

Application en neurobiologie

Tout le développement instrumental présenté dans les chapitres précédents a été motivé par différentes problématiques biomédicales. Dans ce dernier chapitre, nous allons particulièrement nous concentrer sur une de ces applications qui consiste en l'étude de l'influence du cholestérol sur la maladie d'Alzheimer. Tous les travaux rapportés ici sont le fruit d'une collaboration avec l'équipe de Marie-Claude Potier, Jack-Christophe Cossec et Catherine Marquer, du Laboratoire Neurobiologie et Diversité Cellulaire de l'ESPCI. Dans une introduction rapide sur la maladie d'Alzheimer, nous soulignons les mécanismes que nous allons étudier, à savoir l'homodimerisation d'une protéine responsable de la production du peptide amyloïde. Nous annonçons ensuite les mesures que nous voulons réaliser, et pourquoi seul un dispositif comme le nôtre les rend possible. Après avoir présenté les lignées cellulaires utilisées pour nos expériences, nous rapportons les premiers résultats obtenus et les problèmes de photoblanchiment rencontrés. Nous proposons des solutions, que nous implémentons par la suite sur notre montage, pour pouvoir réaliser les mesures souhaitées dans des conditions convenables. Enfin, nous terminons ce chapitre par une conclusion relative aux mesures que nous souhaitons réaliser, et nous présentons plusieurs pistes à suivre pour répondre à notre problématique.

Pour de nombreuses applications biomédicales, et spécialement pour l'analyse des interactions protéine-protéine dans les phénomènes de signalisation, d'activation et d'inhibition de protéines, il est nécessaire d'imager avec de hautes résolutions spatiale et temporelle des cellules pour étudier les processus biologiques intracellulaires. Ceci est vrai notamment en neurobiologie, où la localisation neuronale subcellulaire de nombreuses protéines, donne des informations cruciales sur leurs voies d'acheminement et sur la structure neuronale. Notre dispositif est un outil de choix pour de telles problématiques, puisqu'il permet de localiser les protéines d'intérêt au niveau de la membrane plasmique (i.e. avec une résolution subneuronal) et de détecter en parallèle leur activité grâce à la technique FLIM (qui rend l'imagerie fonctionnelle possible), tout ceci sur des cellules vivantes dans un environnement physiologique, permettant ainsi de préserver leurs fonctionnalités.

I – Présentation de l'application

I.1– Problématique biomédicale

La fréquence élevée de la maladie d'Alzheimer fait aujourd'hui de cette pathologie un problème de santé publique majeur. Il y aurait aujourd'hui en France plus de 850 000 cas de démence [Inserm 2007]. La maladie d'Alzheimer représente globalement 70 % de ces cas. Et chaque année on compte 225 000 nouveaux cas. Au niveau mondial, le nombre de cas de démence est évalué à

24,3 millions, avec près de 4,6 millions de nouveaux cas chaque année. Avec l'allongement de la durée de vie, principalement dans les pays développés, son incidence augmente de façon vertigineuse. Le nombre de cas attendus devrait doubler tous les 20 ans, et pourrait concerner plus de 80 millions d'individus en 2040. De plus, l'étude de cette pathologie est difficile à cause des difficultés de diagnostic et de prise en charge des patients. On estime actuellement que 30 à 50% des personnes atteintes sont diagnostiquées et que 30% des patients diagnostiqués sont pris en charge [FRM 2006], [Inserm 2007]. En France, une volonté politique a été exprimée pour lutter contre cette maladie, avec le plan Alzheimer qui représente un investissement de 1,6 milliards d'euros d'ici 2012. La plus grande partie de cette somme est destinée au volet médico-social et sanitaire, et 12% seront consacrés à la recherche [Gouvernement 2007].

La maladie d'Alzheimer a été décrite pour la première fois il y a un siècle par le médecin allemand Alois Alzheimer [Alzheimer 1906].

Cette maladie est la forme de démence la plus fréquemment rencontrée. Les perturbations les plus précoces et les plus fréquentes sont des troubles bénins de la mémoire portant sur les faits récents et le plus souvent sur des détails de la vie quotidienne [Laisney 2004], [Eustache 2006]. Il s'ensuit une lente évolution des symptômes qui vont progressivement s'étendre à des troubles de l'organisation et de la programmation (fonctions exécutives) [Perry 2003], du langage (aphasie) [Murdoch 1987], une maladresse gestuelle (apraxie) [Mozaz 2006], un défaut de reconnaissance des objets, des lieux, des personnes (agnosie). La maladie s'accompagne également de divers troubles du comportement qui viennent aggraver les troubles cognitifs et peuvent diminuer la tolérance de l'entourage du patient : repli sur soi, apathie, symptômes dépressifs, troubles du sommeil, de l'appétit, agitation, hallucinations ... [Aalten 2007], [Aalten 2008]. Enfin, des signes neurologiques somatiques apparaissent le plus souvent, entraînant des troubles de l'équilibre, de la marche, et augmentant le risque de chutes [Petterson 2002].

Dans la majorité des cas, la maladie d'Alzheimer apparaît comme une pathologie multifactorielle résultant de l'interaction de divers facteurs environnementaux et de facteurs génétiques qui pourraient favoriser son apparition. Mais à l'heure actuelle, on ne sait pas encore agir sur les causes de la maladie d'Alzheimer. Il existe certaines protéines dont le rôle délétère a été mis en évidence dans la maladie d'Alzheimer, mais ces entités jouent d'autres rôles dans le métabolisme. Il est indispensable de comprendre les mécanismes cellulaires, pour définir une thérapie, c'est-à-dire savoir ce qu'il faut cibler et comment le cibler. En attendant, il semble possible de réduire les facteurs de risque de la maladie. Même s'il s'agit d'une pathologie qui survient le plus souvent à un âge avancé, on s'intéresse de plus en plus globalement à la vie entière du sujet, en particulier la période 40-50 ans, plutôt qu'aux caractéristiques des sujets dans les années précédant le diagnostic. Différentes études ont identifié des « facteurs de risque » et des « facteurs de protection » [Fratiglioni 2004]. Des facteurs cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, le tabac, le bas niveau d'étude, le sexe féminin, l'hypercholestérolémie, le diabète ou encore les symptômes dépressifs seraient des facteurs de risque. À l'inverse, la richesse du réseau social et des activités de loisirs, une bonne hygiène de vie (activités physiques et intellectuelles), un apport suffisant en antioxydants, semblent exercer des effets protecteurs. Si elle ne permet pas d'empêcher la survenue de la maladie, au moins cette approche pourrait faire reculer de plusieurs années l'expression des symptômes. Il est également possible grâce à certains traitements pharmacologiques d'atténuer quelques symptômes invalidants, et d'améliorer un peu le confort de vie des malades.

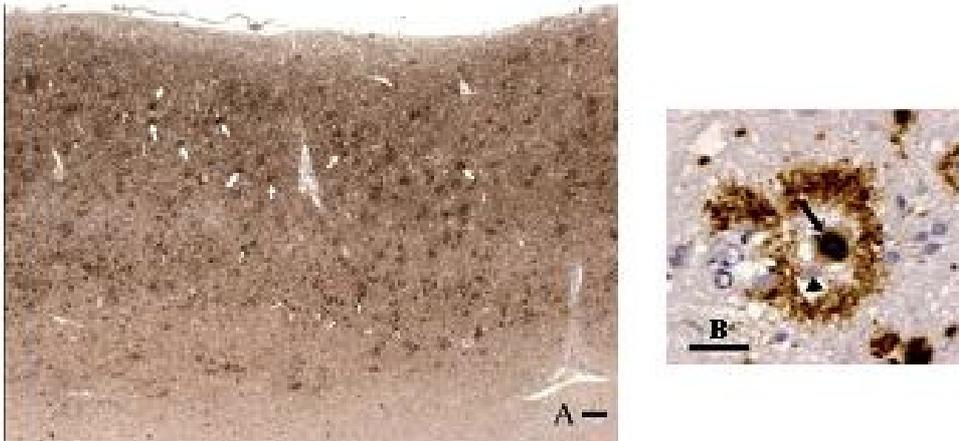


Figure 4-1 : Marquage de la protéine Tau par immunohistochimie et révélation par le complexe avidine-biotine. L'immunohistochimie, est une technique de marquage spécifique qui recourt à un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt. Toutes les structures colorées en marron sont pathologiques. A : Pathologie Tau dans le cortex cérébral (faible grandissement). La protéine Tau agrégée apparaît en marron. Les flèches les plus volumineuses indiquent des plaques séniles, les flèches plus petites, les neurones. Barre d'échelle=100 μm . B : Plaque sénile telle qu'elle apparaît après immunohistochimie du peptide. A β Barre d'échelle=20 μm [Inserm 2007].

Le diagnostic certain de la maladie d'Alzheimer repose sur l'observation de lésions cérébrales caractéristiques (généralement constatées à l'occasion d'un examen post mortem) : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires [McKhann 1984]. La dégénérescence neurofibrillaire est due à l'accumulation pathologique dans le neurone d'une protéine naturellement présente, la protéine Tau. Cette protéine joue normalement un rôle dans la polymérisation des microtubules. La pathologie amyloïde est quant à elle caractérisée par l'accumulation extracellulaire d'un peptide normalement présent à faible concentration, le peptide β -amyloïde ou A β . Ces accumulations de peptide A β et de protéine Tau prennent différents aspects morphologiques [Delaère 1991] (figure 4-1). Le peptide A β extracellulaire peut former des dépôts volumineux, faiblement concentrés, en « carte de géographie » : les dépôts diffus. Les « dépôts focaux » de peptide A β sont, au contraire, denses et de forme sphérique. La protéine Tau s'accumule aussi dans les axones qui entourent les dépôts focaux de peptide A β , formant la couronne de ce qu'on appelle la plaque sénile. Ces altérations microscopiques sont associées à des modifications macroscopiques [Duyckaerts 2003]. Le poids et le volume du cerveau sont en moyenne diminués. Des aires corticales qui jouent un rôle dans les fonctions mnésiques et sont situées à la face interne des hémisphères – le cortex entorhinal et l'hippocampe – sont les premières à perdre du volume, suivies par les régions du cortex impliquées dans des fonctions telles que le langage, l'analyse complexe des influx visuels ou auditifs ou la programmation des mouvements volontaires [Inserm 2007].

