements des rayons lumineux issus de la source, dans le dernier plan optique, ici le plan focal arrière de l'objectif. Les couleurs concordent avec la simulation 3D en (A). Le faisceau rose, correspondant à un angle -2° sort du système optique avant d'intercepter le BFP.

FIGURE 3.14 – Modélisation de mise en évidence de l'annulation du pupil shift grâce au scanner compensateur

En (A) nous voyons que le scanner de pré-shift a été activé et qu'il commence à balayer avec une amplitude 3,3 plus faible que le scanner Y. De ce fait, nous remarquons sur le scanner X que les faisceaux convergent vers la même position, ce qui est attendu. Lorsque l'on regarde dans le plan focal arrière de l'objectif (B), nous remarquons que les positions de chaque faisceau se sont largement rapprochées. Avec activation du miroir de pré-shift, l'écart entre les faisceaux vaut au maximum $350\mu\text{m}$. Grâce à ce troisième compensateur nous arrivons donc à réduire le décalage en pupille arrière responsable de distorsion du faisceau en sortie d'objectif d'un facteur 5,7 au minimum.

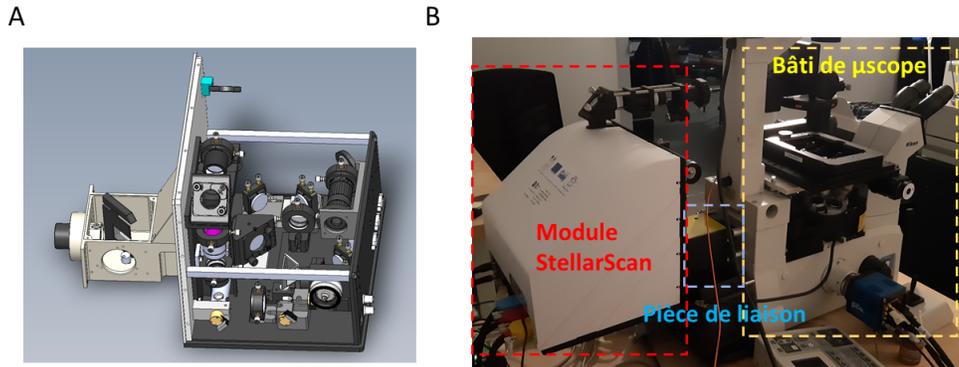
Concernant l'asservissement des scanners, nous avons fait le choix d'alimenter le scanner pré-shift Y et le scanner Y avec la même commande. Seulement, comme nous devons appliquer un facteur $\frac{1}{3,3}$ à la commande en tension sur le scanner pré-shift Y, nous avons ajouté un potentiomètre sur la commande scanner Y pré-shift afin de paramétrer le facteur correctif de manière plus aisée par rapport à un pont diviseur de tension.

Chapitre 4

Réalisations dispositif optique, micro-miroirs et logiciel

4.1 Dispositif optique

Suite à cette étape de dimensionnement, notre partenaire industriel Errol s'est chargé de construire le module et de le miniaturiser au maximum. Voici les visuels 3D de notre dispositif modélisé sous SolidWorks par Sandra Esteve (Errol) :



(A) *Vision 3D sous SolidWorks* (B) *Module StellarScan monté sur notre bâti de microscope*

FIGURE 4.1 – Dispositif StellarScan miniaturisé prêt à être fixé sur un statif de microscope

Les composants optiques présents dans ce prototype correspondent à ce qui a été décrit figure 3.6.

Le système complet est contenu dans une structure en aluminium anodisé, tous les branchements électriques peuvent être fait par l'arrière du dispositif. La partie droite sert à fixer le système sur le statif de microscope. Des miroirs de repliements ont été utilisés (ThorLabs) pour compacter le chemin optique sur deux niveaux : de cette manière la collimation et mise en forme du faisceau se fait sur l'étage du haut (lentille collimation, iris variable, lentille cylindrique, optotune), tandis que l'étage du bas correspond à l'emplacement des différents scanners, de la bifurcation TIRF, et des télescopes.

4.2 Développement du système de micro-miroirs à 45° pour le mode feuille de lumière

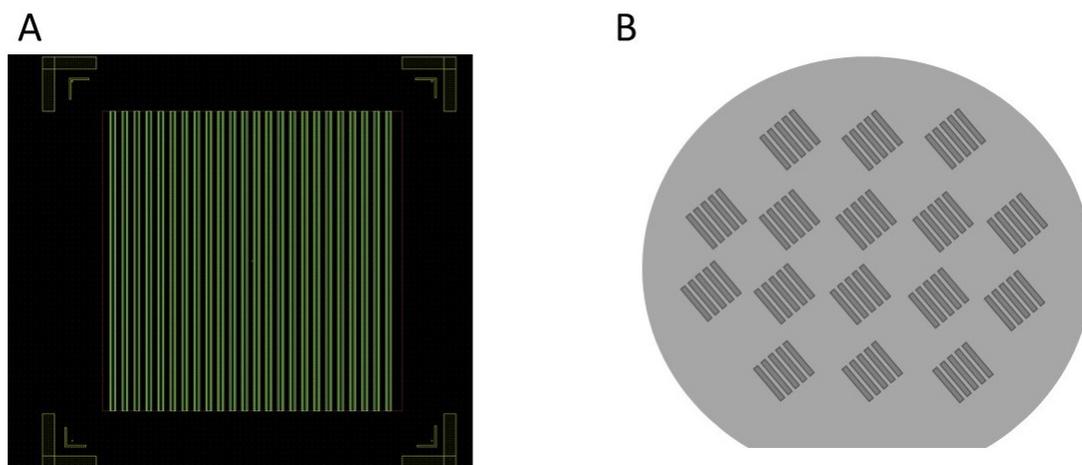
Le mode feuille de lumière fonctionne associé avec des puces en silicium où sont gravés des micro-miroirs orientés à 45°, inspirés des travaux de Galland et al. [50] De cette manière, le faisceau LASER vient intercepter le miroir, et se retrouve dévié perpendiculairement à l'axe optique.

J'ai fabriqué les micro-miroirs en salle blanche (IEMN, Lille) avec l'aide de Yannick Coffinier qui m'a initiée aux bases de la micro- et nano-fabrication.

Pour cela nous avons utilisé des wafers en silicium 3 pouces avec une orientation cristalline de type (100). Une puce sera composée de 10 sillons rectangulaires de 10mm de long et 100µm de large comme décrit figure 4.2 A.

Pour graver les flancs {100} situés à 45° par gravure humide, il y a deux conditions majeures : (1) les contours du motifs doivent être alignés dans la direction $\langle 100 \rangle$ (45° par rapport au méplat d'un wafer orienté (100)), et (2) le ratio de gravure $R(100)/R(110)$ doit être plus grand que 1. Afin de contrôler ce ratio, nous pouvons ajuster trois paramètres : le type de solution alcaline utilisée pour le bain de gravure (KOH ou TMAH), la concentration de surfactant utilisée pour améliorer la mouillabilité du matériel (isopropanol ou Triton X-100), et enfin la température du bain de gravure.[127, 128, 144, 79]

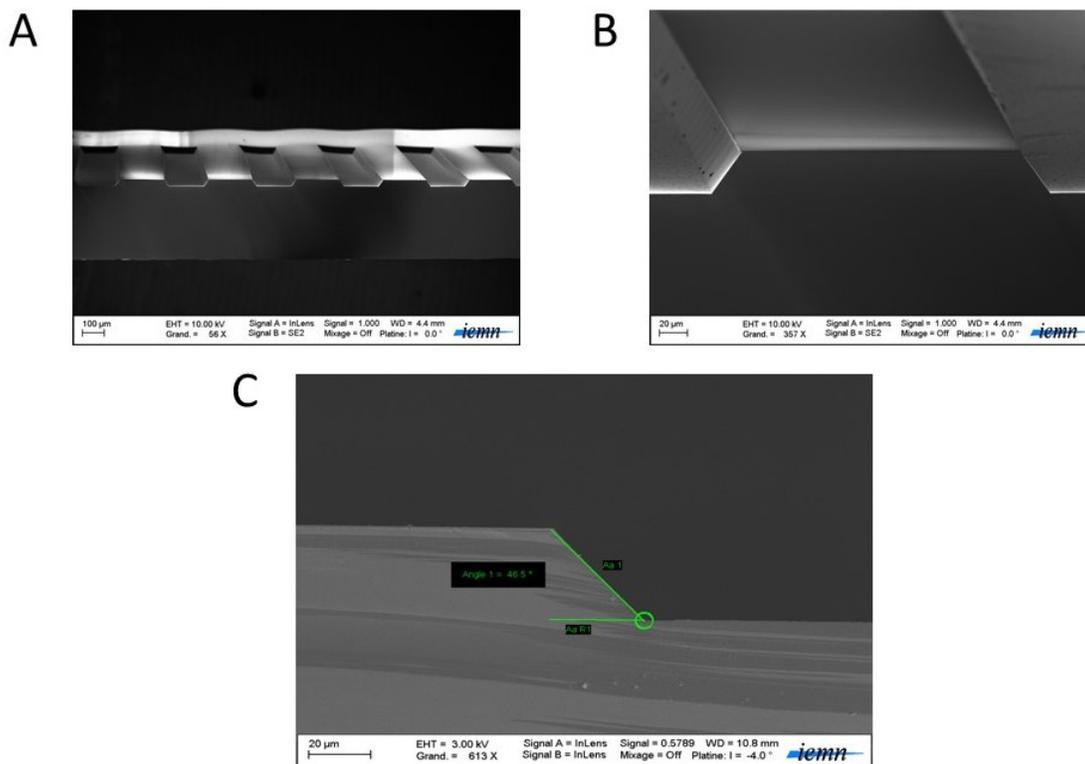
Pour fabriquer ces micro-miroirs, nous avons d'abord réalisé un masque sacrificiel de 500 nm d'épaisseur en oxyde de silicium (SiOx) sur le wafer par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD). Ensuite, nous avons appliqué une couche d'accroche HDMS, puis une couche de résine SPR 220 diluée 80 :20 PGMEA



(A) Motif choisi pour l'écriture LASER (B) Schéma du wafer silicium et des emplacements des différentes puces

FIGURE 4.2 – Motifs choisis pour la création de nos micro-puces

appliquées toutes les deux par *spin-coater*. Afin de graver des motifs dans la couche d'oxyde, il a fallu ouvrir la couche de résine afin de l'exposer. La résine SPR étant une résine positive, son irradiation par LASER lui permet de devenir soluble et de se dissoudre dans un bain révélateur. Nous avons donc écrit le motif sur la résine par écriture LASER, puis révélé le motif dans un bain révélateur MF319. Les parties de SiOx nécessitant d'être gravées étant maintenant à l'air libre, nous pouvons donc passer à l'étape de gravure sèche dite « RIE » (Reactive Ions Etching) par un mélange 50 :50 de CHF₃ et CF₄ (20-20sccm - 50mT, 80W pendant 53min, pour une vitesse de gravure de 10,7nm/min). Afin de caractériser toutes les épaisseurs gravées, des mesures par profilomètre ont été réalisées à chaque étape importante du processus. Les motifs ainsi gravés dans la couche d'oxyde, nous pouvons maintenant « dé-résiner » dans un bain de Remover PG pendant 3h à 70°, c'est ce qu'on appelle plus communément l'étape de *lift-off*. A cette étape nous avons fini de créer notre masque sacrificiel en SiOx. La dernière étape déterminante consiste à trouver la bonne formule chimique pour notre bain de gravure. Après différents tests, nous avons fini par valider la formule suivante : TMAH 19% + 0,1% Triton X-100 + 3M d'isopropanol pendant 2h sous agitation à 80%. Pour terminer la fabrication, il faut dissoudre le masque sacrificiel en SiOx par un bain d'acide fluorhydrique (HF) à 50% pendant 10min.



(A) Vue de coupe d'une micro-puce. La légère ondulation dans le fond de l'image correspond à des artéfacts dûs à l'imagerie MEB. (B) Zoom sur les flancs des micro-miroirs. (C) Vérification de l'orientation des miroirs (45°).

FIGURE 4.3 – Image MEB des micro-miroirs

La qualité des miroirs (rugosité de surface, orientation des miroirs, dimension) a été vérifiée par microscope électronique à balayage (MEB) (voir fig. 4.3). L'efficacité des micro-miroirs d'un point de vue imagerie sera explicitée et discutée ultérieurement.

4.3 Réalisation du logiciel de pilotage et d'acquisition

Au démarrage le logiciel s'ouvre sur la fenêtre suivante :

Nous allons décrire succinctement les principales caractéristiques du logiciel qui ont fait l'objet d'une réflexion particulière en terme de spécification logicielle pour notre application. Les fonctions plus 'basiques' comme les changements utilisateurs,