Le peptide A4 [Glennner 1984], amyloïde ou A β (comme il est habituel de l'appeler aujourd'hui), responsable de la formation des plaques séniles, est naturellement produit dans le cerveau [Seubert 1992]. Il est issu d'une protéine transmembranaire : la β APP (pour β -Amyloid Precursor Protein, [Kang 1987]), suite à deux coupures enzymatiques (par les β - et γ - secrétases) : c'est ce qu'on appelle la voie amyloïdogénique (figure 4-2). Dans la maladie d'Alzheimer, pour des raisons qui restent encore mal comprises, le peptide s'accumule principalement en dehors des cellules et échappe aux divers systèmes biologiques d'élimination, enzymatiques ou cellulaires. La fonction normale de ce peptide amyloïde et de son précurseur demeure relativement méconnue.

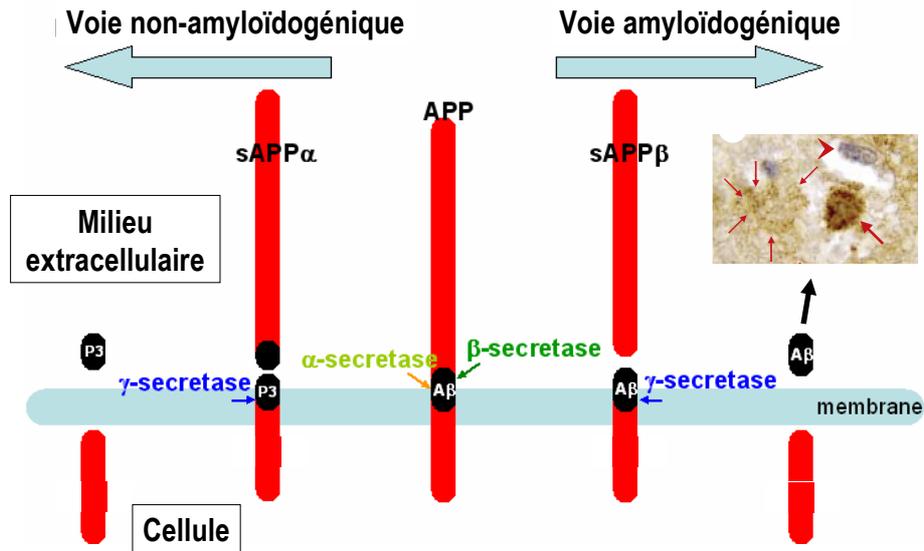


Figure 4-2 : évolution de la protéine précurseur amyloïde (APP) suivant les deux voies métaboliques qu'elle peut suivre. Le peptide amyloïde est produit au cours de la voie amyloïdogénique. sAPP α et sAPP β sont des fragments de l'APP produits après action des enzymes et qui sont solubles.

Dès lors, nous comprenons tout l'intérêt d'étudier ce peptide et son précurseur. L'équipe de neurobiologistes avec qui nous travaillons s'intéresse plus précisément au lien qu'il existe entre le cholestérol et la maladie d'Alzheimer, et à l'influence du cholestérol sur les mécanismes cellulaires de production du peptide amyloïde.

En effet, comme nous l'avons vu, l'hypercholestérolémie est un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer [Sambamurti 2004]. Des études ont montré que l'administration de régimes riches en cholestérol à un modèle murin de la maladie d'Alzheimer induit une augmentation de la production des plaques séniles. De plus, le taux de cholestérol serait augmenté dans les cerveaux de patients atteints de cette maladie [Shobab 2005]. Cependant, l'effet du cholestérol sur la voie amyloïdogénique reste controversé [Ledesma 2006]. Quelques papiers ont rapporté des résultats importants il y a une dizaine d'années : Simons et son équipe ont montré que la réduction de cholestérol dans la membrane plasmique de neurones de rats en culture surexprimant APP entraînait une décroissance de la production du peptide amyloïde [Simons 1998]. De plus, il a été démontré (sur des cellules d'ovaire de hamster chinois) que la réduction du cholestérol à la membrane plasmique provoquait une diminution de l'endocytose [Subtil 1999].

Aux vues de ces travaux, nos collègues neurobiologistes ont formulé l'hypothèse de travail suivante : le cholestérol régule l'endocytose de l'APP et son clivage. A partir de ce point de départ, plusieurs pistes d'investigation ont été dégagées :

1. Les effets du cholestérol sur la distribution subcellulaire de l'APP et la distribution membranaire dans des cellules HEK-293
2. Les mécanismes d'action du cholestérol sur l'endocytose de l'APP
3. Les effets du cholestérol sur la production du peptide amyloïde
4. L'action du cholestérol sur des cultures primaires de neurones

Après une première série de travaux, certaines réponses ont été apportées. Une présence importante du cholestérol au niveau de la membrane plasmique augmente la production du peptide amyloïde par un accroissement de l'internalisation du précurseur APP. De plus, des études récentes ont démontré que l'homodimérisation de l'APP jouait un rôle dans l'augmentation de la production du peptide amyloïde [Munter 2007]. En effet, lorsque deux précurseurs créent des liaisons chimiques et s'associent pour former un dimère, l'action des enzymes (β - et γ - secrétases) semble favorisée. L'équipe de neurobiologistes propose par

conséquent que l'excès d'internalisation de l'APP soit dû à une augmentation de la concentration de ce précurseur dans les microdomaines de la membrane plasmique enrichi en cholestérol, et s'accompagne d'une homodimérisation de l'APP. Il serait donc intéressant d'observer l'APP à la membrane plasmique et de trouver un moyen de mettre en évidence l'augmentation de ce précurseur à la membrane via une hausse de son homodimérisation.

C'est dans ce cadre qu'intervient le dispositif de TIRFLIM que nous avons développé. En effet, grâce au TIRF, nous allons pouvoir observer uniquement la membrane plasmique et donc l'APP à la membrane, et grâce à la mesure de temps de vie de fluorescence, nous allons pouvoir mettre en évidence un processus de transfert non rayonnant appelé FRET (qui est l'acronyme de Förster Resonance Energy Transfer), témoin d'une augmentation de l'homodimérisation de l'APP.

I.2 – Le FRET

Nous allons maintenant détailler plus précisément ce processus de FRET, qui est aujourd'hui une technique très répandue dans l'étude du vivant à l'échelle cellulaire. En effet, les phénomènes biologiques sont basés sur des processus physico-chimiques fondamentaux de liaison, d'association, de changement conformationnel, de diffusion ou de catalyse. Pour étudier ces réactions en milieu cellulaire, il est impératif d'avoir accès à la distribution spatio-temporelle et à l'état fonctionnel des molécules constitutives de la cellule. Le FRET est un outil capable de résoudre les interactions moléculaires et les conformations moléculaires avec une grande précision. Il s'agit d'un processus dans lequel l'énergie d'un fluorophore dans un état excité (le donneur) est transférée de façon non radiative à un autre chromophore (l'accepteur), qui peut être fluorescent mais ne l'est pas forcément (figure 4-3, figure 4-4). Ce transfert est réalisé via un couplage dipôle-dipôle [Jares-Erijman 2003], [Pelet 2006].

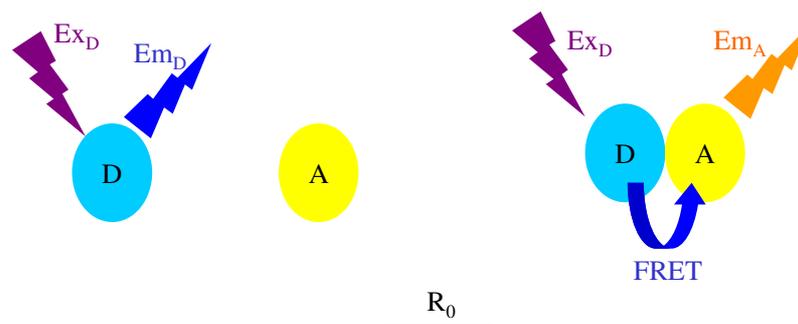


Figure 4-3 : schéma de principe du FRET. D est l'indice pour le donneur et A celui de l'accepteur. Ex signifie excitation, et Em émission. A gauche, la distance entre donneur et accepteur est trop importante pour qu'il y ait du FRET : ainsi, en excitant l'accepteur, on observe l'émission de l'accepteur. A droite, un transfert FRET est possible, et en excitant le donneur, nous observons la fluorescence de l'accepteur.

Cette technique trouve de nombreuses applications. Citons d'abord quelques utilisations du FRET en milieu extracellulaire, comme il est utilisé par exemple lors d'un marquage en immunofluorescence [Youn 1995] : antigène et anticorps sont marqués avec deux espèces chimiques entre lesquelles un transfert FRET est possible (par exemple dans la référence citée précédemment, l'antigène est marqué avec un fluorophore et l'anticorps avec un absorbeur qui sert d'accepteur), et lorsque ces deux protéines sont présentes dans la solution et se lient, ce

transfert peut être mis en évidence. Le FRET est également largement employé pour mesurer des distances intramoléculaires et suivre les changements de conformation de protéines [Zhuang 2003], [Weiss 2000].

D'autre part, le FRET est appliqué à l'étude des interactions entre protéines à l'intérieur des cellules vivantes [Sekar 2003], [Kenworthy 2001]. Dans ce cas, le transfert d'énergie indique que les deux protéines d'intérêt interagissent. Dans une expérience typique, la cellule est modifiée génétiquement pour exprimer les deux protéines d'intérêt, chacune liée par une petite chaîne peptidique à une protéine fluorescente. Dès lors, les processus biologiques et physiques, tels que les interactions de protéines qui regroupent les deux fluorophores dans un petit volume, se traduisent par un transfert FRET [Tramier 2002], [Larson 2003]. D'autres informations telles que la fraction de protéine marquée ou la distance inter moléculaire peuvent aussi être intéressantes et être quantifiées. Ces expériences quantitatives ont grandement gagné en popularité avec la découverte de la GFP et de ses dérivés qui couvrent tout le spectre visible.

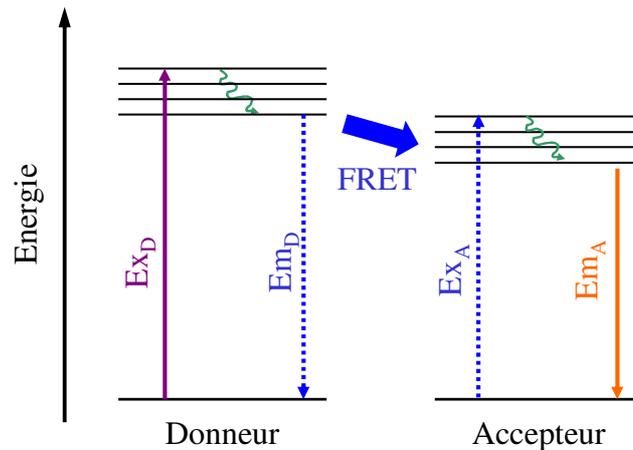


Figure 4-4 : schéma de principe du FRET dans un diagramme énergétique.

Intéressons nous plus précisément à la théorie du FRET. Le couplage des dipôles de transitions (dipôle d'émission pour le donneur et dipôle d'absorption pour l'accepteur) des deux fluorophores provoque une désexcitation du donneur et une excitation de l'accepteur. Le transfert va dépendre du recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur, de l'orientation relative des moments des dipôles, de l'indice de réfraction, et bien sur de la distance entre donneur et accepteur. C'est Theodor Förster qui le premier prédit que l'efficacité de ce transfert variait comme l'inverse de la puissance 6 de la distance entre les deux fluorophores [Förster 1948], ce qui fut démontré expérimentalement en 1967 [Stryer 1967]. L'efficacité E du transfert FRET est donnée par :

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

où R_0 est le rayon de Förster et r est la distance entre donneur et accepteur.

Lorsque donneur et accepteur sont séparés d'une distance égale au rayon de Förster, 50% de l'énergie est transférée grâce au FRET.

Cette grandeur R_0 est définie en Angstrom par :

$$R_0 = 0,211 \times [k^2 n^{-4} Q_D J]^{\frac{1}{6}}$$

avec J l'intégrale de recouvrement spectral qui traduit le degré de recouvrement entre les spectres

de fluorescence du donneur et d'absorption de l'accepteur : $J = \frac{\int \epsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda) d\lambda}$ (figure 4-5),

n l'indice de réfraction, Q_D le rendement quantique de fluorescence du donneur en l'absence d'accepteur, κ^2 le facteur d'orientation des dipôles (qui dépend du moment de transition de l'émission du donneur et du moment de transition de l'absorption de l'accepteur, et varie de 0 à 4), $\varepsilon_A(\lambda)$ le spectre d'absorption de l'accepteur et $f_D(\lambda)$ le spectre d'émission du donneur [Padilla-Parra 2008]. On attribue à κ^2 la valeur universelle de 2/3 ; cette valeur est rigoureusement exacte si on considère que donneur et accepteur sont orientés aléatoirement et tournent rapidement et de manière isotrope pendant le temps de vie de l'état excité du donneur [Jares-Erijman 2003]. Le rayon de Förster vaut pour les couples les plus utilisés quelques dizaines d'Angström [Patterson 2000].

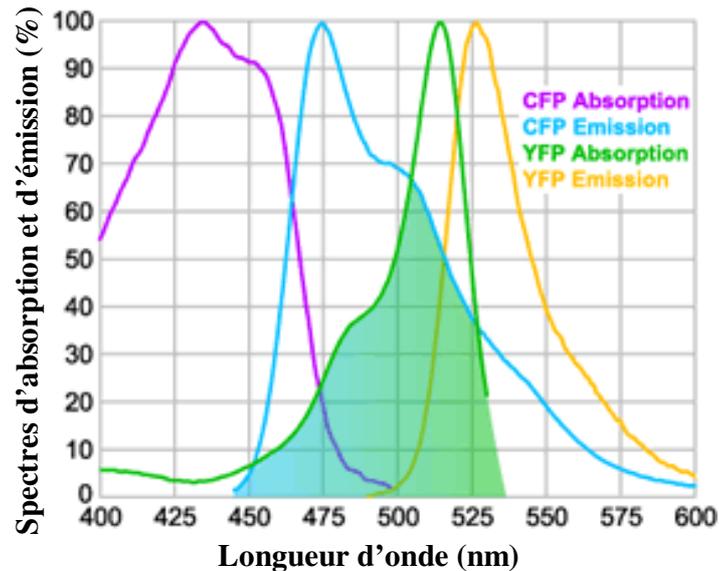


Figure 4-5 : recouvrement entre les spectres d'émission du donneur (CFP) et d'absorption de l'accepteur (YFP). D'après [Semrock 2007].

Il est également possible de relier l'efficacité du transfert au temps de vie ou à l'intensité de fluorescence du donneur :

$$E = 1 - \frac{I_F}{I_D} = 1 - \frac{\tau_F}{\tau_D}$$

où l'indice D indique la présence uniquement du donneur et F la présence du couple FRET (donneur et accepteur).

Les techniques de mesure de FRET sont nombreuses et variées [Jares-Erijman 2003]. Nous n'allons nous intéresser ici qu'aux techniques les plus directes et les plus utilisées. Un certain nombre de méthodes sont basées sur les mesures d'intensité : lorsqu'un transfert FRET se produit, l'intensité de fluorescence du donneur diminue alors que celle de l'accepteur augmente. Mais ces mesures sont gênées par des artefacts expérimentaux dus au recouvrement des spectres d'excitation et des spectres de détection des deux fluorophores. Il existe des algorithmes de correction performants, mais ils nécessitent plusieurs acquisitions en changeant les longueurs d'onde d'excitation et de détection, et des références sont indispensables [Berney 2003], [Elangovan 2003]. Une méthode alternative, qui permet de s'affranchir des schémas complexes de correction repose sur le photoblanchiment de l'accepteur : on compare les intensités mesurées avant et après photoblanchiment. Mais cette technique est destructive et une seule mesure par cellule est possible [Mochizuki 2001].

La mesure du temps de vie de fluorescence semble être la technique la plus commune pour quantifier le FRET [Wallrabe 2005]. Le « quenching » du fluorophore donneur conduit à un

déclin plus rapide de l'état excité, qui peut être mis en évidence par un dispositif de microscopie de fluorescence ayant une résolution picoseconde. Et la mesure du temps de vie de fluorescence conserve ses avantages, à savoir notamment son indépendance vis-à-vis de la concentration du fluorophore et du chemin optique suivi par la fluorescence. La quantification de la réduction du temps de vie de fluorescence moyen du donneur fournit une mesure relative du FRET dans l'échantillon. Avec une analyse fine des déclinés mesurés, notamment en utilisant des modèles multi-exponentiels, il est même possible de retrouver complètement tous les paramètres du FRET (efficacité, distance d'interaction entre les deux fluorophores, et rapport entre donneur et accepteur dans le complexe FRET) [Pelet 2006].

Pour réaliser des mesures de FRET, un certain nombre de paires de fluorophores est utilisé [Wallrabe 2005] : les deux fluorophores doivent avoir des rendements quantiques intéressants (autour de 50%), des bandes spectrales d'excitation suffisamment séparées. Le recouvrement entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur doit être de l'ordre de 30% pour que le transfert d'énergie soit efficace, et une séparation raisonnable des spectres d'émission du donneur et de l'accepteur est nécessaire [Sekar 2003]. Jusqu'à présent, la paire donneur-accepteur la plus populaire et la plus utilisée est la paire CFP/YFP [Wallrabe 2005, où 24 papiers dans lesquels cette paire est utilisée sont cités], ce qui en fait la paire de référence.

Pour nos expériences, nous nous sommes servis de cette paire, qui est donc bien connue et pour laquelle les constructions moléculaires sont maîtrisées. Si on revient à la problématique biologique qui nous intéresse, lors de l'homodimérisation de l'APP à la membrane plasmique, si chacun des précurseurs qui se dimérise est marqué avec un des deux fluorophores du couple FRET, la distance sera assez faible pour permettre le transfert. Dès lors, nous pourrions faire ressortir l'homodimérisation par une diminution du temps de vie de fluorescence du donneur du couple, en l'occurrence la CFP. Ainsi nous allons mesurer le temps de vie de la fluorescence de la CFP au début de l'expérience (mesure « Contrôle »), puis nous allons ajouter le cholestérol dans le milieu pour augmenter la quantité de cholestérol à la membrane plasmique et ainsi espérer mettre en évidence l'augmentation de l'homodimérisation de l'APP (figure 4-6).

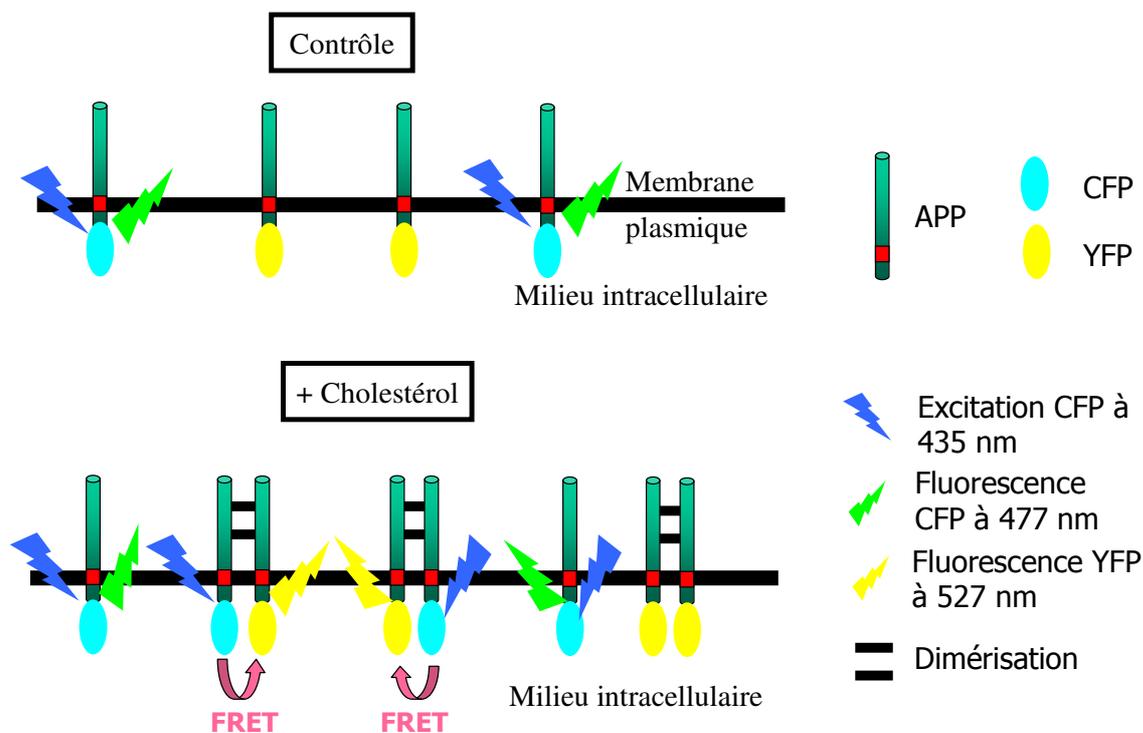


Figure 4-6 : schéma de principe des mesures. En haut : mesure contrôle. Il y a très peu de dimérisation de l'APP, donc peu de FRET. En bas : en ajoutant le cholestérol, on favorise l'homodimérisation de l'APP et donc le FRET.