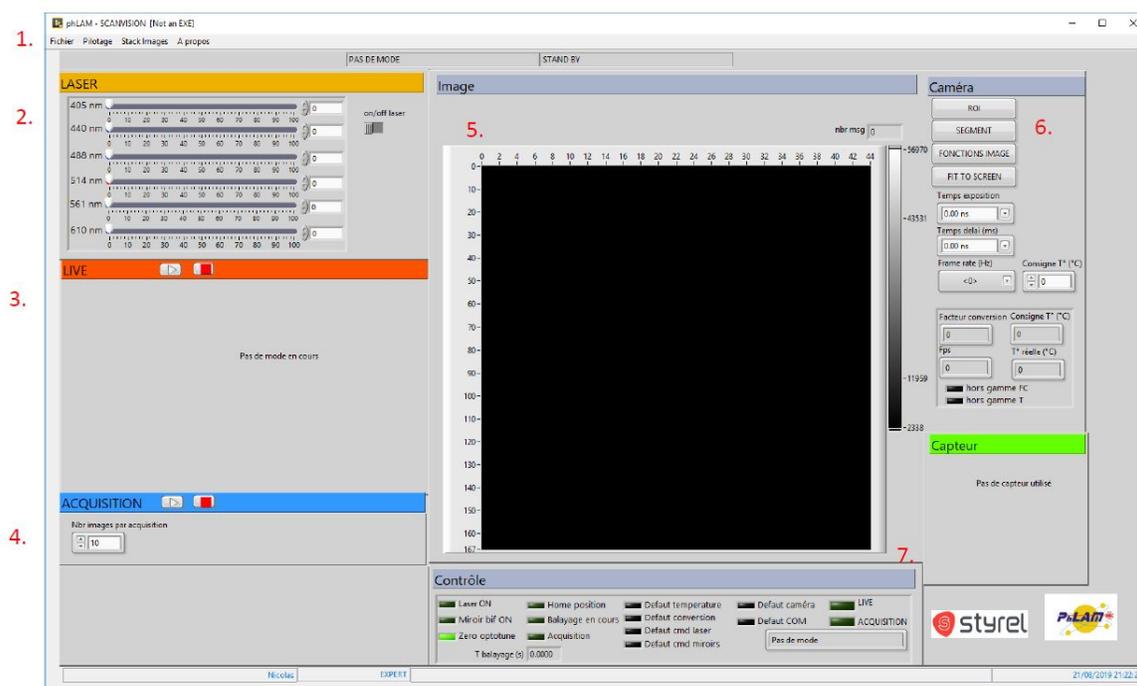


FIGURE 4.4 – Interface Homme-Machine du logiciel ScanVision

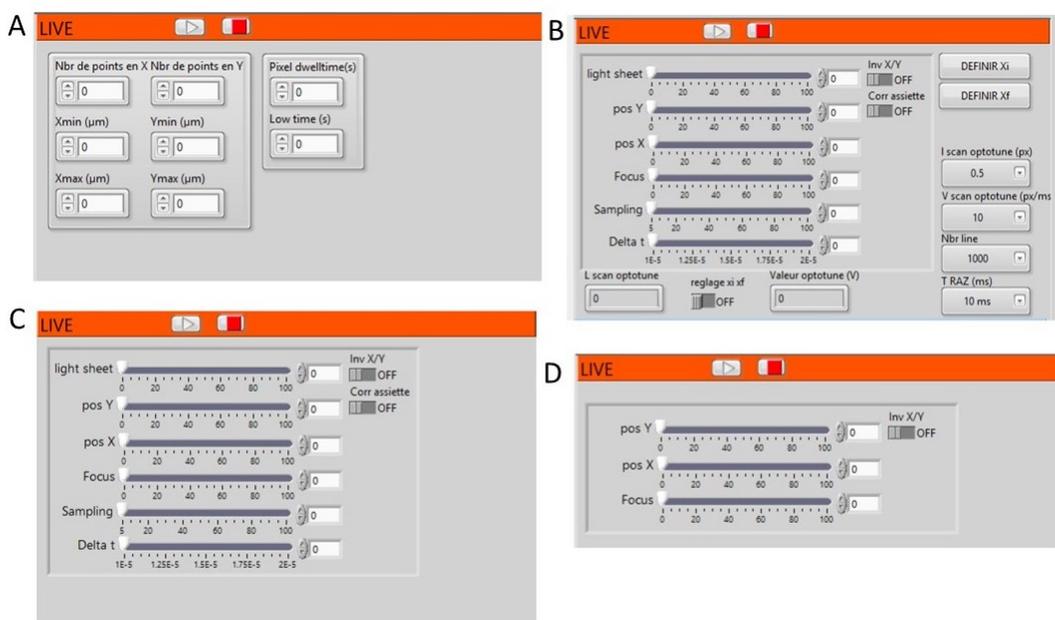
les fonctions *enregistrement*, les ouvertures de fichiers etc ne seront pas décrites. Un manuel d'utilisation du logiciel est cependant disponible et sera plus exhaustif que ce paragraphe. Rappelons que l'étude, le cahier des charges, et les spécifications logicielles ont été réalisés par mes soins, mais que le code a été écrit par Styrel, une entreprise spécialisée dans le développement logiciel industriel.

1. Menu de l'application Premièrement dans l'onglet 'Pilotage', l'utilisateur peut choisir entre quatre modes d'imagerie : (1) Confocal, (2) Feuillet standard, (3) Feuillet rolling shutter et (4) TIRF/HiLo.

Dans l'onglet 'Fichier', on peut enregistrer ou ouvrir des fichiers 'réglage.patch' qui comportent des configurations de réglage pour chaque mode d'illumination si besoin. On peut également avoir accès à un panneau de configuration avancée qui permet de configurer le logiciel en lui indiquant par exemple les voies des entrées/sorties de chaque dispositif à piloter, les tensions mix et max des voies de générations, les fréquences d'échantillonnages des cartes, et les contrôles caméra.

2. Pilotage LASER Dans cette partie apparaissent les contrôles LASERs. Le bouton ON/OFF permet l'activation et la désactivation de tous les LASERs. Les curseurs permettent de contrôler l'intensité LASER des six LASERs du module Oxixus L6Cc Combiner. Les contrôles LASERs sont indépendants des différents modes d'illumination.

3. Contrôle du mode LIVE Selon le mode d'imagerie choisi, le mode LIVE change d'apparence car les contrôles ne sont pas identiques. Le mode LIVE permet de visualiser le champ et de pré-régler l'illumination avant l'acquisition.



(A) mode confocal (B) mode Light Sheet feuillet standard (C) mode Light Sheet rolling shutter (D) mode HiLo TIRF

FIGURE 4.5 – Différents modes LIVE

- Mode confocal (fig. 4.5 A) : l'utilisateur peut régler le mode confocal en indiquant le nombre de pixels voulus dans l'image en X et Y (l'image sera forcément rectangulaire), les valeurs des positions des points (X_{min} ; Y_{min}) et (X_{max} ; Y_{max}) qui définissent le rectangle, le *pixel dwelltime* et le *low time* qui correspondent respectivement au temps par pixel, et au temps inter-pixels pendant le balayage.

- Mode feuillet standard (fig. 4.5 C) : l'utilisateur règle la largeur de la feuille de lumière en mode scanning par le curseur 'light sheet', il définit le nombre de points dans le motif par 'Sampling' et le temps entre chaque avec 'Delta t'. Il peut ensuite ajuster sa position grâce aux curseurs 'pos X' et 'pos Y', et inverser les commandes si besoin avec le bouton 'Inv X/Y'. Le curseur 'Focus' permet de piloter l'optotune et de faire varier la position du waist. Le bouton 'Corr assiette' ON/OFF permet d'actionner la fonction de correction d'assiette associée, paramétrable dans le panneau de configuration.
- Mode feuillet rolling-shutter (fig. 4.5 B) : ce mode reprend les fonctionnalités du mode précédent, avec des variantes afin de paramétrer l'optotune de manière automatique, ainsi que le roulement de la caméra. Le bouton 'réglage xixf ON/OFF' permet d'activer la calibration de l'amplitude d'optotune, afin de sélectionner une plage de tension à parcourir lors du rolling. Le menu déroulant 'Nbr line' définit le nombre de lignes lues en même temps, 'V scan optotune' la vitesse du rolling et T RAZ le temps de retour à zéro de l'optotune.
- Le mode TIRF (fig. 4.5 D) : l'utilisateur peut régler l'inclinaison de l'angle grâce aux curseurs 'pos X' et 'pos Y'. Il peut également agir sur l'optotune si besoin grâce à 'focus'.

4. Lancement d'une acquisition Une fois les paramètres d'acquisition réglés, on peut lancer l'acquisition en renseignant le nombre d'images souhaitée. A la fin de l'acquisition, une fenêtre pop-up apparaît nous indiquant les démarches à suivre pour enregistrer la pile d'images.

5. Affichage de l'image de la caméra ou de l'image confocale

6. Fonctions images de bases Cette partie nous permet de réaliser de contrôler les paramètres caméra et d'effectuer des traitements d'image basiques tels que l'ajustement du gamma, du contraste, l'éclaircissement, la possibilité de réaliser une ROI, ou une fonction segment pour voir le profil des niveaux de gris.

7. Remontée des informations Cette partie nous indique par des LED vertes ou rouges si les dispositifs répondent correctement à la commande.

Chapitre 5

Caractérisation du système et résultats

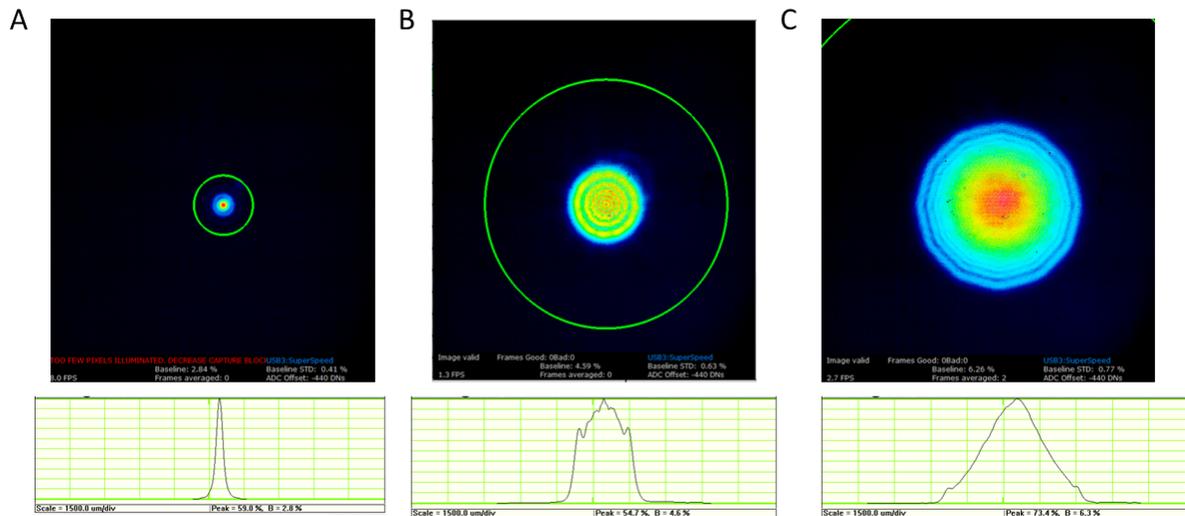
5.1 Caractérisation des points critiques indépendants

Avant de passer à la caractérisation des différents modes d'illuminations indépendamment des uns des autres, j'ai caractérisé les points critiques communs à un ou plusieurs modes d'imagerie, à savoir :

1. La caractérisation du faisceau en sortie de l'iris motorisée : quels sont les effets de cette ouverture diffractante sur le faisceau gaussien collimaté ?
2. Le diamètre du faisceau est un point critique : pour le CLSM, il doit être de diamètre semblable à la pupille arrière de l'objectif. Pour les modes HiLo et LSFM, les dimensions de la feuille de lumière (ou quasi-feuille de lumière pour le HiLo) dépendent directement de la taille de faisceau avant l'objectif. Il est donc important de vérifier que (1) pour le CLSM, la taille maximale du faisceau soit suffisante pour remplir la pupille arrière de notre objectif (2) pour les modes HiLo et LSFM, il faut que la réponse de l'iris variable soit linéaire afin d'avoir un lien direct entre la commande envoyée à l'iris variable, et le diamètre du faisceau.
3. L'annulation du pupil-shift sert principalement aux modes CLSM et LSFM, comment caractériser l'effet de l'ajout d'un troisième compensateur ? Est-il efficace ?

5.1.1 Caractérisation du faisceau

En sortie de fibre, le faisceau LASER est collimaté à l'aide d'une lentille Thorlabs AC254-035-A. Nous avons mesuré le faisceau collimaté à l'aide d'un analyseur de faisceau (réf : WinCamD-LCM – 1" CMOS Beam Profiler - DataRay CA, USA), afin de premièrement, caractériser la taille réelle du faisceau, et deuxièmement visualiser l'allure du faisceau et l'impact de l'ouverture diffractante sur le profil du faisceau.



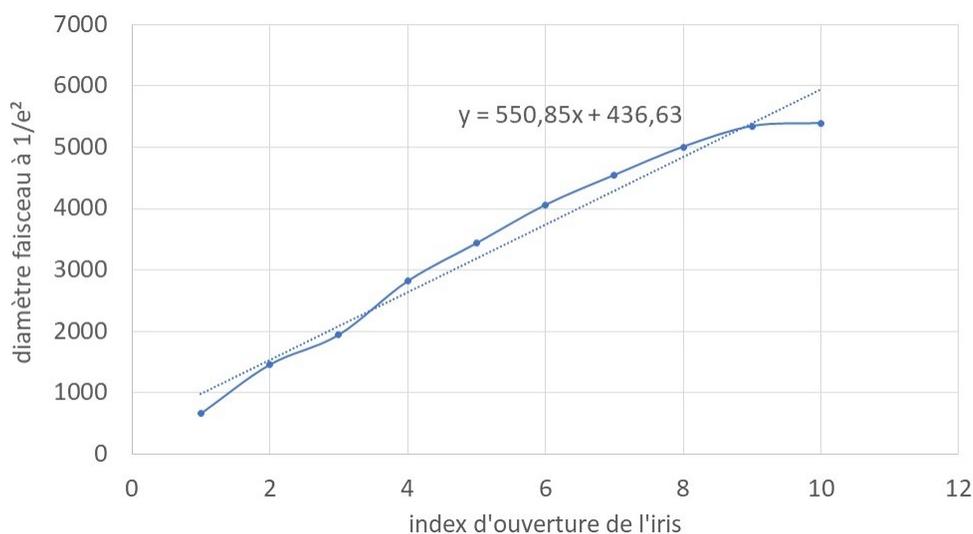
(A) ouverture minimale de l'iris variable (B) ouverture médiane de l'iris variable
(C) Ouverture maximale de l'iris variable

FIGURE 5.1 – Allure du faisceau pour différentes ouvertures de l'iris motorisée

La figure 5.1 nous montre les profils 2D (en haut) et 1D (en bas) des faisceaux pour différentes ouvertures (A ouverture minimale, B ouverture médiane, et C ouverture maximale) de l'iris variable motorisé. Nous remarquons, notamment pour le cas (B) que le diaphragme variable vient couper le faisceau sur le haut de son profil gaussien : la figure observée est donc un hybride entre un faisceau gaussien et une tâche d'Airy. La figure de diffraction finale située à l'infini présente des anneaux concentriques dont l'intensité PV (peak-to-valley) n'excède pas 10% de l'intensité globale du faisceau.

A propos du profil du faisceau à ouverture minimale de l'iris variable (A), il représente le cas où le faisceau en sortie à l'allure d'une tâche d'Airy, les anneaux secondaires ne sont pas observables sur l'image. Quant à la condition (C), le faisceau n'est quasiment pas tronqué, il est de profil gaussien.

Concernant la caractérisation de notre système de « zoom » motorisé, j'ai mesuré le diamètre du faisceau à différentes ouvertures de l'iris variable, de l'ouverture minimale à l'ouverture maximale. Le but étant de s'assurer que notre zoom agit de manière linéaire.



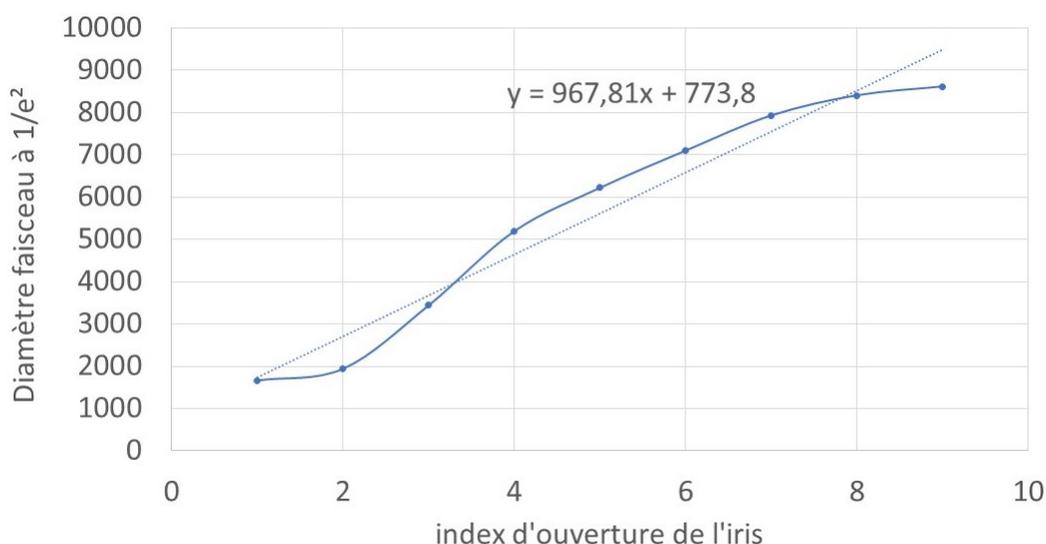
Mesures réalisées avec un analyseur de faisceau WinCamD-LCM – 1" CMOS Beam Profiler positionné en sortie du système de collimation.

FIGURE 5.2 – Diamètre du faisceau à $1/e^2$ fonction de l'ouverture de l'iris

Nous remarquons (fig. 5.2) que globalement le diamètre du faisceau à $1/e^2$ dépend linéairement de l'ouverture de l'iris. Nous notons un plateau sur les deux derniers points qui correspondent à l'instant où le diamètre du diaphragme atteint la taille maximale du faisceau LASER. Notre iris variable (ref : SMARTACT SID-18 motorized iris diaphragm) grâce à ses propriétés mécaniques, est un dispositif précis aux propriétés extrêmement fiables et reproductibles. De ce fait, nous n'observons pas de phénomène d'hystérésis dans son utilisation.

J'ai réalisé les mêmes mesures de profil du faisceau en position de pupille arrière de l'objectif afin de contrôler sa propagation sur l'ensemble du trajet optique (fig 5.3). Nous observons que le diamètre maximal du faisceau à $1/e^2$ dans le plan de la pupille arrière de l'objectif vaut 8,6mm au lieu de 10mm initialement prévu pour le mode confocal (pour le remplissage de la pupille arrière de l'objectif). Pour régler ce problème, nous pouvons (1) changer le dernier télescope du module StellarScan (initialement $G=1,67$), mais cela signifie changer toute la géométrie du prototype,

ce qui a été proposé comme solution pour une version future. Ou (2), changer les miroirs de 8mm pour des miroirs plus grands, mais augmenter de ce fait l'inertie sur le rotor, ce qui rendrait le balayage plus lent.

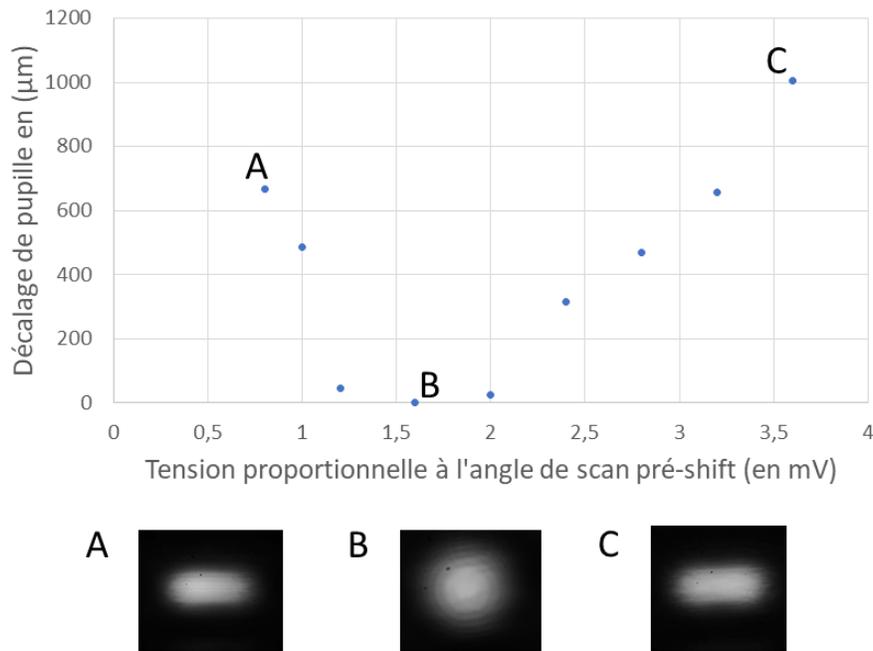


Mesures réalisées avec un analyseur de faisceau WinCamD-LCM – 1" CMOS Beam Profiler

FIGURE 5.3 – Diamètre du faisceau à $1/e^2$ fonction de l'ouverture de l'iris, placé à la pupille arrière de l'objectif

5.1.2 Caractérisation du pupil-shift

Notre système de compensation du pupil-shift se compose d'un 3ème scanner pré-compensateur. Ce scanner est alimenté par la même commande en tension que le premier scanner (le scanner qu'il compense) divisée par un facteur de 3,3, comme décrit dans la section 3.2.3. Afin de réaliser la division de la commande en tension, nous aurions pu effectuer un pont diviseur de tension, mais nous avons opté pour un potentiomètre, permettant plus de liberté. Afin de régler le potentiomètre, j'ai actionné le premier scanner et son scanner pré-compensateur uniquement avec une commande balayage 1D. Lorsque le scanner pré-compensateur n'est pas calibré, c'est-à-dire qu'il n'a pas la bonne commande en tension qui permet d'annuler le pupil-shift, nous observons en pupille arrière de l'objectif que le faisceau, au lieu d'être parfaitement statique comme il devrait l'être si le système était parfaitement aligné, balaye dans une dimension (fig. 5.4 A et C).



Le système de microscopie est basculé en mode CLSM/LSFM pour réaliser cette mesure. La tension est récupérée en sortie du potentiomètre dans la carte électronique. Le décalage en pupille arrière est mesuré grâce à une caméra Allied Marlin F-145B2 à 15 fps, $px=4,65\mu m$. La mesure du décalage est réalisée de manière relative à la position minimale.

FIGURE 5.4 – Annulation du décalage de la pupille sur l'axe rapide

Afin de trouver la bonne commande en tension, il faut régler le potentiomètre (12 tours) par la vis de réglage avec un petit tourne-vis jusqu'à annulation du pupil-shift. La figure 5.4 nous montre que lorsque nous faisons des tours de vis, j'atteins un minima (en B), puis le décalage de pupille ré-augmente fonction de la tension de sortie du potentiomètre. Pour bien calibrer notre système, il faut se placer à ce minima, et le système de pupil-shift est réglé.

5.2 Caractérisation du mode CLSM

Comme nous le voyons sur la photo figure 5.5 B, le module de détection confocale est indépendant du bâti principal : possibilité de l'enlever sans modifier le reste du trajet optique d'excitation. Le module de détection confocal est situé hors du bâti principal et fixé au reste par un système de cage Thorlabs, un miroir dichroïque a été ajouté pour injecter l'émission de fluorescence dans ce module.

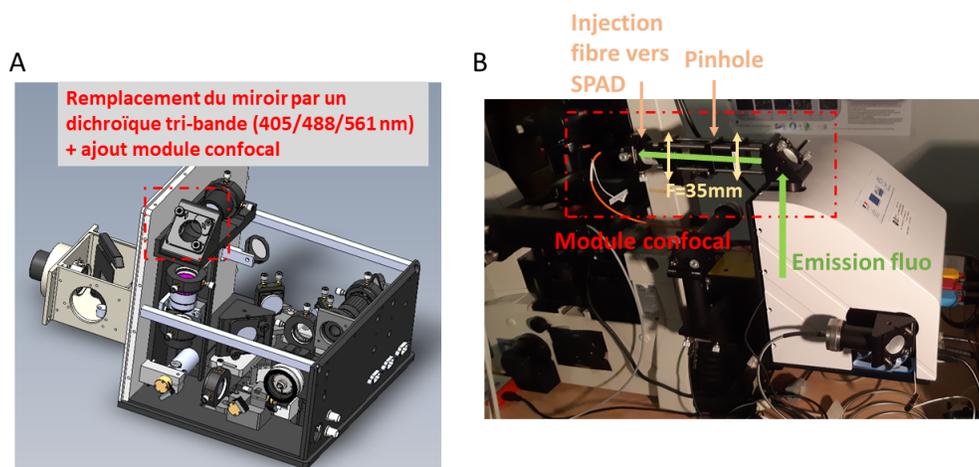


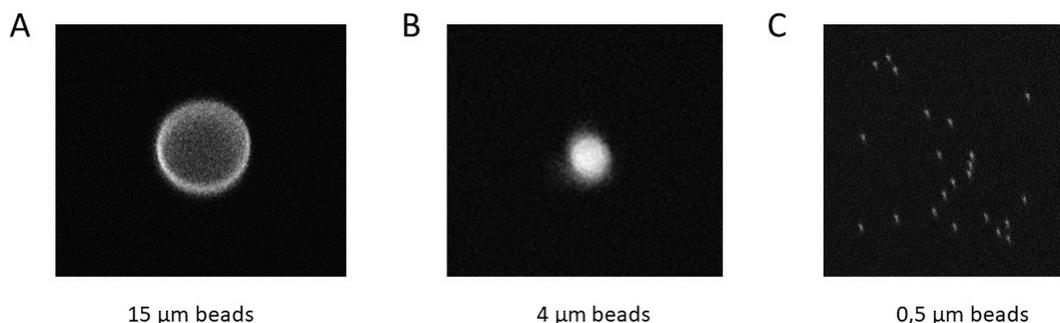
FIGURE 5.5 – Ajout du module confocal sur le StellarScan

La calibration du balayage est nécessaire pour que la commande en tension corresponde à un déplacement sur l'échantillon en microns [43]. Pour cela, nous utilisons des paramètres logiciels Xfactor et Yfactor ($V/\mu\text{m}$) qui vont servir respectivement de convertisseur entre la commande utilisateur qui se fait en μm (je demande au logiciel de me faire un champ de vue de $m \mu\text{m}$ par exemple) et le pilotage des scanners (balayage grâce à une fonction rampe sur une amplitude de n Volts). De ce fait, nous avons réalisé des boucles de rétro-actions entre la commande sur Xfactor et Yfactor et la mesure du décalage du faisceau en sortie d'objectif, par rapport à l'axe optique, jusqu'à trouver les bons coefficients Xfactor et Yfactor.

5.2.1 Caractérisation de la confocalité

Au jour où est rendu le manuscrit, la détection confocale n'est pas encore parfaitement terminée et développée à cause de problèmes logistiques. Comme la figure 5.6 l'atteste, notre illumination confocale présente à l'heure actuelle des limitations.

Les images des billes de $4\mu\text{m}$ et 500nm ne sont pas parfaites : on note la présence d'aberrations optiques, probablement un mélange d'aberrations sphérique et de coma (surtout visibles sur les billes de 500nm figure 5.6 C). De plus, lorsque l'on cherche à rajouter le pinhole pour la sélection spatiale, il nous est très difficile d'obtenir du signal sur la SPAD. Les lentilles présentes dans la détection confocale sont des lentilles de courtes focales ($f=35\text{mm}$) afin de limiter l'effet de la gravité sur la détection confocale dû au poids des optiques, qui crée de l'instabilité. Les simulations Zemax ont montré que ces lentilles pouvaient causer des aberrations sphériques pour un faisceau de diamètre 7mm (dimension maximale du faisceau dans ce plan optique). Il est prévu de mettre en place des lentilles de focales plus grandes ($40, 50\text{mm}$) pour tenter de solutionner ce problème.



L'objectif utilisé est un $x40$ Apo $NA=1.0$, Nikon (Nikon Instruments, Japan). Les pixels sont de dimension $195\text{nm} \times 195\text{nm}$.

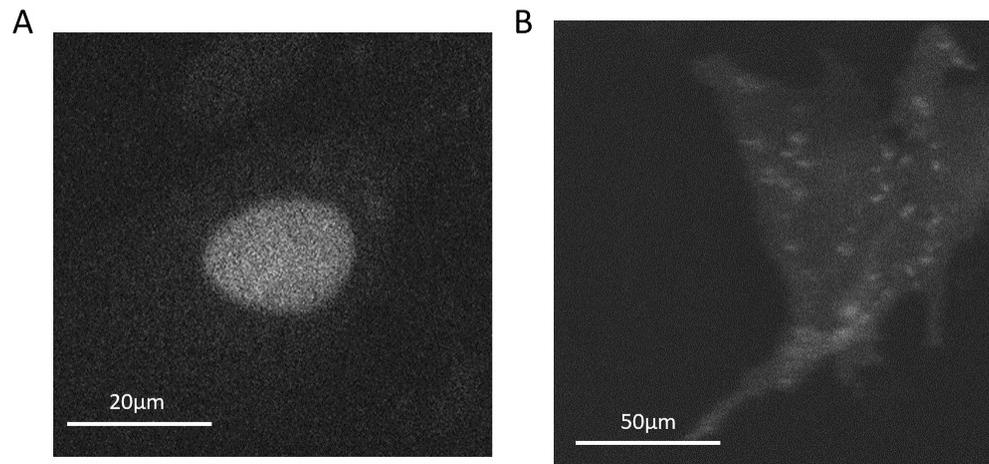
FIGURE 5.6 – Billes de différentes tailles en mode confocal

Après amélioration et une fois nos images nettes et sans aberration, une caractérisation des profils des PSF aura lieu, ainsi qu'une évaluation d'efficacité de transmission.

5.2.2 Images sur échantillons biologiques

Bien que notre mode d'illumination confocale ne soit pas encore parfaitement fonctionnelle, j'ai réalisé des tests sur échantillons biologiques, afin d'évaluer des échantillons moins fluorescents que des échantillons standards.

Il reste encore à améliorer les performances de notre mode illumination confocale, néanmoins, les résultats exposés fig. 5.7 sont encourageants. La méthode de balayage



(A) Cellules U2OS marquées CT1-GFP (nucléaire) (B) Cellules U2OS marquées ORAI-Dendra2 (membranaire)

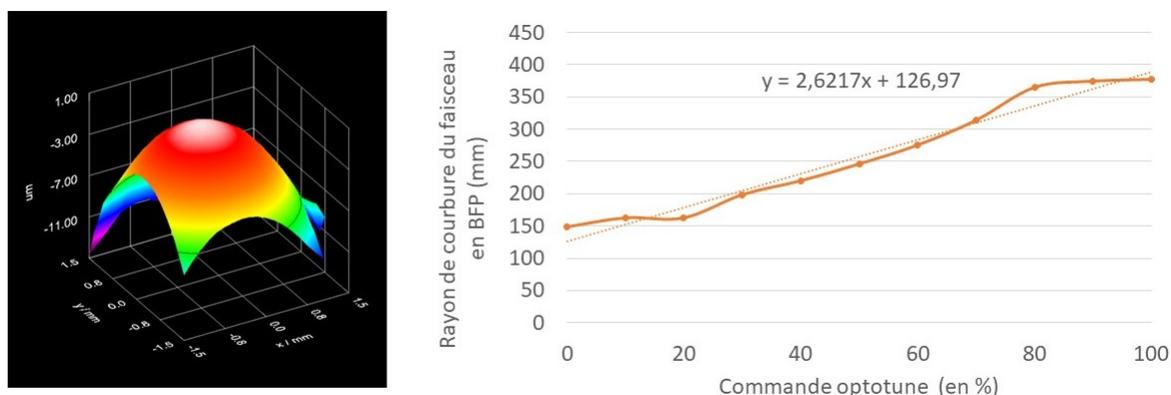
FIGURE 5.7 – Echantillons biologiques en mode confocal

et de reconstruction de l'image en mode confocal explicité par Ferrand et al. est efficace pour réaliser des images de manière simple.