II – Mesures sur des échantillons cellulaires

II.1 – Modèle cellulaire utilisé : lignée HEK-293 transfectée

Le but ultime de ce travail est de pouvoir faire ces mesures de temps de vie sur des neurones. Mais ces cellules sont délicates à obtenir (il faut récupérer le cerveau d'un embryon d'une rate gestante de neuf jours et en extraire les précurseurs neuronaux des zones du cerveau que l'on veut étudier). Il est impensable de les observer sur le microscope sans utiliser une enceinte dans laquelle température et pression de CO₂ sont finement contrôlées.

Ainsi, pour d'une part valider le modèle proposé par les neurobiologistes, et d'autre part réaliser l'optimisation de notre montage TIRFLIM avec des échantillons cellulaires vivants, nous avons travaillé avec des cellules HEK-293. Cette lignée de cellules a été générée par transformation de cultures de cellules de rein embryonnaire humain avec un adénovirus [Graham 1977] (HEK est l'acronyme de Human Embryonic Kidney, et 293 est le numéro de l'expérience au cours de laquelle Graham trouva cette lignée). Ces cellules sont très largement utilisées en biologie cellulaire car elles sont faciles à cultiver et à transfecter. De plus, pour l'application qui nous concerne, ces cellules possèdent un grand nombre de propriétés communes avec les neurones immatures [Shaw 2002].

Nous cultivons nous-mêmes au laboratoire ces cellules, et nous réalisons également les transfections. Une transfection est l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes (c'est-à-dire possédant un noyau) : lorsque la transfection est réussie, les brins d'ADN introduits sont pris en charge par les différents mécanismes cellulaires jusqu'au noyau, siège de la transcription. Dès lors, la cellule exprime la protéine codée par le brin d'ADN introduit. Au cours de ce travail nous avons réalisé diverses transfections, permettant à la cellule d'exprimer de l'APP ou des récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB1R) liés à des protéines fluorescentes (CFP, GFP, YFP, mCherry). Les récepteurs cannabinoïdes sont des récepteurs membranaires présents dans les neurones et dans les cellules HEK-293 qui ne jouent a priori aucun rôle dans la synthèse du peptide amyloïde, et qui ne peut pas se dimériser avec l'APP : on l'utilise ici comme un témoin négatif pour le FRET.

II.2 – Premières mesures sur la CFP

Pour travailler dans de bonnes conditions, il nous faut déterminer la quantité d'ADN nécessaire à l'expression d'une quantité de CFP suffisante pour faire de l'imagerie de fluorescence, et d'une quantité de YFP relativement élevée (au moins égale à celle de CFP) pour permettre le processus de FRET. Nous avons observé des cellules HEK dans différentes conditions de transfection (tableau 4-1). Nous avons voulu mesurer le temps de vie de fluorescence de la CFP fixée sur l'APP, en présence d'APP-YFP ou de CB1R-YFP, sans cholestérol. Nous obtenons ainsi un temps de vie de fluorescence de référence, un « contrôle » dans les deux conditions. Nous avons également regardé l'évolution de la mesure lorsque l'on change le rapport entre la quantité de protéines marquées à la CFP et la quantité de protéines marquées à l'YFP, en prenant garde de toujours transfecter la même quantité totale d'ADN (3 µg dans notre cas).

	APP-CFP	APP-YFP	CB1-YFP
A-CFP 1,5 / A-YFP 1,5	1,5 µg	1,5 µg	
A-CFP 1,5 / C-YFP 1,5	1,5 µg		1,5 µg
A-CFP 1 / A-YFP 2	1 µg	2 µg	
A-CFP 1 / A-YFP 2	1 µg		2 µg

Tableau 4-1 : les différentes conditions de transfection avec les quantités d'ADN ajoutées correspondantes. Les valeurs représentent la quantité d'ADN ajoutée dans chaque puits de transfection. Chacun des puits contient environ 1 million de cellules.

Nous rapportons dans le tableau 4-2 les valeurs des paramètres pour les acquisitions réalisées dans cette partie. Le gain de l'intensificateur est ajusté suivant le niveau du signal de fluorescence de chaque cellule. Tous les résultats sont obtenus en TIRF, et la profondeur de pénétration du champ évanescent est estimée entre 160 et 190 nm pour toutes ces mesures. Pour imager proprement la CFP, nous utilisons pour l'excitation un filtre centré à 438 nm avec une largeur de 24 nm, et pour la détection, un filtre centré à 483 nm avec une largeur de 32 nm.

		CCD			HRI	
Paramètre	Aref	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	Aref	10	250	0	800	750 à 850

Tableau 4-2 : valeurs des différents paramètres d'acquisition. Nous utilisons l'algorithme Aref, et nous faisons varier la valeur du gain suivant le signal de fluorescence.

La figure 4-7 montre une image représentative des images de fluorescence de la CFP obtenues en TIRF en intensité et en temps de vie de fluorescence.

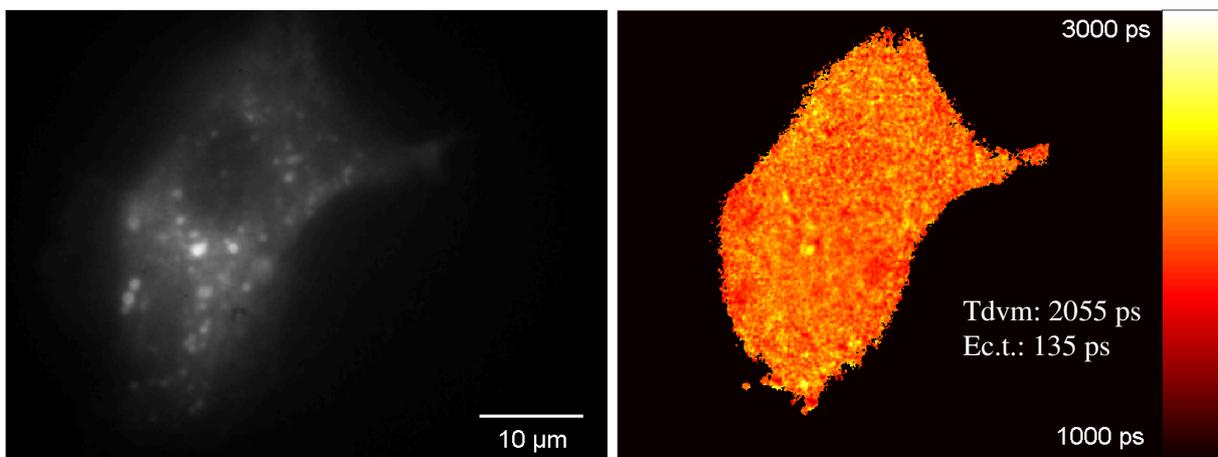


Figure 4-7 : images en intensité (à gauche) et en durée de vie (à droite) de fluorescence de la CFP d'une cellule HEK-293 transfectée avec APP-CFP et APP-YFP.

Nous avons réalisé une dizaine de mesures dans chacune des conditions de transfection (figure 4-8 et tableau 4-3). Il est intéressant de remarquer que nous obtenons une bonne reproductibilité sur les échantillons : nous avons des valeurs centrées autour de 2040 ps et comprises entre 1950 et 2150 ps. Nous estimons que, pour chaque transfection, les différences de durées de vie moyenne sont dues à la variabilité de ces échantillons biologiques. Concernant l'écart type pour chacune des mesures, la valeur obtenue reflète le niveau de signal de fluorescence (plus le signal est faible, plus l'ajustement par la méthode des moindres carrés est délicat et donc plus l'écart type est élevé), mais aussi dans une moindre mesure l'inhomogénéité de la cellule. Si on compare les mesures réalisées pour différents rapports entre les quantités de CFP et de YFP, on constate qu'avec 1,5 µg de chaque ADN, nous avons un meilleur signal de fluorescence (ce qui se traduit par un écart type pour le temps de vie plus faible sur chacune des images), et les temps de vie trouvés sont moins disparates.

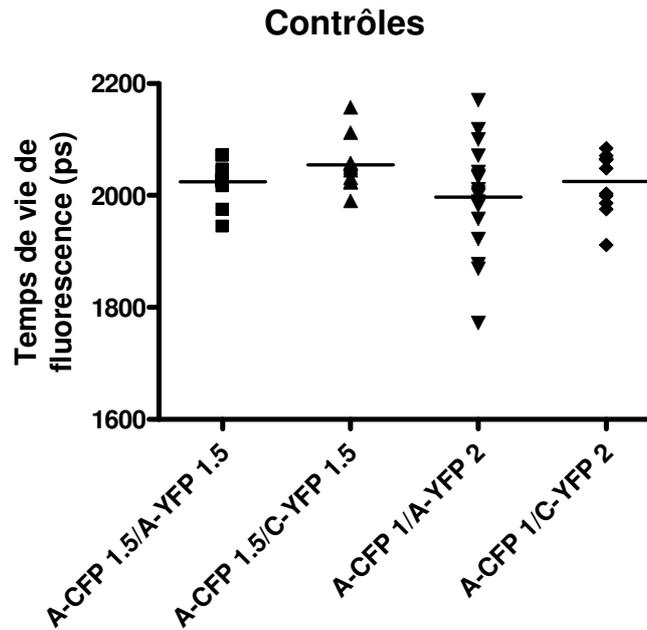


Figure 4-8 : résultats des temps de vie de fluorescence mesurés sur différentes cellules pour les 4 conditions de transfection.