5.3 Caractérisation du mode LSFM

5.3.1 Caractérisation de la divergence du faisceau en BFP de l'objectif fonction de la lentille à focale variable

Comme décrit dans la section 2.1.2, afin de faire focaliser le faisceau en sortie d'objectif, plus loin que la distance de travail, le faisceau doit arriver divergent en pupille arrière. C'est le rôle de l'optotune, commandée en tension, que de faire varier le point de focalisation.

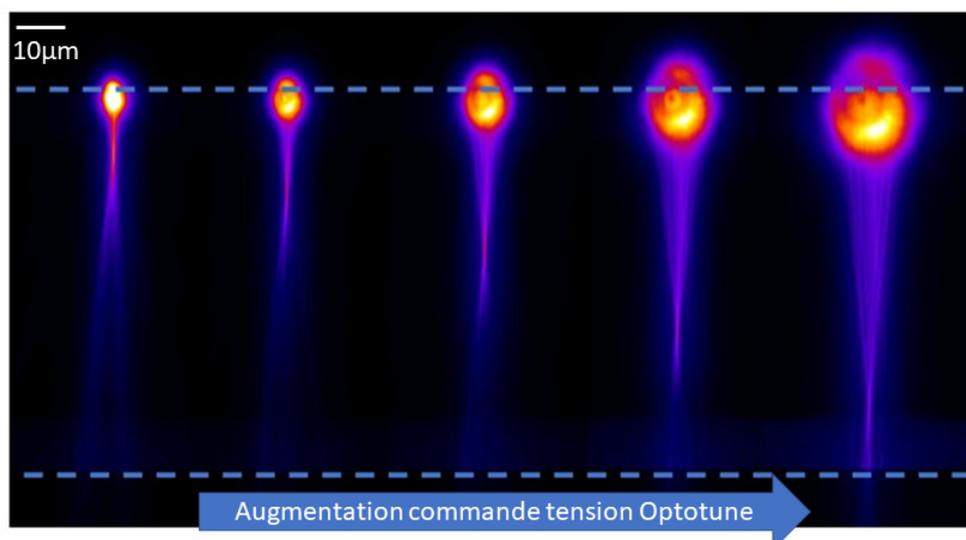


Les mesures d'analyse du front d'onde ont été réalisées grâce à un Shack-Hartmann Thorlabs (ref WFS40-7AR(/M)). La commande Optotune est réalisée en tension (0-5V). 0% correspond donc à 0V et 100% correspond à 5V. La commande en tension est ensuite convertie en commande en courant par le driver de l'Optotune, qui se commande en direct par une intensité de courant (en A). L'erreur d'ajustement (entre front d'onde mesuré et front d'onde reconstruit) est de l'ordre de 10^{-10} arcmin.

FIGURE 5.8 – Mesure du rayon de courbure de faisceau en pupille arrière de l'objectif fonction de la commande Optotune

La divergence d'un faisceau se mesure à l'aide du rayon de courbure (RoC, en mm). J'ai donc tracé le graphique RoC fonction de la commande en tension, afin de vérifier la réponse de notre lentille à focale variable en pupille arrière de notre objectif. Sur le graphique 5.8, nous remarquons donc que pour les commandes en tension entre 20% et 80% la réponse de l'optotune sur le rayon de courbure en pupille arrière de l'objectif est monotone croissante. De ce fait, nous avons un rayon de courbure de plus en plus grand (entre 150 et 350mm), ce qui veut dire que sur cette plage de

tension, le faisceau est de plus en plus divergent en pupille arrière, ce qui va se solder par un faisceau qui focalisera de plus en plus loin en sortie d'objectif comme l'illustre la figure 5.9.

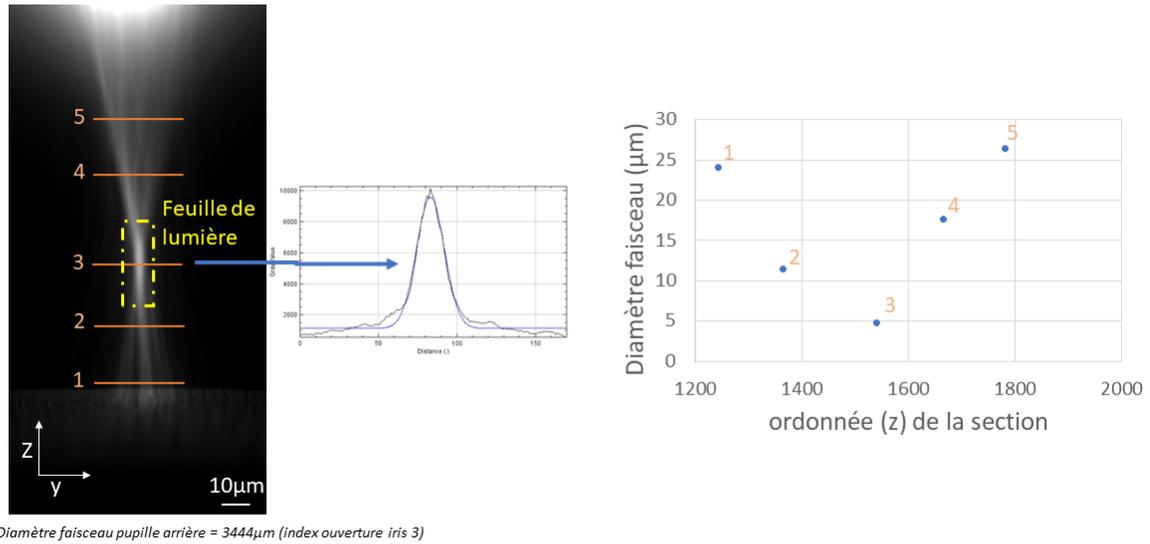


Les lignes pointillées bleues désignent la position des miroirs. L'objectif utilisé est un x40 Apo Nikon (Nikon Instruments, Japan). La visualisation du faisceau se fait grâce à la présence de fluorescéine dans les puits décrits par les micro-miroirs. Le waist du faisceau se focalise de plus en plus loin, proportionnellement à la commande en tension de l'Optotune.

FIGURE 5.9 – Pouvoir de défocalisation du faisceau en sortie d'objectif sous l'action de l'Optotune

5.3.2 Caractérisation des dimensions de la feuille de lumière

L'utilisation de l'iris variable motorisée est utile dans le mode « feuille de lumière » car il permet de modifier le diamètre du waist du faisceau en sortie d'objectif (ce qui constituera l'épaisseur de la feuille de lumière), ainsi que la longueur de Rayleigh (ce qui constituera la longueur de la feuille de lumière). La longueur de Rayleigh est une grandeur qui dépend directement du waist, puisque c'est la distance (comptée en partant du waist) au bout de laquelle la taille du faisceau a augmenté d'un facteur $\sqrt{2}$. Ainsi, le diamètre du faisceau en pupille arrière de l'objectif fait varier la taille du waist en sortie d'objectif, qui impacte de ce fait la distance de Rayleigh. Afin de caractériser les dimensions, j'ai utilisé la méthode suivante décrite figure 5.10.

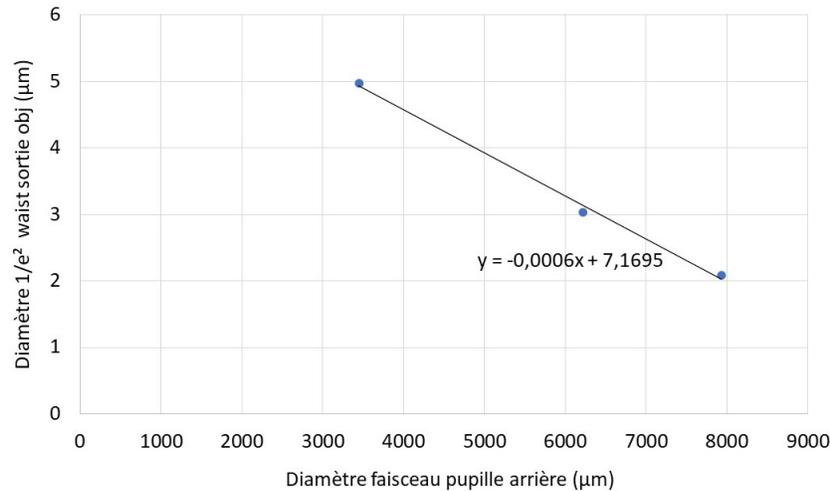


L'image du faisceau a été réalisée dans de la fluorescéine. Les différentes coupes de la feuille de lumière, ainsi que les ajustements gaussiens ont été réalisés grâce à Fiji. La graphique correspond au diamètre du faisceau en μm à différents endroits de la feuille de lumière (segments représentés sur l'image). Chaque valeur du graphique est la moyenne de 3 mesures, les écarts-types ont une valeur inférieure à 0,1 μm.

FIGURE 5.10 – Caractérisation épaisseur et longueur de la feuille de lumière

J'ai réalisé une feuille de lumière sans balayage, ni lentille cylindrique : de ce fait, la feuille de lumière est un faisceau LASER simplement réfléchi sur le micro-miroir, dans la fluorescéine. Afin de n'induire aucun effet de l'Optotune sur les mesures, celle-ci a été enlevée pour réaliser ces images. Cette feuille de lumière a été réalisée avec un diamètre de faisceau en pupille arrière de 3444 μm (index 3 sur ouverture iris). L'épaisseur de la feuille de lumière est donc le waist de ce faisceau, il a été calculé en réalisant la coupe (ici coupe n°3 sur figure 5.10) de la portion la plus fine du faisceau. L'ajustement par une fonction gaussienne a été réalisé grâce à la fonction « Add fit » de Fiji. Selon les propriétés des faisceaux gaussiens, nous devrions retrouver une distribution gaussienne de l'intensité lumineuse selon une coupe en y, mais également en z. Le graphique de la figure 5.10, nous montre la valeur du diamètre du faisceau à différentes sections en z du faisceau.

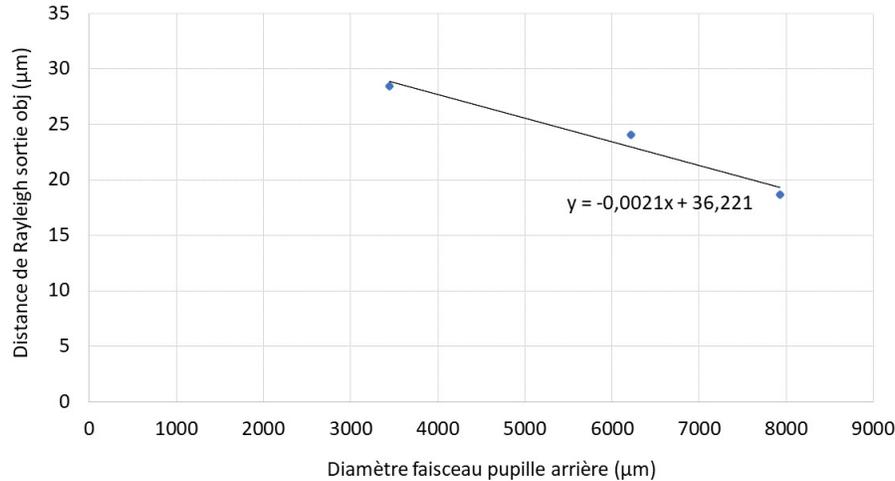
Nous considérerons que la largeur à $1/e^2$ de la gaussienne issue de la section en z est une observable adéquate pour décrire la longueur de Rayleigh, afin d'avoir une idée de la longueur de la feuille de lumière.



L'objectif est un $\times 40$ Apo $NA=1.0$, Nikon (Nikon Instruments, Japan). 10 mesures par condition ont été réalisées. L'écart-type des mesures est inférieur à $0,05\mu\text{m}$.

FIGURE 5.11 – Epaisseur feuille de lumière fonction de la taille du faisceau en pupille arrière de l'objectif

Avec l'objectif utilisé pour la caractérisation du mode feuille de lumière ($\times 40$ Apo $NA=1.0$ Nikon), nous obtenons des épaisseurs de feuilles de lumière entre 2 et $5\mu\text{m}$, pour des diamètres de faisceau en pupille arrière de l'objectif entre 3400 et $8000\mu\text{m}$ (voir fig. 5.11). L'utilisation de l'iris variable pour réaliser différentes épaisseurs de feuilles de lumière est donc validée. Concernant la distance de Rayleigh (fig. 5.12), nous observons le même constat : la variation du diamètre du faisceau en pupille arrière fait varier la distance de Rayleigh. Pour un diamètre de faisceau de $3444\mu\text{m}$, nous obtenons une longueur de feuille de lumière de $28,5\mu\text{m}$ pour une épaisseur de $4,97\mu\text{m}$. Avec cet objectif, nous pouvons par exemple réaliser des feuilles de lumière de (épaisseur ; longueur) : ($4,97\mu\text{m}$; $28,5\mu\text{m}$), ($3,03\mu\text{m}$; $24\mu\text{m}$) ou encore ($2,09\mu\text{m}$; $18,7\mu\text{m}$).

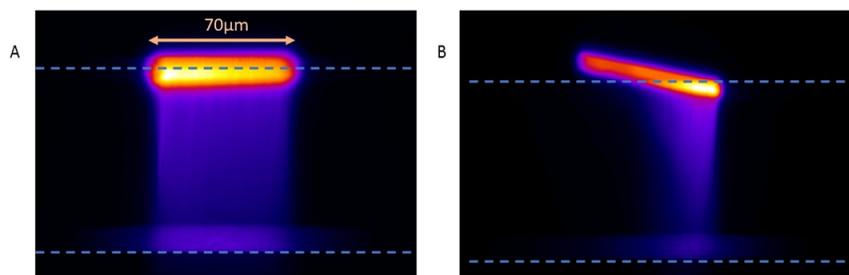


L'objectif est un $\times 40$ Apo $NA=1.0$, Nikon (Nikon Instruments, Japan). 10 mesures par condition ont été réalisées. L'écart-type des mesures est inférieure à $0,3\mu\text{m}$.

FIGURE 5.12 – Longueur feuille de lumière fonction de la taille du faisceau en pupille arrière de l'objectif

Fonction des échantillons à étudier, on choisira alors divers objectifs pour obtenir des dimensions de feuilles de lumière différentes.

Concernant la largeur de la feuille de lumière, en mode balayage, elle est parfaitement ajustable à souhait par l'opérateur : la seule limitation étant le vignettage sur les montures optiques (voir fig 5.13).



L'objectif utilisé est un $\times 40$ Apo $NA=1.0$, Nikon (Nikon Instruments, Japan). En bleu sont représentés les bords du miroir.

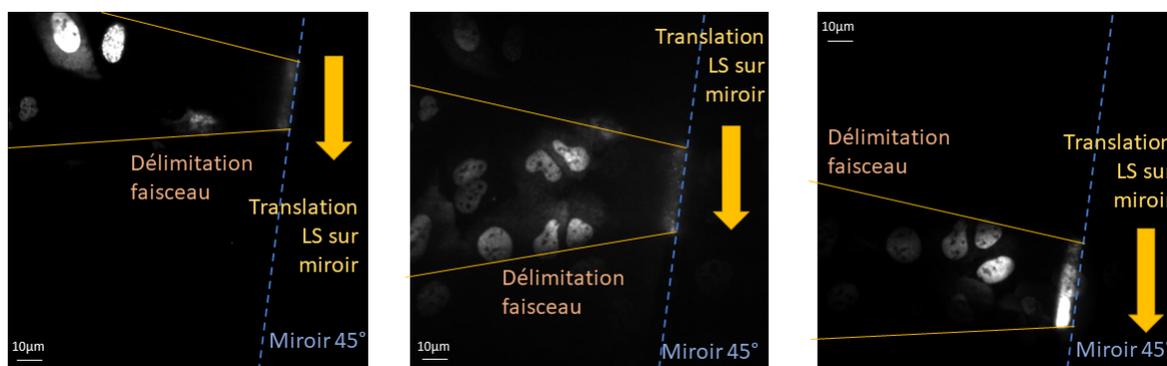
(A) La largeur de la feuille de lumière en mode balayage (scanning) est ajustable, mode « réglage assiette » activé. (B) Mode « réglage assiette » non activé.

FIGURE 5.13 – Largeur de la feuille de lumière et réglage de l'assiette

Lorsque la feuille de lumière est plus large, nous pouvons nous rendre compte plus facilement que la feuille de lumière n'est pas parfaitement perpendiculaire à l'axe optique, il existe un angle, appelé angle d'assiette, que nous cherchons à corriger. Pour régler ce problème, j'ai développé une fonction numérique dans le logiciel ScanVision, permettant d'activer le scanner orthogonal à celui qui balaye afin de supprimer cet angle. Cette commande est paramétrable dans le panneau de configuration du logiciel.

5.3.3 Images sur échantillons biologiques

L'utilisation des micro-miroirs sur échantillons biologiques reste encore à travailler afin de se familiariser à cette utilisation. Néanmoins, j'ai réalisé un premier test sur une culture 2D de cellules U2OS avec un marquage nucléaire (CT1wt-N-Halo, JF 549), voir fig. 5.14.



En bleu pointillé sont représentés les miroirs à 45°, en orange sont représentés les contours du faisceau. La flèche jaune montre le changement de direction de la position de la feuille de lumière sur le miroir, éclairant de manière préférentielle une portion du champ de vue.

L'objectif utilisé est un x40 Apo NA=1.0, Nikon (Nikon Instruments, Japan)

FIGURE 5.14 – Preuve de concept feuille de lumière sur échantillon biologique

Cette expérience nous montre qu'il est donc possible de réaliser un éclairage par la tranche sur échantillon biologique. Notre logiciel permet d'ajuster la largeur de la feuille de lumière comme l'utilisateur le souhaite, et de traduire dans toutes les directions la feuille de lumière. Il est également possible d'inverser les commandes X-Y si l'on souhaite. La figure 5.14 illustre le déplacement de la feuille de lumière sur

un tapis cellulaire, nous voyons qu'en déplaçant la feuille de lumière, nous éclairons préférentiellement une partie de l'échantillon. Sur ces images nous remarquons que la faisceau semble diverger, probablement dû à une commande optotone non adéquate. Comme évoqué plus haut, par manque de temps, je n'ai pas pu bien prendre en main l'imagerie par feuille de lumière sur échantillon biologique. Il est prévu de continuer le développement après avoir rendu le manuscrit de thèse.

5.3.4 Perspectives mode LSFM

Nos preuves de concepts ont montré que nos micro-miroirs combinés à notre module de microscopie StellarScan étaient aptes à produire une illumination par feuille de lumière. Les caractérisations sont encourageantes et nos dimensions de feuilles de lumière sont semblables à l'état de l'art [50]. Néanmoins, quelques points de développement n'ont pas pu être abouti manque de temps :

- La fonction *rolling shutter*, afin de synchroniser le déplacement du waist sur l'échantillon avec l'ouverture ligne par ligne de notre caméra. Cette fonction a été étudiée et implémentée dans le logiciel néanmoins, nous sommes limités d'un point de vue pilotage électronique du capteur. La fonction logicielle de base avait été conçue pour pouvoir déterminer une ROI capteur pour procéder au rolling, le but étant de définir la région capteur que le waist peut parcourir. Néanmoins il n'a pas été possible de réaliser cette fonction à cause des limitations de pilotage électronique. A l'heure actuelle, bien que le rolling soit paramétrable et fonctionnel il ne marche que sur l'intégralité du capteur, non pas sur une ROI. Pour pouvoir l'utiliser, il faudrait que le waist LASER balaye sur tout le capteur (avec un objectif x40, il balaye environ la moitié).

- L'exploitation du mode feuille de lumière avec lentille cylindrique sur échantillon biologique n'a pas été testée. En règle générale, l'utilisation du mode feuille de lumière (par balayage ou lentille cylindrique) sur échantillon biologique mérite davantage de manipulations pour être parfaitement maîtrisée.

- La fonction de sélection de plans d'imagerie comme évoqué par Galland et al. n'apparaît pas dans ce prototype à l'heure actuelle et mériterait d'être implémentée dans notre module.

5.4 Caractérisation du mode HiLo/TIRF

5.4.1 Mesure de l'épaisseur de la quasi-feuille de lumière fonction de l'iris variable

J'ai cherché à caractériser l'épaisseur de la quasi-feuille de lumière en mode HiLo, afin de vérifier si nous obtenons expérimentalement les mêmes dimensions théoriques. Pour commencer et conformément à l'article de l'inventeur de l'HiLo, Tokunaga [147], il m'a fallu déterminer l'angle d'inclinaison du faisceau (voir fig. 2.3). A ma connaissance, je ne connais pas de manière rapide pour mesurer l'angle d'un faisceau en sortie d'objectif. Par contre, je peux mesurer de manière simple le décalage de position de mon faisceau focalisé en pupille arrière de l'objectif, appelé x . Grâce à la formule tirée de Tokunaga et al., θ l'angle d'inclinaison du faisceau, peut se calculer de la manière suivante : $\theta = \arcsin(x/n/f_{obj})$, n étant l'indice optique de mon échantillon, et f_{obj} la focale de mon objectif. Ainsi, j'ai réalisé un angle de $80,6^\circ$ en décalant mon point focal de 4,3mm par rapport à l'axe optique dans la pupille arrière de l'objectif. L'épaisseur de la quasi-feuille de lumière dz vaut $R/\tan(\theta)$, R étant le diamètre de l'illumination sur l'échantillon. A l'aide d'une lamelle de microscope où nous avons déposé une fine couche de billes de 40 nm, nous avons pu obtenir ce qui s'apparente être une mono-couche fluorescente. L'intersection du faisceau incliné à $80,6^\circ$ nous donne R le diamètre de l'illumination sur échantillon. En mesurant le diamètre R , j'ai pu remonter à l'épaisseur par le calcul. J'ai effectué différentes mesures à différentes ouvertures de l'iris variable, j'obtiens au final la figure suivante 5.15. Nos résultats sont assez proches de la théorie pour un angle de 81° . De ce fait, l'ajout de l'iris variable dans notre dispositif nous permet de réaliser, pour cet angle, des faisceaux d'épaisseurs allant de $6\mu\text{m}$ à $30\mu\text{m}$.

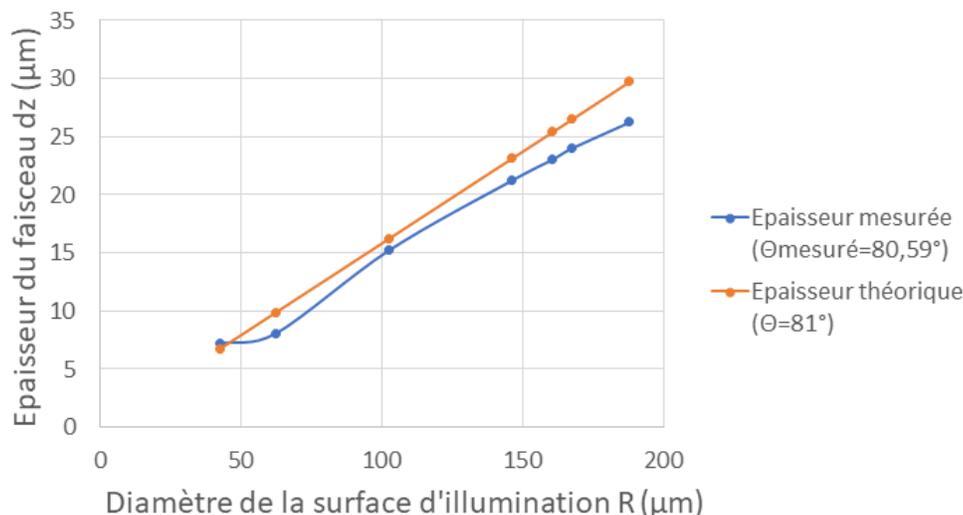


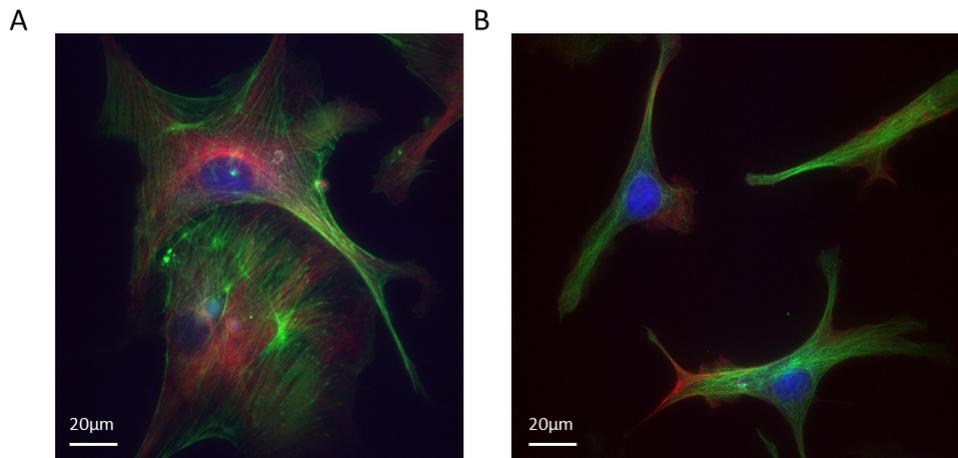
FIGURE 5.15 – Mesure de l'épaisseur de faisceau en mode HiLo

Notre mode d'illumination HiLo a donc des performances proches de ce que l'on attendait théoriquement. Notons que le mode d'imagerie HiLo est assez modulable : l'épaisseur du faisceau dépendant directement du diamètre de la surface d'illumination (donc de l'ouverture de l'iris variable), et de l'angle en sortie d'objectif (donc de la translation du faisceau en pupille arrière), nous pouvons de cette manière ajuster notre illumination de manière simple.

5.4.2 Images sur échantillons biologiques

Afin de vérifier l'efficacité de notre mode d'illumination HiLo, j'ai donc utilisé des lames préparées « Fluo Cells » (ref : Molecular Probes™ FluoCells™ n°2). Ce genre d'échantillon ne représente pas un gros challenge en terme d'acquisition du signal car le marquage fluorescent est fort. Cependant, c'est un bon point de départ pour vérifier l'homogénéité de l'illumination.

La figure 5.16 a été réalisée avec un champ de 200µm environ, c'est-à-dire à ouverture maximale de l'iris variable. Nous remarquons que l'illumination n'est pas parfaitement homogène, ce qui est caractéristique de l'illumination HiLo. Afin de solutionner le problème, il est possible de réaliser une fonction HiLo azimuthal qui permet de faire tourner très vite le faisceau (vitesse de révolution \gg vitesse d'acquisition de la caméra) en sortie d'objectif afin de moyenner l'illumination. Cette

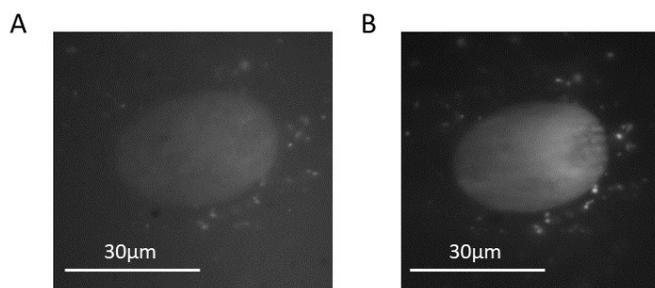


Référence échantillon : Molecular Probes™ FluoCells™ n°2 « *FluoCells prepared slide #2 contains bovine pulmonary artery endothelial cells (BPAEC). Texas Red-X phalloidin is labeling the F-actin, anti-bovine α -tubulin mouse monoclonal 236-10501 in conjunction with BODIPY FL goat anti-mouse IgG antibody is labeling microtubules, and DAPI is labeling the nucleus.* » L'objectif utilisé est un *x60 Apo TIRF NA=1.45, Nikon (Nikon Instruments, Japan)*

FIGURE 5.16 – FluoCells n°2 (Molecular Probes) en mode HiLo

fonction a été testée sous Métamorph et serait implémentable sur une version 2 du logiciel ScanVision.

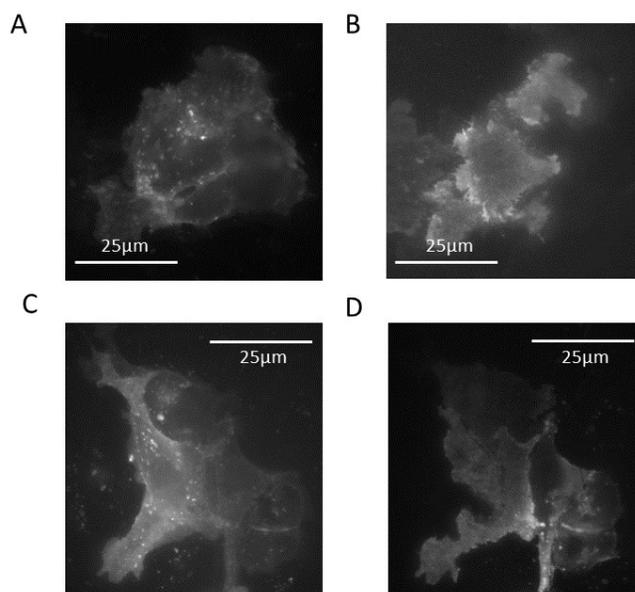
Afin de complexifier l'acquisition du signal, j'ai réalisé des images sur cellules vivantes avec un marquage fluorescent moins fort, comme celui utilisé pour réaliser des expériences de FCS sur cellules U2OS avec un marquage nucléaire CT1-GFP (0,5-1 μ g de plasmide transfecté) voir figure 5.17. Nous remarquons dans un premier temps qu'en illumination épifluorescente (figure 5.17 A), le signal nucléaire se démarque peu du signal background : le rapport signal/bruit vaut 1,7, contrairement à l'illumination en HiLo (figure 5.17 B), où le contraste est bien plus élevé avec un rapport signal sur bruit de 3,3. En somme, nous obtenons un rapport 1,9 entre les SNR, ce qui fait fait écho à l'article de Tokunaga.



(A) *Illumination en épifluorescence* (B) *Illumination HiLo*

FIGURE 5.17 – Cellule U2OS marquée CT1-GFP

Concernant le mode TIRF, qui n'a pas encore été discuté jusqu'à présent, j'ai réalisé une preuve de concept de son bon fonctionnement sur échantillon biologique.