Lorsqu'on transfecte avec deux fois plus d'YFP que de CFP, les temps de vie de fluorescence de la CFP sont très légèrement plus courts. Ceci pourrait s'expliquer par un FRET de base plus important entre CFP et YFP lorsqu'il y a deux fois plus d'accepteurs que de donneurs. De même, il semblerait que le temps de vie de fluorescence soit un peu plus court lorsque l'on transfecte avec APP-CFP et APP-YFP, que lorsqu'on transfecte avec APP-CFP et CB1R-YFP. On peut supposer qu'avec une transfection APP-APP, il y a (même sans ajout de cholestérol) une certaine quantité d'APP qui s'homodimérise, et donc plus de FRET de base qu'avec une transfection APP-CB1R. Mais aux vues des faibles différences obtenues dans les deux cas ci-dessus, il faudrait sans doute augmenter le nombre d'expériences pour aboutir à une telle conclusion de manière certaine.

	A-CFP 1.5/A-YFP 1.5		A-CFP 1.5/C-YFP 1.5		A-CFP 1/A-YFP 2		A-CFP 1/C-YFP 2	
Nombre de mesures	11		11		17		11	
	Moy (ps)	Ec.t. (ps)	Moy (ps)	Ec.t. (ps)	Moy (ps)	Ec.t. (ps)	Moy (ps)	Ec.t. (ps)
Moyenne	2024	154	2055	170	1997	187	2025	182
Ecart type	38	30	45	29	98	31	54	40

Tableau 4-3 : nombre de mesures, moyennes et écarts types obtenus pour chacune des conditions de transfection.

Ces mesures ayant été réalisées, nous avons maintenant une idée assez précise des valeurs de temps de vie prises par la CFP attachée à l'APP en milieu cellulaire. Nous observons ensuite l'influence du cholestérol sur ce temps de vie. Pour cela, nous regardons des cellules transfectées avec APP-CFP et APP-YFP, et des cellules « contrôles » transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP avant et après ajout de cholestérol dans le milieu. Pour mener à bien cette étude, nous sélectionnons dans chacun des puits une cellule bien adhérente à la lamelle de fond du puits, et avec des caractéristiques morphologiques nous permettant d'affirmer qu'elle est bien vivante. Nous vérifions également que cette cellule possède un niveau de fluorescence convenable pour être imagée, et nous réalisons une première mesure du temps de vie de fluorescence dans ces conditions. Ensuite, nous ajoutons du cholestérol (plus précisément un complexe "méthyl- β -cyclodextrin/cholestérol" qui augmente le cholestérol à la membrane plasmique de la cellule) dans le milieu de culture pour aboutir à une concentration en cholestérol de 1,4 μ M/L dans le puits de la lame Labteck observée. Cette valeur (qui correspond à une augmentation de 40% du

cholestérol à la membrane plasmique après 30min de traitement) a été déterminée par Jack-Christophe Cossec et les neurobiologistes qui ont constaté par d'autres méthodes d'analyse qu'une telle concentration de cholestérol modifiait l'endocytose de l'APP. Nous mesurons alors le temps de vie de fluorescence à différents instants après l'ajout de cholestérol pour voir l'évolution au cours du temps. Nous réalisons ces acquisitions respectivement 0 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 12 min, et 15 min après l'ajout de cholestérol.

Dans le premier cas d'une transfection avec APP-CFP et APP-YFP, les résultats figurent dans le tableau 4-4.

	Avant cholestérol		15 min après cholestérol	
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
cellule 1	1928	167	1940	150
cellule 2	2178	204	1949	179
cellule 3	2048	160	2032	145
cellule 4	2155	187	2095	170
cellule 5	2072	181	1970	165
cellule 6	1920	156	2014	131
cellule 7	1995	167	1876	157
cellule 8	2029	147	1977	150
cellule 9	1982	138	1867	123
cellule 10	2090	168	1982	158
Moyenne	2040		1970	
Ecart type	87		69	

Tableau 4-4 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 10 cellules transfectées avec APP-CFP et APP-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 15 minutes après.

On constate une petite tendance à la diminution du temps de vie de fluorescence (70 ps en moyenne). Sur l'histogramme de la figure 4-9, nous pouvons considérer que les variations de temps de vie de fluorescence dans les gammes [-100 ;0] et [0 ;100] ne sont pas véritablement interprétables en terme de FRET. Elles correspondent sans doute d'une part à des changements métaboliques dans la cellule au cours des 15 minutes d'acquisitions, notamment dus à l'exposition au laser, et d'autre part d'une manière moins importante à l'erreur dans la reproductibilité de la mesure avec notre dispositif. Par contre, des diminutions de temps de vie supérieures à 100 ps pourraient être consécutives à du FRET.

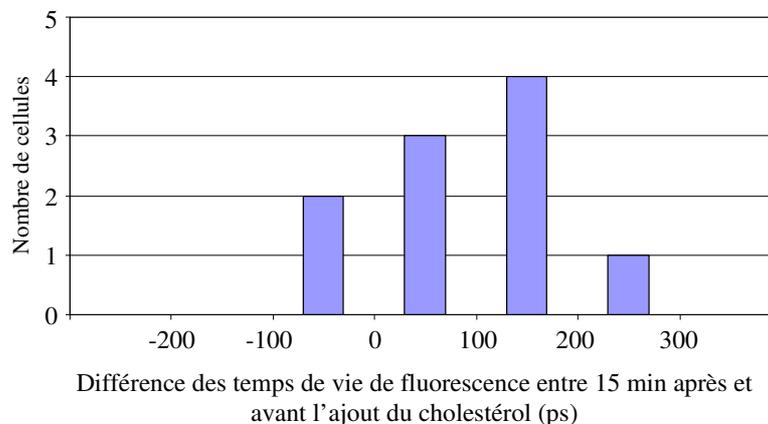


Figure 4-9 : histogramme de l'évolution du temps de vie de la CFP entre avant et 15 minutes après l'ajout de cholestérol pour chaque cellule individuellement. Sur l'axe des abscisses est reportée la différence de temps de vie mesurée : (temps de vie 15 minutes après l'ajout de cholestérol)-(temps de vie avant l'ajout de cholestérol). Une variation positive correspond à une diminution du temps de vie de fluorescence. L'effectif pour chacune des gammes de 100 ps est reporté sur l'axe des ordonnées.

Dans le second cas d'une transfection avec APP-CFP et CB1R-YFP, les résultats sont consignés dans le tableau 4-5. On constate une diminution plus importante du temps de vie de fluorescence de la CFP en moyenne (environ 160 ps). Mais à y regarder de plus près, (tableau 4-5 et figure 4-10), pour certaines cellules la variation n'est pas significative, mais pour 3 cellules, nous avons des diminutions du temps de vie très importantes (232 ps pour la cellule 5, 413 ps pour la cellule 6, 483 ps pour la cellule 7).

	Avant cholestérol		15 min après cholestérol	
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
cellule 1	1991	222	2063	255
cellule 2	2094	193	2099	230
cellule 3	2050	141	1958	126
cellule 4	2129	159	2155	129
cellule 5	2012	191	1780	179
cellule 6	1991	162	1578	231
cellule 7	2038	139	1555	169
Moyenne	2043		1884	
Ecart type	52		248	

Tableau 4-5 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 7 cellules transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 15 minutes après.

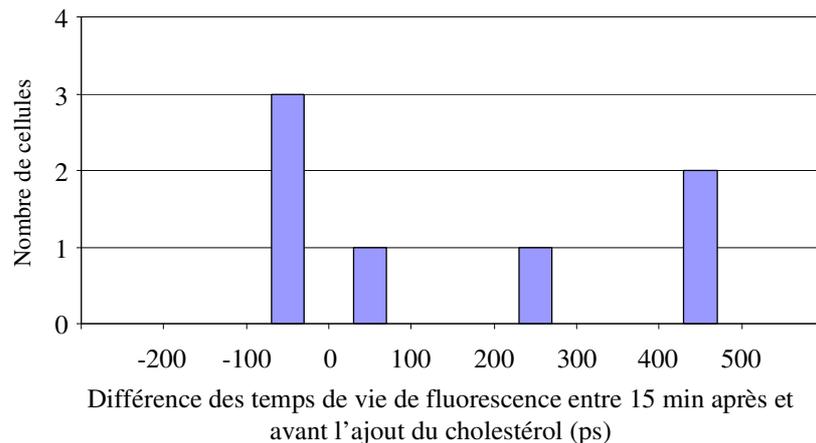


Figure 4-10 : histogramme de l'évolution du temps de vie de la CFP entre avant et 15 minutes après l'ajout de cholestérol. Sur l'axe des abscisses est reportée la différence de temps de vie mesurée : (temps de vie 15 minutes après l'ajout de cholestérol)-(temps de vie avant l'ajout de cholestérol). Une variation positive correspond à une diminution du temps de vie de fluorescence. L'effectif pour chacune des gammes de 100 ps est reporté sur l'axe des ordonnées.

Il semble y avoir une population qui a un temps de vie stable, et l'autre qui connaît une grande diminution, bien que toutes ces cellules proviennent de la même transfection. Or dans ces conditions, nous n'avons pas de dimerisation possible entre APP et CB1R, donc ces diminutions de temps de vie ne sont pas imputables aux phénomènes que nous étudions : l'ajout de cholestérol ne devrait pas augmenter le FRET. Nous suspectons donc qu'un processus physicochimique atténue la fluorescence de la CFP, et nous pensons au photoblanchiment.