(A) *Illumination HiLo* (B) *Illumination TIRF sur la même cellule que (A)*
(C) *Illumination HiLo* (D) *Illumination TIRF sur la même cellule que (C)*

FIGURE 5.18 – Cellules U2OS marquées ORAI-dendra2

Comme nous le remarquons figure 5.18 sur des cellules U2OS avec un marquage membranaire ORAI-Dendra2, le module StellarScan permet d'alterner entre illumination HiLo et TIRF à la façon d'un microscope commercial. Les images 5.18 B et C montrent les points d'ancrage des cellules sur la lamelle de microscope, nous pouvons visualiser la membrane des cellules sur les premiers 100 nm.

Chapitre 6

Conclusion et perspectives

Le projet StellarScan, réalisé en collaboration avec l'entreprise Errol, est un projet multi-thématiques mélangeant optique, électronique et informatique. Ce premier prototype est en cours de finalisation, notamment sur la partie optique qui nécessite encore quelques développements. Afin de déterminer les perspectives du projet dans son ensemble, j'ai répertorié les prochaines étapes de développement en trois axes (1) les perspectives du module optique, (2) l'amélioration du design des micro-miroirs à 45° et ensuite, (3) l'évolution du logiciel ScanVision.

6.1 Perspectives module optique

Bien que le prototype soit amené à évoluer constamment, le StellarScan dans sa version 1 est un projet qui est sur le point d'aboutir et d'être utilisé de manière routinière pour nos acquisitions. Pour les prochaines étapes, nous allons nous focaliser sur la finalisation de la détection confocale, qui à l'heure actuelle, ne permet pas d'opérer une image nette et sans aberration. Le mode confocal était à la base développé pour réaliser des mesures de FCS, nous sommes actuellement en train de réaliser des tests de mesures de corrélation de fluorescence à l'aide d'un corrélateur digital (correlator.com). Concernant le mode feuille de lumière, le module optique est bien adapté pour réaliser des feuilles de lumière en mode balayage ou en mode statique. Il reste à prendre en main et de trouver l'art et la manière de réaliser des images sur échantillon biologique. Il sera également possible de réaliser et de maîtriser, comme Galland et al., l'aspect de sélection des plans d'imagerie en z qui n'a pas été développé durant ces trois ans de thèse. Le mode HiLo/TIRF, quant à lui est

tout à fait abouti et fonctionne de manière usuelle.

6.2 Perspectives micro-miroirs

Nos micro-miroirs, qui se veulent simples et rapides à produire, par la diminution du nombre d'étapes de micro-fabrication sont fonctionnels. Néanmoins, je pense qu'ils mériteraient d'être davantage adaptés à l'imagerie biologique. Pour cela, l'idée est de faire évoluer le système et de prévoir des lamelles de microscope texturisées permettant la duplication des cellules sur des lignes de dimensions semblables à nos puits. De ce fait, les micro-miroirs viendraient se déposer entre les lignes sans « écraser » le milieu biologique, comme il en est question aujourd'hui.

6.3 Perspectives logiciels

Le logiciel dans sa version 1 est tout à fait manipulable et fonctionne de manière stable pour le pilotage et l'acquisition du signal. Néanmoins, deux améliorations mériteraient de voir le jour : (1) la finalisation de la modalité *rolling shutter* comme explicitée précédemment, et de (2) une gestion informatique des images (acquisition + enregistrement) plus rapide pour des grands volumes (en SPT, nous pouvons enregistrer des stacks images de 5000 images par exemple). L'utilisation d'un autre langage informatique (par exemple, le langage C) serait plus approprié pour une version industrialisable du logiciel.

L'outil StellarScan, une fois terminé, sera de grande utilité pour nos applications de dynamique moléculaire. Le couplage des techniques de mesure de dynamique y est multiple. La combinaison de l'illumination confocale, et des illuminations « plein champ » fait de cet outil, un instrument modulable. Au delà de la combinaison SPT/FCS, il est également possible d'associer FRAP/SPT, et pourquoi pas FLIM-FRET/SPT avec l'ajout d'un module TSCPC.

L'objectif de cet instrument est de le démocratiser à l'utilisation par les biologistes souhaitant réaliser des mesures de dynamique moléculaire de manière simple. Il serait également intéressant d'ouvrir les applications du StellarScan, non pas uniquement à l'étude des cultures cellulaires 2D, mais aux organoïdes et cultures 3D. Il faudrait pour cela, revoir la géométrie des micro-miroirs pour pouvoir y insérer les organoïdes.

Bibliographie

- [1] Woringer - 2019 - Anomalous diffusion in living cells bridging the gap between experiments and models through collaborative challenges.pdf.
- [2] C. M. Anderson, G. N. Georgiou, I. E. Morrison, G. V. Stevenson, and R. J. Cherry. Tracking of cell surface receptors by fluorescence digital imaging microscopy using a charge-coupled device camera. Low-density lipoprotein and influenza virus receptor mobility at 4 degrees C. *J. Cell. Sci.*, 101 (Pt 2) :415–425, February 1992.
- [3] D Axelrod. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of Cell Biology*, 89(1) :141–145, April 1981.
- [4] D. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W.W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16(9) :1055–1069, September 1976.
- [5] Daniel Axelrod. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology. *Traffic*, 2(11) :764–774, 2001.
- [6] Daniel Axelrod. Evanescent Excitation and Emission in Fluorescence Microscopy. *Biophys J*, 104(7) :1401–1409, April 2013.
- [7] A. Bancaud, C. Lavelle, S. Huet, and J. Ellenberg. A fractal model for nuclear organization : current evidence and biological implications. *Nucleic Acids Research*, 40(18) :8783–8792, October 2012.
- [8] Aurélien Bancaud, Sébastien Huet, Nathalie Daigle, Julien Mozziconacci, Joël Beaudouin, and Jan Ellenberg. Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *The EMBO Journal*, 28(24) :3785–3798, December 2009. Publisher : John Wiley & Sons, Ltd.

- [9] Daniel S. Banks, Charmaine Tressler, Robert D. Peters, Felix Höfling, and Cécile Fradin. Characterizing anomalous diffusion in crowded polymer solutions and gels over five decades in time with variable-lengthscale fluorescence correlation spectroscopy. *Soft Matter*, 12(18) :4190–4203, May 2016. Publisher : The Royal Society of Chemistry.
- [10] William R. Benner. *Laser Scanners : How They Work, and How They Can Work for Your Product : Technologies and Applications*. Pangolin, June 2016. Google-Books-ID : o6elDAEACAAJ.
- [11] Bruce J. Berne and Robert Pecora. *Dynamic Light Scattering : With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Courier Corporation, January 2000. Google-Books-ID : vBB54ABhmuEC.
- [12] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Harald F. Hess. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313(5793) :1642–1645, September 2006. Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Report.
- [13] Gabriel Bidaux, Corentin Le Nézet, Mariano Gonzalez Pisfil, Mélanie Henry, Alessandro Furlan, Oliver Bensaude, Bernard Vandembunder, and Laurent Hélot. FRET Image Correlation Spectroscopy Reveals RNAPII-Independent P-TEFb Recruitment on Chromatin. *Biophysical Journal*, 114(3) :522–533, February 2018.
- [14] David M. Blei, Alp Kucukelbir, and Jon D. McAuliffe. Variational Inference : A Review for Statisticians. *Journal of the American Statistical Association*, 112(518) :859–877, April 2017. Publisher : Taylor & Francis.
- [15] M. Boehning, C. Dugast-Darzacq, M. Rankovic, A. S. Hansen, T. Yu, H. Marie-Nelly, D.T. McSwiggen, G. Kokic, G. M. Dailey, P. Cramer, X. Darzacq, and M. Zweckstetter. RNA polymerase II clustering through CTD phase separation. preprint, Molecular Biology, May 2018.
- [16] Laurence N. Bohs, Barry H. Friemel, Bruce A. McDermott, and Gregg E. Trahey. A real time system for quantifying and displaying two-dimensional velocities using ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 19(9) :751–761, January 1993.

- [17] Jean-Philippe Bouchaud and Antoine Georges. Anomalous diffusion in disordered media : Statistical mechanisms, models and physical applications. *Physics Reports*, 195 :127–293, November 1990.
- [18] Denis Boyer, David S. Dean, Carlos Mejía-Monasterio, and Gleb Oshanin. Optimal estimates of the diffusion coefficient of a single Brownian trajectory. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 85(3 Pt 1) :031136, March 2012.
- [19] Alexandre J. C. Quaresma, Andrii Bugai, and Matjaz Barboric. Cracking the control of RNA polymerase II elongation by 7SK snRNP and P-TEFb. *Nucleic Acids Res*, 44(16) :7527–7539, September 2016.
- [20] Alexandre J. C. Quaresma, Andrii Bugai, and Matjaz Barboric. Cracking the control of RNA polymerase II elongation by 7SK snRNP and P-TEFb. *Nucleic Acids Research*, 44(16) :7527–7539, September 2016.
- [21] Yun-Pei Chang, Fabien Pinaud, Joshua Antelman, and Shimon Weiss. Tracking bio-molecules in live cells using quantum dots. *J Biophotonics*, 1(4) :287–298, September 2008.
- [22] Sheng-Hao Chao and David H. Price. Flavopiridol Inactivates P-TEFb and Blocks Most RNA Polymerase II Transcription in Vivo. *J. Biol. Chem.*, 276(34) :31793–31799, August 2001.
- [23] Michael K. Cheezum, William F. Walker, and William H. Guilford. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophysical journal*, 81(4) :2378–2388, 2001.
- [24] Fanqing Chen and Daniele Gerion. Fluorescent CdSe/ZnS Nanocrystal-Peptide Conjugates for Long-term, Nontoxic Imaging and Nuclear Targeting in Living Cells. *Nano Lett.*, 4(10) :1827–1832, October 2004. Publisher : American Chemical Society.
- [25] Nicolas Chenouard, Ihor Smal, Fabrice de Chaumont, Martin Maška, Ivo F. Sbalzarini, Yuanhao Gong, Janick Cardinale, Craig Carthel, Stefano Coraluppi, Mark Winter, Andrew R. Cohen, William J. Godinez, Karl Rohr, Yannis Kallaidzidis, Liang Liang, James Duncan, Hongying Shen, Yingke Xu, Klas E. G. Magnusson, Joakim Jaldén, Helen M. Blau, Perrine Paul-Gilloteaux, Philippe Roudot, Charles Kervrann, François Waharte, Jean-Yves Tinevez, Spencer L.

- Shorte, Joost Willemse, Katherine Celler, Gilles P. van Wezel, Han-Wei Dan, Yuh-Show Tsai, Carlos Ortiz de Solórzano, Jean-Christophe Olivo-Marin, and Erik Meijering. Objective comparison of particle tracking methods. *Nature Methods*, 11(3) :281–289, March 2014.
- [26] Sungyoo Cho, Sebastian Schroeder, and Melanie Ott. CYCLING through transcription : Post-translational modifications of P-TEFb regulate transcription elongation. *Cell Cycle*, 9(9) :1697–1705, May 2010.
- [27] Sungyoo Cho, Sebastian Schroeder, and Melanie Ott. CYCLING through transcription : posttranslational modifications of P-TEFb regulate transcription elongation. *Cell Cycle*, 9(9) :1697–1705, May 2010.
- [28] Won-Ki Cho, Namrata Jayanth, Brian P English, Takuma Inoue, J Owen Andrews, William Conway, Jonathan B Grimm, Jan-Hendrik Spille, Luke D Lavis, Timothée Lionnet, and Ibrahim I Cisse. RNA Polymerase II cluster dynamics predict mRNA output in living cells. *eLife*, 5, May 2016.
- [29] Won-Ki Cho, Namrata Jayanth, Brian P English, Takuma Inoue, J Owen Andrews, William Conway, Jonathan B Grimm, Jan-Hendrik Spille, Luke D Lavis, Timothée Lionnet, and Ibrahim I Cisse. RNA Polymerase II cluster dynamics predict mRNA output in living cells. *eLife*, 5 :e13617, May 2016.
- [30] I. I. Cisse, I. Izeddin, S. Z. Causse, L. Boudarene, A. Senecal, L. Muresan, C. Dugast-Darzacq, B. Hajj, M. Dahan, and X. Darzacq. Real-Time Dynamics of RNA Polymerase II Clustering in Live Human Cells. *Science*, 341(6146) :664–667, August 2013.
- [31] S. Condamin, O. Bénichou, and M. Moreau. First-Passage Times for Random Walks in Bounded Domains. *Physical Review Letters*, 95(26), December 2005.
- [32] S. Condamin, O. Bénichou, V. Tejedor, R. Voituriez, and J. Klafter. First-passage times in complex scale-invariant media. *Nature*, 450(7166) :77–80, November 2007.
- [33] Daniel S. Day, Bing Zhang, Sean M. Stevens, Francesco Ferrari, Erica N. Larschan, Peter J. Park, and William T. Pu. Comprehensive analysis of promoter-proximal RNA polymerase II pausing across mammalian cell types. *Genome Biol*, 17, June 2016.

- [34] Richard N. Day and Michael W. Davidson. The fluorescent protein palette : tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev*, 38(10) :2887–2921, October 2009.
- [35] Kevin M. Dean, Jennifer L. Lubbeck, Jennifer K. Binder, Linda R. Schwall, Ralph Jimenez, and Amy E. Palmer. Analysis of Red-Fluorescent Proteins Provides Insight into Dark-State Conversion and Photodegradation. *Biophys J*, 101(4) :961–969, August 2011.
- [36] Anup Dey, Farideh Chitsaz, Asim Abbasi, Tom Misteli, and Keiko Ozato. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *PNAS*, 100(15) :8758–8763, July 2003. Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences.
- [37] Robert M. Dickson, Andrew B. Cubitt, Roger Y. Tsien, and W. E. Moerner. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388(6640) :355–358, July 1997. Number : 6640 Publisher : Nature Publishing Group.
- [38] Christian Eggeling, Christian Ringemann, Rebecca Medda, Günter Schwarzmann, Konrad Sandhoff, Svetlana Polyakova, Vladimir N. Belov, Birka Hein, Claas von Middendorff, Andreas Schönle, and Stefan W. Hell. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*, 457(7233) :1159–1162, February 2009. Number : 7233 Publisher : Nature Publishing Group.
- [39] Mohamed El Beheiry, Maxime Dahan, and Jean-Baptiste Masson. Inference-MAP : mapping of single-molecule dynamics with Bayesian inference. *Nat. Methods*, 12(7) :594–595, July 2015.
- [40] Johan Elf, Gene-Wei Li, and X. Sunney Xie. Probing Transcription Factor Dynamics at the Single-Molecule Level in a Living Cell. *Science*, 316(5828) :1191–1194, May 2007. Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Report.
- [41] Fred Etoc, Elie Balloul, Chiara Vicario, Davide Normanno, Domenik Liße, Assa Sittner, Jacob Piehler, Maxime Dahan, and Mathieu Coppey. Non-specific interactions govern cytosolic diffusion of nanosized objects in mammalian cells. *Nature Materials*, 17(8) :740–746, August 2018. Number : 8 Publisher : Nature Publishing Group.

- [42] Cyril Favard, Jérôme Wenger, Pierre-François Lenne, and Hervé Rigneault. FCS Diffusion Laws in Two-Phase Lipid Membranes : Determination of Domain Mean Size by Experiments and Monte Carlo Simulations. *Biophys J*, 100(5) :1242–1251, March 2011.
- [43] Patrick Ferrand. GPScan.VI : A general-purpose LabVIEW program for scanning imaging or any application requiring synchronous analog voltage generation and data acquisition. *Computer Physics Communications*, 192 :342–347, July 2015.
- [44] Patrick Ferrand, Jérôme Wenger, and Hervé Rigneault. Fluorescence Correlation Spectroscopy. In Erwin J. G. Peterman and Gijs J. L. Wuite, editors, *Single Molecule Analysis*, volume 783, pages 181–195. Humana Press, Totowa, NJ, 2011. Series Title : Methods in Molecular Biology.
- [45] Charlotte Floderer, Jean-Baptiste Masson, Elise Boilley, Sonia Georgeault, Peggy Merida, Mohamed El Beheiry, Maxime Dahan, Philippe Roingeard, Jean-Baptiste Sibarita, Cyril Favard, and Delphine Muriaux. Single molecule localisation microscopy reveals how HIV-1 Gag proteins sense membrane virus assembly sites in living host CD4 T cells. *Sci Rep*, 8, November 2018.
- [46] C. A. French, I. Miyoshi, J. C. Aster, I. Kubonishi, T. G. Kroll, P. Dal Cin, S. O. Vargas, A. R. Perez-Atayde, and J. A. Fletcher. BRD4 bromodomain gene rearrangement in aggressive carcinoma with translocation t(15;19). *Am. J. Pathol.*, 159(6) :1987–1992, December 2001.
- [47] Koh Fujinaga. P-TEFb as A Promising Therapeutic Target. *Molecules*, 25(4), February 2020.
- [48] Alessandro Furlan, Florence Agbazahou, Mélanie Henry, Mariano Gonzalez-Pisfil, Corentin Le Nézet, Dorian Champelovier, Marie Fournier, Bernard Vandebunder, Gabriel Bidaux, and Laurent Hélot. P-TEFb et Brd4 : Acteurs de la levée de pause transcriptionnelle, possibles cibles thérapeutiques. *Med Sci (Paris)*, 34(8-9) :685–692, August 2018.
- [49] Dahlene Fusco, Nathalie Accornero, Brigitte Lavoie, Shailesh M. Shenoy, Jean-Marie Blanchard, Robert H. Singer, and Edouard Bertrand. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Current Biology*, 13(2) :161–167, 2003.

- [50] Remi Galland, Gianluca Grenci, Ajay Aravind, Virgile Viasnoff, Vincent Studer, and Jean-Baptiste Sibarita. 3D high- and super-resolution imaging using single-objective SPIM. *Nature Methods*, 12(7) :641–644, July 2015.
- [51] Arnaud Gautier, Alexandre Juillerat, Christian Heinis, Ivan Reis Corrêa, Maik Kindermann, Florent Beauflis, and Kai Johnsson. An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem. Biol.*, 15(2) :128–136, February 2008.
- [52] H Geerts, M De Brabander, R Nuydens, S Geuens, M Moeremans, J De Mey, and P Hollenbeck. Nanovid tracking : a new automatic method for the study of mobility in living cells based on colloidal gold and video microscopy. *Biophys J*, 52(5) :775–782, November 1987.
- [53] Hugo Geerts, Mark de Brabander, and Rony Nuydens. Nanovid microscopy. *Nature*, 351(6329) :765–766, June 1991. Number : 6329 Publisher : Nature Publishing Group.
- [54] Jeff Gelles, Bruce J. Schnapp, and Michael P. Sheetz. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature*, 331(6155) :450–453, February 1988.
- [55] R.N. Ghosh and W.W. Webb. Automated detection and tracking of individual and clustered cell surface low density lipoprotein receptor molecules. *Biophysical Journal*, 66(5) :1301–1318, May 1994.
- [56] Jonathan B. Grimm, Brian P. English, Jiji Chen, Joel P. Slaughter, Zhengjian Zhang, Andrey Revyakin, Ronak Patel, John J. Macklin, Davide Normanno, Robert H. Singer, Timothée Lionnet, and Luke D. Lavis. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat. Methods*, 12(3) :244–250, 3 p following 250, March 2015.
- [57] Anna-Karin Gustavsson, Petar N. Petrov, and W. E. Moerner. Light sheet approaches for improved precision in 3D localization-based super-resolution imaging in mammalian cells [Invited]. *Opt. Express, OE*, 26(10) :13122–13147, May 2018.
- [58] Taekjip Ha and Philip Tinnefeld. Photophysics of Fluorescent Probes for Single-Molecule Biophysics and Super-Resolution Imaging. *Annual Review of Physical Chemistry*, 63(1) :595–617, 2012.

- [59] Anders S. Hansen, Assaf Amitai, Claudia Cattoglio, Robert Tjian, and Xavier Darzacq. Guided nuclear exploration increases CTCF target search efficiency. preprint, Biophysics, December 2018.
- [60] Anders S. Hansen, Maxime Woringer, Jonathan B. Grimm, Luke D. Lavis, Robert Tjian, and Xavier Darzacq. Robust model-based analysis of single-particle tracking experiments with Spot-On, January 2018.
- [61] Marie-Lena I. E. Harwardt, Marina S. Dietz, Mike Heilemann, and Thorsten Wohland. SPT and Imaging FCS Provide Complementary Information on the Dynamics of Plasma Membrane Molecules. *Biophysical Journal*, 114(10) :2432–2443, May 2018. Publisher : Elsevier.
- [62] Hai-Tao He and Didier Marguet. Detecting Nanodomains in Living Cell Membrane by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*, 62(1) :417–436, 2011. _eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-032210-103402>.
- [63] Roger Heim and Roger Y. Tsien. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*, 6(2) :178–182, February 1996. Publisher : Elsevier.
- [64] Stefan W. Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11) :780, June 1994.
- [65] Gaëtan Herbomel. *Analyse de la dynamique du facteur de transcription HSF1 "Heat Shock Factor 1" par microscopie de fluorescence*. phdthesis, Université de Grenoble, October 2012.
- [66] Samuel T. Hess, Thanu P.K. Girirajan, and Michael D. Mason. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal*, 91(11) :4258–4272, December 2006.
- [67] Felix Höfling and Thomas Franosch. Anomalous transport in the crowded world of biological cells. *Reports on Progress in Physics*, 76(4) :046602, April 2013.
- [68] Sébastien Huet, Christophe Lavelle, Hubert Ranchon, Pascal Carrivain, Jean-Marc Victor, and Aurélien Bancaud. Chapter Thirteen - Relevance and Li-

- mitations of Crowding, Fractal, and Polymer Models to Describe Nuclear Architecture. In Ronald Hancock and Kwang W. Jeon, editors, *International Review of Cell and Molecular Biology*, volume 307 of *New Models of the Cell Nucleus : Crowding, Entropic Forces, Phase Separation, and Fractals*, pages 443–479. Academic Press, January 2014.
- [69] Ignacio Izeddin, Vincent Récamier, Lana Bosanac, Ibrahim I Cissé, Lydia Boudarene, Claire Dugast-Darzacq, Florence Proux, Olivier Bénichou, Raphaël Voituriez, Olivier Bensaude, Maxime Dahan, and Xavier Darzacq. Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus. *eLife*, 3, June 2014.
- [70] Moon Kyoo Jang, Kazuki Mochizuki, Meisheng Zhou, Ho-Sang Jeong, John N. Brady, and Keiko Ozato. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol. Cell*, 19(4) :523–534, August 2005.
- [71] Khuloud Jaqaman, Dinah Loerke, Marcel Mettlen, Hirotaka Kuwata, Sergio Grinstein, Sandra L. Schmid, and Gaudenz Danuser. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nature Methods*, 5(8) :695–702, August 2008. Number : 8 Publisher : Nature Publishing Group.
- [72] Iris Jonkers and John T. Lis. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3) :167–177, March 2015.
- [73] Alexandre Juillerat, Thomas Gronemeyer, Antje Keppler, Susanne Gendreizig, Horst Pick, Horst Vogel, and Kai Johnsson. Directed evolution of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase for efficient labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Chem. Biol.*, 10(4) :313–317, April 2003.
- [74] Balakrishnan Kannan, Jia Yi Har, Ping Liu, Ichiro Maruyama, Jeak Ling Ding, and Thorsten Wohland. Electron multiplying charge-coupled device camera based fluorescence correlation spectroscopy. *Anal. Chem.*, 78(10) :3444–3451, May 2006.
- [75] Philipp J. Keller, Annette D. Schmidt, Joachim Wittbrodt, and Ernst H. K. Stelzer. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science*, 322(5904) :1065–1069, November 2008.

- [76] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(15) :8206–8210, July 2000.
- [77] Lydia Kobbi, Emmanuelle Demey-Thomas, Floriane Braye, Florence Proux, Olga Kolesnikova, Joelle Vinh, Arnaud Poterszman, and Olivier Bensaude. An evolutionary conserved Hexim1 peptide binds to the Cdk9 catalytic site to inhibit P-TEFb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 113(45) :12721–12726, November 2016.
- [78] Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, and K. Barry Sharpless. Click Chemistry : Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11) :2004–2021, 2001. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/1521-3773%2820010601%2940%3A11%3C2004%3A%3AAID-ANIE2004%3E3.0.CO%3B2-5>.
- [79] Malgorzata Kramkowska and Irena Zubel. Silicon anisotropic etching in KOH and TMAH with modified surface tension. *Procedia Chemistry*, 1(1) :774–777, September 2009.
- [80] A. Krumm, T. Meulia, M. Brunvand, and M. Groudine. The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region. *Genes Dev.*, 6(11) :2201–2213, January 1992. Company : Cold Spring Harbor Laboratory Press Distributor : Cold Spring Harbor Laboratory Press Institution : Cold Spring Harbor Laboratory Press Label : Cold Spring Harbor Laboratory Press Publisher : Cold Spring Harbor Lab.
- [81] D. V. Lebedev, M. V. Filatov, A. I. Kuklin, A. Kh Islamov, E. Kentzinger, R. Pantina, B. P. Toperverg, and V. V. Isaev-Ivanov. Fractal nature of chromatin organization in interphase chicken erythrocyte nuclei : DNA structure exhibits biphasic fractal properties. *FEBS Lett.*, 579(6) :1465–1468, February 2005.
- [82] G. M. Lee, A. Ishihara, and K. A. Jacobson. Direct observation of brownian motion of lipids in a membrane. *PNAS*, 88(14) :6274–6278, July 1991. Publisher : National Academy of Sciences Section : Research Article.

- [83] H. Lee, K. W. Kraus, M. F. Wolfner, and J. T. Lis. DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of hsp70. *Genes Dev*, 6(2) :284–295, February 1992.
- [84] Pierre-François Lenne, Laure Wawrezynieck, Fabien Conchonaud, Olivier Wurtz, Annie Boned, Xiao-Jun Guo, Hervé Rigneault, Hai-Tao He, and Didier Marguet. Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J*, 25(14) :3245–3256, July 2006.
- [85] Florian Levet, Eric Hosy, Adel Kechkar, Corey Butler, Anne Beghin, Daniel Choquet, and Jean-Baptiste Sibarita. SR-Tesseler : a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nature Methods*, 12(11) :1065–1071, November 2015.
- [86] Chenge Li, Marie-Aude Plamont, Hanna L. Sladitschek, Vanessa Rodrigues, Isabelle Aujard, Pierre Neveu, Thomas Le Saux, Ludovic Jullien, and Arnaud Gautier. Dynamic multicolor protein labeling in living cells. *Chem. Sci.*, 8(8) :5598–5605, July 2017.
- [87] Chenge Li, Alison G. Tebo, and Arnaud Gautier. Fluorogenic Labeling Strategies for Biological Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7) :1473, July 2017.
- [88] Dong Li, Lin Shao, Bi-Chang Chen, Xi Zhang, Mingshu Zhang, Brian Moses, Daniel E. Milkie, Jordan R. Beach, John A. Hammer, Mithun Pasham, Tomas Kirchhausen, Michelle A. Baird, Michael W. Davidson, Pingyong Xu, and Eric Betzig. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science*, 349(6251), August 2015. Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Research Article.
- [89] Erez Lieberman-Aiden, Nynke L. van Berkum, Louise Williams, Maxim Imaekae, Tobias Ragoczy, Agnes Telling, Ido Amit, Bryan R. Lajoie, Peter J. Sabo, Michael O. Dorschner, Richard Sandstrom, Bradley Bernstein, M. A. Bender, Mark Groudine, Andreas Gnirke, John Stamatoyannopoulos, Leonid A. Mirny, Eric S. Lander, and Job Dekker. Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. *Science*,

- 326(5950) :289–293, October 2009. Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Report.
- [90] John Lim, Hwee Kuan Lee, Weimiao Yu, and Sohail Ahmed. Light sheet fluorescence microscopy (LSFM) : past, present and future. *The Analyst*, 139(19) :4758–4768, 2014.
- [91] Jennifer Lippincott-Schwartz and George H. Patterson. Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging. *Trends in Cell Biology*, 19(11) :555–565, November 2009.
- [92] Wen Liu, Qi Ma, Kaki Wong, Wenbo Li, Kenny Ohgi, Jie Zhang, Aneel K. Aggarwal, and Michael G. Rosenfeld. Brd4 and JMJD6-Associated Anti-Pause Enhancers in Regulation of Transcriptional Pause Release. *Cell*, 155(7) :1581–1595, December 2013.
- [93] Zhe Liu, Wesley R Legant, Bi-Chang Chen, Li Li, Jonathan B Grimm, Luke D Lavis, Eric Betzig, and Robert Tjian. 3D imaging of Sox2 enhancer clusters in embryonic stem cells. *eLife*, 3 :e04236, December 2014. Publisher : eLife Sciences Publications, Ltd.
- [94] Samuel J. Lord, Hsiao-lu D. Lee, and W. E. Moerner. Single-Molecule Spectroscopy and Imaging of Biomolecules in Living Cells. *Analytical Chemistry*, 82(6) :2192–2203, March 2010.
- [95] Georgyi V. Los and Keith Wood. The HaloTag : a novel technology for cell imaging and protein analysis. *Methods Mol. Biol.*, 356 :195–208, 2007.
- [96] Panpan Lu, Xiyang Qu, Yinzong Shen, Zhengtao Jiang, Pengfei Wang, Hanxian Zeng, Haiyan Ji, Junxiao Deng, Xinyi Yang, Xian Li, Hongzhou Lu, and Huanzhang Zhu. The BET inhibitor OTX015 reactivates latent HIV-1 through P-TEFb. *Sci Rep*, 6 :24100, April 2016.
- [97] Douglas Magde, Elliot Elson, and W. W. Webb. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29(11) :705–708, September 1972. Publisher : American Physical Society.
- [98] Douglas Magde, Elliot L. Elson, and Watt W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization.