Nous réalisons des mesures complémentaires avec la même transfection (APP-CFP 1,5 µg / CB1R-YFP 1,5 µg) dans les mêmes conditions, et d'autres sans l'ajout de cholestérol (on fait juste les 8 mesures à 0 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 12 min et 15 min) pour confirmer ces premiers résultats. Il est important de bien vérifier que ce n'est pas le cholestérol qui, par des processus qui ne seraient pas ceux qui nous intéressent, induit cette baisse.

	Avant cholestérol		15 min après cholestérol		Différence (ps)
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	
cellule 1	2038	139	1555	169	483
cellule 2	2055	132	1788	155	267
cellule 3	2025	150	1813	189	212
cellule 4	2035	120	1763	174	272
	Sans cholestérol t0		t0 + 15 min		
cellule 5	2031	144	2000	87	31
cellule 6	1973	126	1825	142	148
Moyenne	2026		1791		
Ecart type	28		143		

Tableau 4-6 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 6 cellules transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 15 minutes après ou sans ajout de cholestérol à t0 et t0 + 15 minutes.

Dans tous les cas, nous constatons une diminution du temps de vie de fluorescence de la CFP. Pour les deux cellules sans ajout de cholestérol nous obtenons une diminution non significative (31 ps) et une diminution assez importante (148 ps). Avec l'ajout de cholestérol, nous avons à chaque fois des diminutions supérieures à 200 ps. Il semble donc que nous ayons une diminution de temps de vie qui n'est pas due à l'homodimérisation de l'APP, ni à l'ajout de cholestérol.

II.3 - Mise en évidence du photoblanchiment de la CFP

Nous décidons donc d'étudier l'évolution du temps de vie de fluorescence de la CFP suivant l'exposition de la cellule au rayonnement.

Pour commencer, nous réalisons (toujours avec une transfection APP-CFP 1,5 µg / CB1R-YFP 1,5 µg) moins de mesures au cours du temps : nous relevons le temps de vie de fluorescence moyen de la cellule à l'instant initial, puis 10 minutes après et 20 minutes après (tableau 4-7).

	Avant cholestérol		20 min après cholestérol		Différence (ps)
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	
cellule 1	1928	132	1937	140	-9
cellule 2	1938	95	1922	78	16
	Sans cholestérol t0		t0 + 20 min		
cellule 3	2056	133	2028	119	28
cellule 4	1932	133	1892	109	40
Moyenne	1963		1945		
Ecart type	62		59		

Tableau 4-7 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 4 cellules transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 20 minutes après ou sans ajout de cholestérol à t0 et t0 + 20 minutes.

Dans ces conditions, nous n'avons pas de diminution significative du temps de vie, ce qui conforte notre hypothèse de photoblanchiment.

Pour en être sûr, nous relevons les temps de vie de fluorescence de la CFP pour différentes puissances laser, et en exposant la cellule de manière continue au laser pendant 5 et 10 minutes (tableau 4-8).

Puissance (en μW)		t0		t0 + 5min		t0 + 10 min		Différence sur 10 min
		Moy (ps)	Ec.ty (ps)	Moy (ps)	Ec.ty (ps)	Moy (ps)	Ec.ty (ps)	
50-100	Cellule 1	2094	419	2061	393	2064	389	30
	Cellule 2	2192	336	2185	324	2163	304	29
200-250	Cellule 3	2162	216	2088	222	2068	222	94
	Cellule 4	2233	231	2174	211	2145	214	88
350-400	Cellule 5	2208	164	2052	128	2111	114	97
	Cellule 6	2178	142	2112	122	2088	131	90
450-500	Cellule 7	2061	193	1969	180	1927	177	134
500-550	Cellule 8	2087	142	2015	124	2019	141	68
	Cellule 9	2010	199	2054	198	1932	178	78
	Cellule 10	2064	116	2042	122	1880	132	184
	Cellule 11	1982	100	1895	123	1914	114	68
	Cellule 12	1885	130	1712	175	1692	164	193
	Cellule 13	1873	160	1865	160	1817	179	56
700-750	Cellule 14	2141	137	966	138	786	116	1355
	Cellule 15	2130	107	1982	93	1985	104	145
1100-1150	Cellule 16	2124	170	1847	134	1759	166	365

Tableau 4-8 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 16 cellules transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP. Les puissances sont celles incidentes sur l'échantillon. Les mesures sont effectuées après 5 et 10 minutes d'exposition continue au rayonnement.

Il semble que, grossièrement, la différence de temps de vie augmente quand la puissance laser augmente. Mais cette diminution est assez aléatoire : des valeurs très différentes sont trouvées suivant les cellules, qui pourtant ont toutes subi la même transfection.

Ces mesures nous permettent de conclure que c'est bien le photoblanchiment qui nous gêne. Nous rejoignons ici des résultats publiés sur le photoblanchiment de la CFP et son influence sur la mise en évidence de FRET par FLIM [Tramier 2006] : le photoblanchiment entraîne une baisse du temps de vie de fluorescence qui en plus varie de cellule à cellule.

A la lumière de ces expériences, il apparaît que nous pouvons minimiser grandement l'influence du photoblanchiment, voire nous en affranchir en réduisant l'exposition des cellules au rayonnement. Pour cela, nous suggérons d'éclairer nos échantillons avec une puissance incidente inférieure à 450 μW , puisque dans ces conditions, une exposition continue durant plus de cinq minutes n'entraîne pas de diminution de temps de vie significative (voir tableau 4-8). De plus, nous proposons de réduire le nombre de mesures au cours du temps, et même de réduire le nombre d'acquisitions pour une mesure, c'est-à-dire changer l'algorithme d'échantillonnage du déclin de fluorescence.

II.4 - Réduction du temps d'acquisition

II.4.1 - Algorithme développé au laboratoire

Pour ce point, nous essayons de manière empirique de trouver un algorithme qui échantillonne proprement le déclin de fluorescence, et qui donne des résultats comparables à ceux obtenus avec l'algorithme A_{ref} , tout en réduisant le nombre d'images acquises. Nous développons donc un nouvel algorithme A_{v} , avec neuf acquisitions au lieu des treize de A_{ref} (tableau 4-9).

	Aref	A9
1ère acquisition	t0 + 10000	t0 + 10000
2ème acquisition	t0 + 8000	t0 + 8000
3ème acquisition	t0 + 6000	t0 + 6000
4ème acquisition	t0 + 5000	t0 + 4000
5ème acquisition	t0 + 4000	t0 + 3000
6ème acquisition	t0 + 3000	t0 + 2000
7ème acquisition	t0 + 2500	t0 + 1500
8ème acquisition	t0 + 2000	t0 + 750
9ème acquisition	t0 + 1500	t0 + 0
10ème acquisition	t0 + 1000	
11ème acquisition	t0 + 750	
12ème acquisition	t0 + 350	
13ème acquisition	t0 + 0	

Tableau 4-9 : position des différentes acquisitions pour les 2 algorithmes Aref et A9. t0 est le début du déclin.

Nous avons retraité 10 expériences de mesure de temps de vie (images de cellules HEK-293 transfectées avec APP-CFP 1,5 μg / APP-YFP 1,5 μg précédemment traitées avec l'algorithme A_{ref}) pour voir les modifications que ce nouvel algorithme provoque. En moyenne, sur ces 10 images de temps de vie autour de 2 ns, nous constatons un décalage (augmentation ou diminution suivant les cas) de 10 ps en valeur absolue du temps de vie entre les deux mesures. L'écart type quant à lui reste quasiment inchangé, avec une très légère augmentation inférieure à 10 ps. Nous présentons ici les résultats obtenus avec les deux algorithmes précités sur la cellule de la figure 4-11.

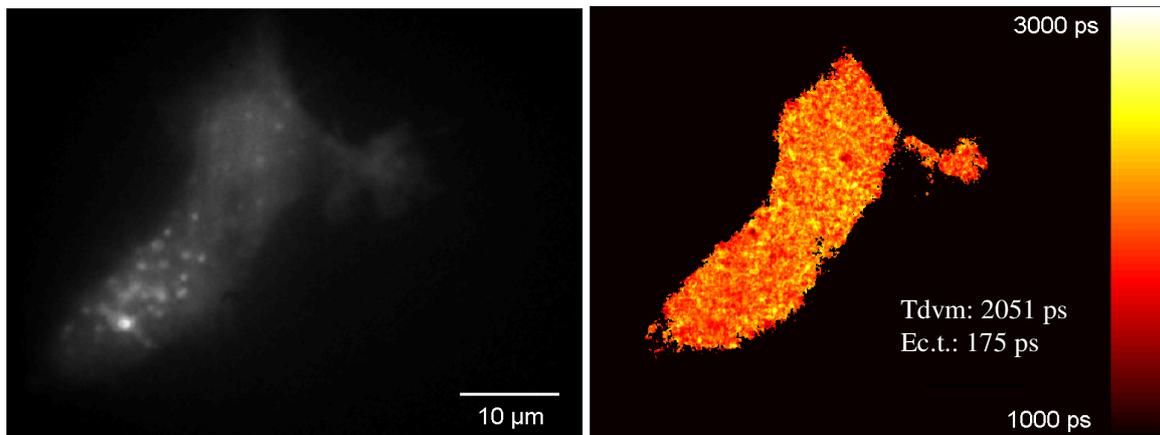


Figure 4-11 : images en intensité (à gauche) et en durée de vie (à droite) de fluorescence d'une cellule HEK-293 transfectée avec APP-CFP et APP-YFP. La carte FLIM a été obtenue avec l'algorithme Aref.

Les deux histogrammes représentant la répartition des pixels en fonction du temps de vie de fluorescence obtenus pour chacun des algorithmes (figure 4-12) témoignent de la faible différence provoquée par le changement d'algorithme. Dans le cas rapporté ici, en passant de 13 à 9 acquisitions, nous obtenons une diminution du temps de vie moyen de 16 ps.