- Biopolymers*, 13(1) :29–61, 1974. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bip.1974.360130103>.
- [99] Marcin Magdziarz, Aleksander Weron, Krzysztof Burnecki, and Joseph Klafter. Fractional brownian motion versus the continuous-time random walk : a simple test for subdiffusive dynamics. *Phys. Rev. Lett.*, 103(18) :180602, October 2009.
- [100] Suliana Manley, Jennifer M. Gillette, George H. Patterson, Hari Shroff, Harald F. Hess, Eric Betzig, and Jennifer Lippincott-Schwartz. High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature Methods*, 5(2) :155–157, February 2008. Number : 2 Publisher : Nature Publishing Group.
- [101] Gerald F. Marshall and Glenn E. Stutz. *Handbook of Optical and Laser Scanning*. CRC Press, October 2018. Google-Books-ID : PJjLBQAAQBAJ.
- [102] N. F. Marshall, J. Peng, Z. Xie, and D. H. Price. Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J. Biol. Chem.*, 271(43) :27176–27183, October 1996.
- [103] Nick F. Marshall and David H. Price. Purification of P-TEFb, a Transcription Factor Required for the Transition into Productive Elongation. *J. Biol. Chem.*, 270(21) :12335–12338, May 1995.
- [104] Marisa L. Martin-Fernandez and David T. Clarke. Single Molecule Fluorescence Detection and Tracking in Mammalian Cells : The State-of-the-Art and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*, 13(11) :14742–14765, November 2012.
- [105] J.-B. Masson, D. Casanova, S. Türkcan, G. Voisinne, M. R. Popoff, M. Vergassola, and A. Alexandrou. Inferring maps of forces inside cell membrane microdomains. *Phys. Rev. Lett.*, 102(4) :048103, January 2009.
- [106] Jean-Baptiste Masson, Patrice Dionne, Charlotte Salvatico, Marianne Renner, Christian G. Specht, Antoine Triller, and Maxime Dahan. Mapping the energy and diffusion landscapes of membrane proteins at the cell surface using high-density single-molecule imaging and Bayesian inference : application to the multiscale dynamics of glycine receptors in the neuronal membrane. *Biophys. J.*, 106(1) :74–83, January 2014.

- [107] Akiko Masuda, Kiminori Ushida, and Takayuki Okamoto. Direct observation of spatiotemporal dependence of anomalous diffusion in inhomogeneous fluid by sampling-volume-controlled fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. E*, 72(6) :060101, December 2005. Publisher : American Physical Society.
- [108] Alexa L. Mattheyses, Sanford M. Simon, and Joshua Z. Rappoport. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. *J. Cell. Sci.*, 123(Pt 21) :3621–3628, November 2010.
- [109] Mikhail V. Matz, Arkady F. Fradkov, Yulii A. Labas, Aleksandr P. Savitsky, Andrey G. Zaraisky, Mikhail L. Markelov, and Sergey A. Lukyanov. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, 17(10) :969–973, October 1999. Number : 10 Publisher : Nature Publishing Group.
- [110] R Metzler, V Tejedor, Y He, W H Deng, S Burov, and E Barkai. ANALYSIS OF SINGLE PARTICLE TRAJECTORIES : FROM NORMAL TO ANOMALOUS DIFFUSION. page 17.
- [111] Xavier Michalet. Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error : Brownian motion in an isotropic medium. *Physical Review E*, 82(4), October 2010.
- [112] Xavier Michalet and Andrew J. Berglund. Optimal diffusion coefficient estimation in single-particle tracking. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 85(6 Pt 1) :061916, June 2012.
- [113] Nilah Monnier, Zachary Barry, Hye Yoon Park, Kuan-Chung Su, Zachary Katz, Brian P. English, Arkajit Dey, Keyao Pan, Iain M. Cheeseman, Robert H. Singer, and Mark Bathe. Inferring transient particle transport dynamics in live cells. *Nat. Methods*, 12(9) :838–840, September 2015.
- [114] Nilah Monnier, Syuan-Ming Guo, Masashi Mori, Jun He, Péter Lénárt, and Mark Bathe. Bayesian Approach to MSD-Based Analysis of Particle Motion in Live Cells. *Biophys J*, 103(3) :616–626, August 2012.
- [115] Lisa Muniz, Tamàs Kiss, and Sylvain Egloff. Perturbations de la transcription liées à une dérégulation de P-TEFb : cancer, Sida et hypertrophie cardiaque. *Med Sci (Paris)*, 28(2) :200–205, February 2012. Number : 2 Publisher : Éditions EDK, Groupe EDP Sciences.

- [116] Adrian Negrean and Huibert D. Mansvelder. Optimal lens design and use in laser-scanning microscopy. *Biomed Opt Express*, 5(5) :1588–1609, April 2014.
- [117] V. T. Nguyen, T. Kiss, A. A. Michels, and O. Bensaude. 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature*, 414(6861) :322–325, November 2001.
- [118] Davide Normanno, Maxime Dahan, and Xavier Darzacq. Intra-nuclear mobility and target search mechanisms of transcription factors : A single-molecule perspective on gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(6) :482–493, June 2012.
- [119] Wolfgang J. Parak, Teresa Pellegrino, and Christian Plank. Labelling of cells with quantum dots. *Nanotechnology*, 16(2) :R9–R25, February 2005.
- [120] J. Peng, N. F. Marshall, and D. H. Price. Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. *J. Biol. Chem.*, 273(22) :13855–13860, May 1998.
- [121] Fredrik Persson, Martin Lindén, Cecilia Unoson, and Johan Elf. Extracting intracellular diffusive states and transition rates from single-molecule tracking data. *Nature Methods*, 10(3) :265–269, March 2013. Number : 3 Publisher : Nature Publishing Group.
- [122] Marie-Aude Plamont, Emmanuelle Billon-Denis, Sylvie Maurin, Carole Gauron, Frederico M. Pimenta, Christian G. Specht, Jian Shi, Jérôme Quérard, Buyan Pan, Julien Rossignol, Karine Moncoq, Nelly Morellet, Michel Volovitch, Ewen Lescop, Yong Chen, Antoine Triller, Sophie Vríz, Thomas Le Saux, Ludovic Jullien, and Arnaud Gautier. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo. *PNAS*, 113(3) :497–502, January 2016.
- [123] pubmeddev and Guigas G. and Weiss M. Sampling the cell with anomalous diffusion - the discovery of slowness. - PubMed - NCBI. Library Catalog : www.ncbi.nlm.nih.gov.
- [124] H Qian, M P Sheetz, and E L Elson. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys J*, 60(4) :910–921, October 1991.

- [125] Peter B. Rahl, Charles Y. Lin, Amy C. Seila, Ryan A. Flynn, Scott McCuine, Christopher B. Burge, Phillip A. Sharp, and Richard A. Young. c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell*, 141(3) :432–445, April 2010.
- [126] Vincent Récamier, Ignacio Izeddin, Lana Bosanac, Maxime Dahan, Florence Proux, and Xavier Darzacq. Single cell correlation fractal dimension of chromatin. *Nucleus*, 5(1) :75–84, January 2014. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.4161/nucl.28227>.
- [127] Krzysztof P. Rola. Anisotropic etching of silicon in KOH + Triton X-100 for 45° micromirror applications. *Microsyst Technol*, 23(5) :1463–1473, May 2017.
- [128] Krzysztof P. Rola and Irena Zubel. Effect of molecular structure of alcohols on wet anisotropic etching of silicon. *Sensors and Actuators A : Physical*, 242 :18–26, May 2016.
- [129] A. E. Rougvie and J. T. Lis. The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell*, 54(6) :795–804, September 1988.
- [130] Michael J. Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods*, 3(10) :793–795, October 2006.
- [131] Daniel Sage, Thanh-An Pham, Hazen Babcock, Tomas Lukes, Thomas Pengo, Jerry Chao, Ramraj Velmurugan, Alex Herbert, Anurag Agrawal, Silvia Colabrese, Ann Wheeler, Anna Archetti, Bernd Rieger, Raimund Ober, Guy M. Hagen, Jean-Baptiste Sibarita, Jonas Ries, Ricardo Henriques, Michael Unser, and Seamus Holden. Super-resolution fight club : assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software. *Nat. Methods*, 16(5) :387–395, 2019.
- [132] Michael J. Saxton. A Biological Interpretation of Transient Anomalous Subdiffusion. I. Qualitative Model. *Biophysical Journal*, 92(4) :1178–1191, February 2007.
- [133] Michael J. Saxton. Wanted : A Positive Control for Anomalous Subdiffusion. *Biophysical Journal*, 103(12) :2411–2422, December 2012.

- [134] M.J. Saxton. Anomalous diffusion due to obstacles : a Monte Carlo study. *Biophysical Journal*, 66(2) :394–401, February 1994.
- [135] I. F. Sbalzarini and P. Koumoutsakos. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *Journal of Structural Biology*, 151(2) :182–195, August 2005.
- [136] Falk Schneider, Dominic Waithe, Silvia Galiani, Jorge Bernardino de la Serna, Erdinc Sezgin, and Christian Eggeling. Nanoscale Spatiotemporal Diffusion Modes Measured by Simultaneous Confocal and Stimulated Emission Depletion Nanoscopy Imaging. *Nano Lett.*, 18(7) :4233–4240, 2018.
- [137] G J Schütz, H Schindler, and T Schmidt. Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophys J*, 73(2) :1073–1080, August 1997.
- [138] Arnauld Sergé, Nicolas Bertaux, Hervé Rigneault, and Didier Marguet. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat. Methods*, 5(8) :687–694, August 2008.
- [139] Anand P. Singh, Rémi Galland, Megan L. Finch-Edmondson, Gianluca Greci, Jean-Baptiste Sibarita, Vincent Studer, Virgile Viasnoff, and Timothy E. Saunders. 3D Protein Dynamics in the Cell Nucleus. *Biophysical Journal*, 112(1) :133–142, January 2017.
- [140] P. J. Slator and N. J. Burroughs. A Hidden Markov Model for Detecting Confinement in Single Particle Tracking Trajectories. *bioRxiv*, page 275107, March 2018. Publisher : Cold Spring Harbor Laboratory Section : New Results.
- [141] Paddy J. Slator, Christopher W. Cairo, and Nigel J. Burroughs. Detection of Diffusion Heterogeneity in Single Particle Tracking Trajectories Using a Hidden Markov Model with Measurement Noise Propagation. *PLOS ONE*, 10(10) :e0140759, October 2015. Publisher : Public Library of Science.
- [142] Edwin Smith, Chengqi Lin, and Ali Shilatifard. The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes Dev.*, 25(7) :661–672, April 2011.
- [143] Ernst H. K. Stelzer. The Intermediate Optical System of Laser-Scanning Confocal Microscopes. In James B. Pawley, editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 139–154. Springer US, Boston, MA, 1995.

- [144] C. Strandman, L. Rosengren, H. G. A. Elderstig, and Y. Backlund. Fabrication of 45 deg ; mirrors together with well-defined v-grooves using wet anisotropic etching of silicon. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 4(4) :213–219, December 1995.
- [145] Alexei Tcherniak, Carmen Reznik, Stephan Link, and Christy F. Landes. Fluorescence Correlation Spectroscopy : Criteria for Analysis in Complex Systems, December 2008. Archive Location : world Library Catalog : pubs.acs.org Publisher : American Chemical Society.
- [146] Jean-Yves Tinevez, Nick Perry, Johannes Schindelin, Genevieve M. Hoopes, Gregory D. Reynolds, Emmanuel Laplantine, Sebastian Y. Bednarek, Spencer L. Shorte, and Kevin W. Eliceiri. TrackMate : An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 115 :80–90, February 2017.
- [147] Makio Tokunaga, Naoko Imamoto, and Kumiko Sakata-Sogawa. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat Methods*, 5(2) :159–161, February 2008.
- [148] T. Wada, T. Takagi, Y. Yamaguchi, A. Ferdous, T. Imai, S. Hirose, S. Sugimoto, K. Yano, G. A. Hartzog, F. Winston, S. Buratowski, and H. Handa. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev.*, 12(3) :343–356, February 1998.
- [149] Xin Wang, Christine M. Helfer, Neha Pancholi, James E. Bradner, and Jianxin You. Recruitment of Brd4 to the human papillomavirus type 16 DNA replication complex is essential for replication of viral DNA. *J. Virol.*, 87(7) :3871–3884, April 2013.
- [150] L. Wawrezinieck, P.-F. Lenne, D. Marguet, and H. Rigneault. Fluorescence correlation spectroscopy to determine diffusion laws : application to live cell membranes. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, pages 92–103, 2004.
- [151] Laure Wawrezinieck. Confinement moléculaire et organisation de la membrane des cellules vivantes : analyse de la diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence. page 223, 2006.
- [152] Laure Wawrezinieck, Hervé Rigneault, Didier Marguet, and Pierre-François Lenne. Fluorescence Correlation Spectroscopy Diffusion Laws to Probe the

- Submicron Cell Membrane Organization. *Biophysical Journal*, 89(6) :4029–4042, December 2005.
- [153] Watt W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy : inception, biophysical experimentations, and prospectus. *Appl. Opt., AO*, 40(24) :3969–3983, August 2001. Publisher : Optical Society of America.
- [154] P. Anthony Weil, Donal S. Luse, Jacqueline Segall, and Robert G. Roeder. Selective and accurate initiation of transcription at the ad2 major late promotor in a soluble system dependent on purified rna polymerase ii and dna. *Cell*, 18(2) :469–484, October 1979. Publisher : Elsevier.
- [155] Matthias Weiss, Hitoshi Hashimoto, and Tommy Nilsson. Anomalous Protein Diffusion in Living Cells as Seen by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys J*, 84(6) :4043–4052, June 2003.
- [156] Jérôme Wenger, Davy Gérard, Heykel Aouani, Hervé Rigneault, Bryan Lowder, Steve Blair, Eloïse Devaux, and Thomas W. Ebbesen. Nanoaperture-Enhanced Signal-to-Noise Ratio in Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Anal. Chem.*, 81(2) :834–839, January 2009. Publisher : American Chemical Society.
- [157] Stefan Wieser and Gerhard J. Schütz. Tracking single molecules in the live cell plasma membrane—Do’s and Don’t’s. *Methods*, 46(2) :131–140, October 2008.
- [158] Maxime Woringer, Xavier Darzacq, and Ignacio Izeddin. Geometry of the nucleus : a perspective on gene expression regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 20 :112–119, June 2014.
- [159] Y. Yamaguchi, T. Takagi, T. Wada, K. Yano, A. Furuya, S. Sugimoto, J. Hasegawa, and H. Handa. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, 97(1) :41–51, April 1999.
- [160] Mei-Xia Zhao and Er-Zao Zeng. Application of functional quantum dot nanoparticles as fluorescence probes in cell labeling and tumor diagnostic imaging. *Nanoscale Res Lett*, 10(1) :171, April 2015.
- [161] Yuerong Zhu, Tsafirira Pe’ery, Junmin Peng, Yegnanarayana Ramanathan, Nick Marshall, Tricia Marshall, Brad Amendt, Michael B. Mathews, and David H.

- Price. Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation in vitro. *Genes Dev*, 11(20) :2622–2632, October 1997.
- [162] Johannes Zuber, Junwei Shi, Eric Wang, Amy R. Rappaport, Harald Herrmann, Edward A. Sison, Daniel Magoon, Jun Qi, Katharina Blatt, Mark Wunderlich, Meredith J. Taylor, Christopher Johns, Agustin Chicas, James C. Mulloy, Scott C. Kogan, Patrick Brown, Peter Valent, James E. Bradner, Scott W. Lowe, and Christopher R. Vakoc. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature*, 478(7370) :524–528, August 2011.