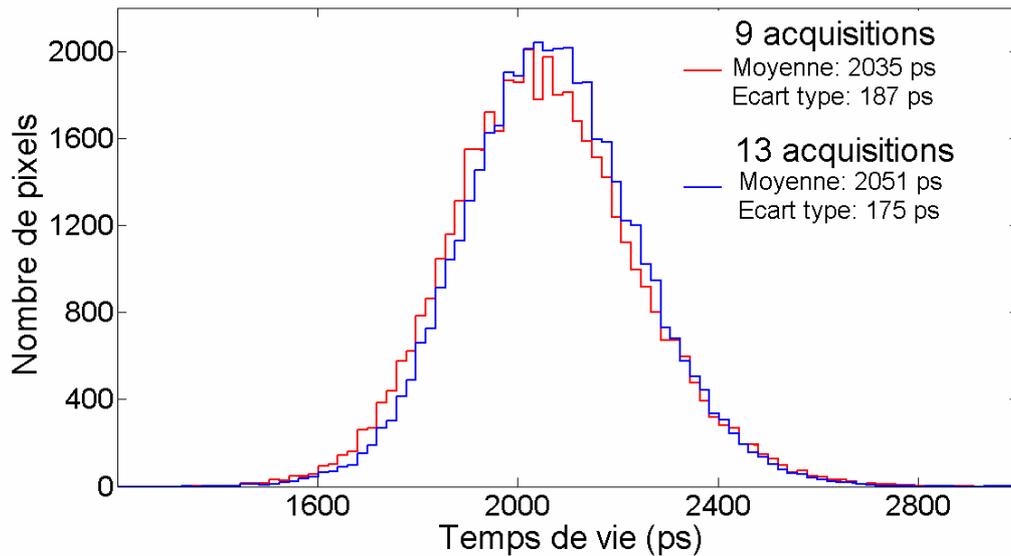


Figure 4-12 : histogrammes des temps de vie calculés pour toute la carte pour chacun des algorithmes.

Nous nous sommes également focalisés sur un pixel particulier de l'image pour voir ce que ce changement d'algorithme modifie sur le déclin de fluorescence (figure 4-13). Comme on peut le constater, les modifications sont vraiment minimales.

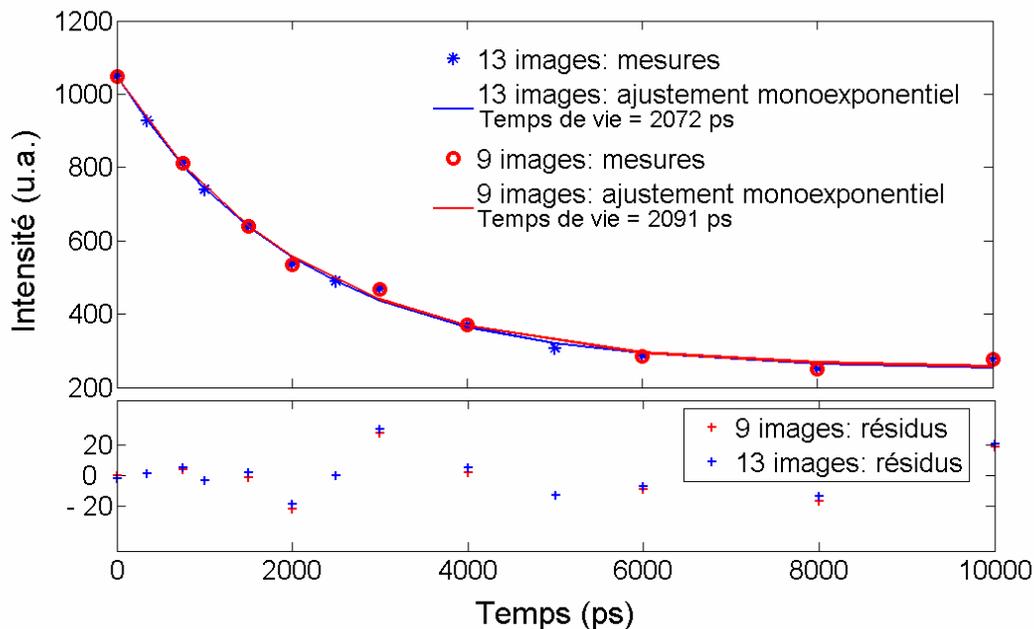


Figure 4-13 : déclins mesurés pour un pixel particulier (le même) de la carte FLIM de la figure 4-11.

Une fois que nous savons qu'avec ce nouvel algorithme, nous ne modifions pas le temps de vie mesuré, nous nous intéressons au paramètre essentiel dans l'objectif d'une diminution du photoblanchiment : le temps total d'acquisition. Pour l'algorithme A_{ref} à 13 images, 34 s sont nécessaires pour avoir une carte FLIM, alors qu'avec A_0 , 22 s suffisent.

Bien entendu, cet algorithme n'est sans doute pas l'algorithme optimum, mais nous avons essayé de trouver une solution rapide, dont nous savions quelle ne modifiait pas le résultat. En repartant de A_{ref} et en enlevant certaines images, il était facile de comparer ces deux algorithmes sur toutes les images déjà acquises. Cet algorithme A_0 nous donne donc des valeurs tout à fait comparables à celles obtenues avec A_{ref} en réduisant d'un tiers le temps d'acquisition (et donc d'exposition des

échantillons) nécessaire. Dans la suite, nous allons utiliser essentiellement cet algorithme qui a prouvé sa fiabilité et sa robustesse. Cependant, nous nous intéressons aussi à une autre méthode de détermination du temps de vie, appelée RLD (pour Rapid Lifetime Determination) qui, si elle est maîtrisée peut encore grandement réduire le temps d'acquisition.

II.4.2 - Détermination rapide du temps de vie de fluorescence : RLD

La solution la mieux adaptée pour réduire considérablement le temps d'acquisition et le temps de traitement nécessaire à l'obtention d'une image FLIM est sans doute la technique de détermination du temps de vie de fluorescence rapide ou RLD (pour Rapid Lifetime Determination) [Munro 2005], [Moore 2004], [Chan 2001], [Sharman 1999], [Ballew 1989].

Cette technique a été proposée pour la première fois par Ashworth en 1983 [Woods 1984]. En travaillant avec un modèle de déclin de fluorescence monoexponentiel, l'évolution de l'intensité au cours du temps s'écrit :

$$I(t) = a \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

avec a l'amplitude, constante au cours du déclin, qui dépend de la puissance de l'excitation, de la concentration en fluorophores, et du rendement quantique du fluorophore, et τ le temps de vie de fluorescence. (Nous nous affranchissons ici d'une éventuelle composante continue, qui dans notre cas disparaît quand nous réalisons le seuillage sur nos images avant traitement). Dans une telle expression, il y a deux inconnues : a et τ . Dès lors, il suffit de réaliser deux acquisitions pour les obtenir. Concrètement, les signaux de fluorescence étant relativement faibles, les deux valeurs sont obtenus en intégrant le signal sur deux « portes ». Ainsi le temps de vie est évalué à partir du rapport des aires intégrées pour deux régions différentes sous la courbe du déclin (figure 4-14). Lorsque l'on travaille avec un système d'imagerie déclenchée qui permet d'ouvrir des « portes temporelles » (comme c'est notre cas grâce à l'intensificateur), cette intégration est réalisée directement par le détecteur, et le niveau d'intensité obtenue en chaque pixel pour chacune des images correspond à l'intégration sur une durée égale à la largeur de la « porte temporelle » ouverte (chaque porte est ouverte après une impulsion différente).

Cette technique RLD peut aussi être utilisée pour des déclins double-exponentiel, mais dans ce cas, il y a plus d'inconnues (4) donc au moins quatre acquisitions sont nécessaires, et le traitement est un peu plus complexe. Cependant, cela reste très avantageux par rapport aux techniques d'ajustement par la méthode des moindres carrés [Sharman 1999].

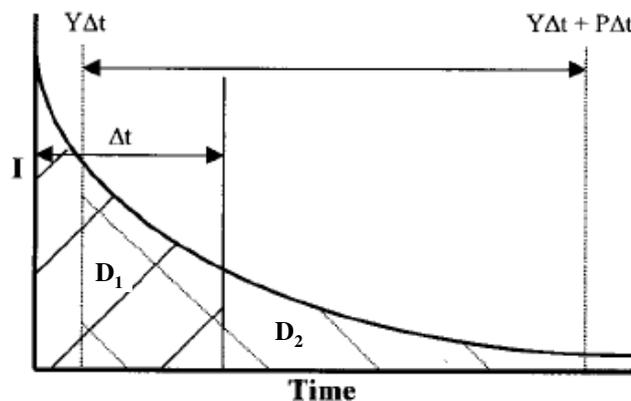


Figure 4-14 : principe de la mesure de temps de vie de fluorescence par RLD [Chan 2001].

Sur ce schéma, le déclin de fluorescence est représenté, et les deux aires utilisées pour calculer le temps de vie de fluorescence sont hachurées.

Au mieux, l'écart type relatif du RLD est juste 30 à 40 % moins bon que pour une méthode de mesure du temps de vie de fluorescence utilisant un ajustement du déclin de fluorescence par la méthode des moindres carrés, mais l'acquisition et les calculs sont beaucoup plus rapides (on peut gagner plus d'un facteur 10 en temps). Ainsi la vitesse et la précision de la RLD couplée à la facilité d'acquisition en font un outil attractif pour l'analyse en temps réel. Plusieurs laboratoires ont d'ailleurs développé des dispositifs d'imagerie utilisant cette méthode pour diverses applications [Wang 1991], [Agronskaia 2003], [Requejo-Isidro 2004].

Il y a de nombreuses manières de réaliser la détermination de temps de vie de fluorescence rapide. En effet, le principe est à chaque fois le même, mais les deux portes peuvent être de largeurs différentes, elles peuvent se recouvrir, être contiguës, ou être séparées d'un certain temps.

Définissons les notations utilisées dans la figure 4-14 et qui vont nous servir dans la suite : Δt est la largeur temporelle de la première porte ; P est le « facteur d'échelle » de la deuxième porte : cette dernière a donc une largeur $P\Delta t$; enfin Y est le décalage relatif de la deuxième porte par rapport à la première : lorsque $Y < 1$, les deux portes se recouvrent, lorsque $Y = 1$, les deux portes sont contiguës et lorsque $Y > 1$, les deux portes sont séparées par un fossé. Pratiquement, la première porte est ouverte de 0 à Δt , et la seconde est ouverte de $Y\Delta t$ à $Y\Delta t + P\Delta t$. En notant D_1 et D_2 les valeurs d'intensité intégrée respectivement au cours de l'ouverture de la première porte et de la deuxième porte, nous avons :

$$D_1 = \int_0^{\Delta t} a \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt$$

$$D_2 = \int_{Y\Delta t}^{Y\Delta t + P\Delta t} a \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt$$

Puis nous pouvons exprimer leur rapport en fonction du temps de vie cherché τ :

$$\frac{D_2}{D_1} = \frac{\int_{Y\Delta t}^{Y\Delta t + P\Delta t} a \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt}{\int_0^{\Delta t} a \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt}$$

$$\frac{D_2}{D_1} = \frac{-a\tau \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right]_{Y\Delta t}^{Y\Delta t + P\Delta t}}{-a\tau \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right]_0^{\Delta t}}$$

$$\frac{D_2}{D_1} = \frac{\exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau}(P+Y)\right) - \exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau}Y\right)}{\exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau}\right) - 1}$$

Lorsque $P=1$, c'est-à-dire lorsque les deux portes ont la même largeur Δt , nous avons facilement accès à τ :

$$\frac{D_2}{D_1} = \exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau} Y\right) \frac{\exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau}\right) - 1}{\exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau}\right) - 1}$$

$$\text{d'où : } \frac{\Delta t}{\tau} = -\frac{1}{Y} \ln\left(\frac{D_2}{D_1}\right)$$

$$\text{et donc } \tau = \frac{\Delta t \cdot Y}{\ln\left(\frac{D_1}{D_2}\right)}$$

Nous allons toujours nous placer dans ce cas là, pour lequel le traitement est immédiat. En effet, notre système de détection, plus précisément notre intensificateur, ne nous permet pas de manière simple et pratique d'ouvrir deux portes de largeurs différentes. Nous nous sommes concentrés sur deux cas largement étudiés dans la littérature : $Y = 1$ (les deux portes sont contiguës) et $Y = 1/2$ (les deux portes se recouvrent pour moitié). Pour ces deux cas, des expressions de l'amplitude figurent dans la référence [Sharman 1999].

Mais en ajustant Y et P , de meilleurs résultats peuvent être obtenus. Les valeurs optimales de ces deux paramètres varient suivant le bruit de la source et le système de détection. En général, un recouvrement des deux intervalles ($Y < 1$) et une deuxième porte plus large améliorent les performances [Munro 2005], [Moore 2004].

Cependant, pour une petite gamme de valeurs du rapport $\frac{\Delta t}{\tau}$, les résultats obtenus avec la RLD « simple » ($P = 1$) sont tout à fait satisfaisants en terme de précision et d'écart type [Moore 2004]. Ainsi lorsque le temps de vie de fluorescence que l'on cherche à mesurer est grossièrement connu, et qu'il est possible d'ouvrir des portes 2 à 3 fois plus longues que le temps de vie mesuré, la grande simplicité d'acquisition et de traitement du RLD simple en font un outil de choix. Les acquisitions avec un recouvrement des deux portes sont même préférées, car le signal collecté au début du déclin est bien plus intense que dans la queue [Sharman 1999].

En ce qui nous concerne, l'intensificateur dont nous disposons possède un mode configuré pour faire de la RLD. Ce mode, « User 1 » permet d'ouvrir des portes de 5 ns à 20 MHz. Nous avons vérifié la largeur effective de ces portes à 15 MHz, qui est en fait de 4,8 ns (figure 4-15). D'après ce que nous venons de voir, cette largeur de porte est optimale pour mesurer des temps de vie compris entre $4,8/2 = 2,4$ et $4,8/3 = 1,6$ ns, ce qui correspond parfaitement aux temps de vie de fluorescence de la CFP que nous avons mesurée précédemment.

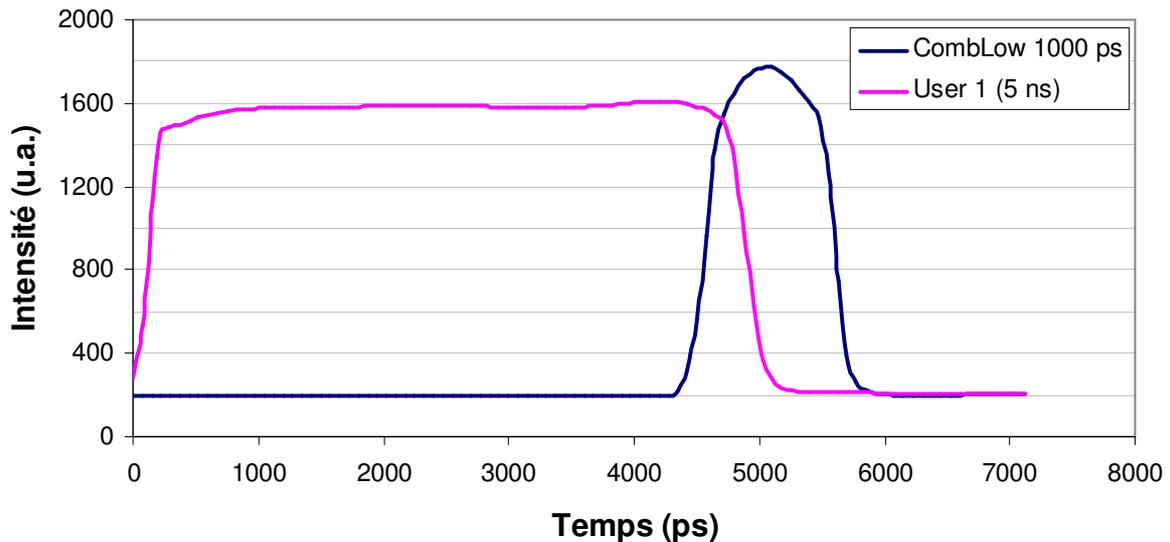


Figure 4-15 : mesure de la largeur des portes en mode User 1. On trouve une largeur de 4800 ps. Comparaison du positionnement de la porte du mode User 1 par rapport à la porte de 1000 ps du mode CombLow. La porte de 4800 ps s'ouvre beaucoup plus tôt, il faut donc décaler le début de l'acquisition.

Comme dans la partie précédente, nous avons mené des études sur des échantillons stables pour voir l'influence des différents paramètres sur l'acquisition. Nous avons fait des essais avec les deux algorithmes de RLD simple présentés ci-dessus : $P = Y = 1$ qui correspond à deux portes contiguës de même largeur et $P = 1, Y = 1/2$ pour lequel les deux portes de même largeur se chevauchent de 50%. Nous n'obtenons des résultats cohérents que pour ce dernier algorithme avec recouvrement des portes. Ceci peut sans doute s'expliquer par le faible signal collecté dans la queue du déclin, qui doit être noyé dans le bruit et qui ne nous permet donc pas de calculer des temps de vie de manière correcte. Nous pensons donc utiliser un algorithme avec une première acquisition à t_0 , et la suivante à $t_0 + 2400$ ps.

Nous avons constaté que le positionnement du début de l'acquisition était ici aussi très important, et que d'ailleurs, avec les portes de 5 ns, le début du déclin se situait plusieurs centaines de picosecondes avant celui observé avec les portes du mode CombLow. Ceci est essentiellement dû à un décalage temporel entre les portes de ces deux modes que nous avons pu mettre en évidence (figure 4-15). Ainsi, il est également essentiel dans le cas de la RLD de repérer précisément le maximum d'intensité pour positionner le début de l'acquisition, et nous avons constaté que les meilleurs résultats en termes de valeurs et d'écart type sont obtenus lorsque la première porte est ouverte 500 ps après le maximum repéré.

Paramètre		CCD			HRI	
		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	Aref	10	100	0	800	580
	RLDc	10	100	0	4800	530

Tableau 4-10 : valeurs des différents paramètres d'acquisition utilisés pour comparer les valeurs obtenues avec l'algorithme Aref, et en RLDc.

Comme pour caractériser notre montage dans la partie précédente, nous avons observé dans les meilleures conditions (tableau 4-10), deux solutions de rhodamine B, l'une diluée dans l'eau et l'autre diluée dans de l'éthanol. Comme les niveaux de fluorescence sont importants, dans les deux cas, le temps d'exposition de la caméra est réglé sur 100 ms, et les valeurs de gain sont assez faibles. Nous avons comparé les temps de vie de fluorescence mesurés avec l'algorithme « multi-

portes » de référence A_{ref} et ceux obtenus avec la technique de RLD avec recouvrement des deux portes à 50 % (appelée aussi RLDc). Les tableaux 4-11 et 4-12 présentent les résultats trouvés. Tout d'abord, on constate que les temps de vie absolus mesurés ne sont pas exactement les mêmes que ceux mesurés dans la partie précédente sur les mêmes échantillons. Ceci peut s'expliquer par le fait que certains paramètres expérimentaux qui influent sur cette mesure (la température, la viscosité des solvants, la concentration en colorant de la solution) ne sont pas maîtrisés et n'avaient probablement pas les mêmes valeurs.

Rhodamine B dans EtOH					
		MP Aref		RLDc	
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	
Zone 1	2154	33	2171	25	
Zone 2	2163	33	2175	25	
Zone 3	2150	33	2179	25	
Zone 4	2153	33	2173	26	
Zone 5	2160	33	2174	26	
Moyenne	2156		2174		
Ecart type	5		3		

Tableau 4-11 : mesures de temps de vie de fluorescence d'une solution de rhodamine B diluée dans de l'éthanol avec les deux modes d'acquisition multi-portes et RLD.

Rhodamine B dans eau					
		MP Aref		RLDc	
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	
Zone 1	1559	20	1532	22	
Zone 2	1566	20	1529	22	
Zone 3	1567	20	1532	22	
Zone 4	1568	20	1529	22	
Zone 5	1561	20	1531	22	
Moyenne	1564		1531		
Ecart type	4		2		

Tableau 4-12 : mesures de temps de vie de fluorescence d'une solution de rhodamine B diluée dans de l'eau avec les deux modes d'acquisition multi-portes et RLD.

Les résultats obtenus montrent une très grande reproductibilité (pour 5 mesures, l'écart type sur l'ensemble des mesures moyennes est inférieure à 5 ps), et les valeurs de temps de vie de fluorescence trouvées avec la méthode RLDc sont en accord avec ceux obtenus grâce à notre méthode de référence. La différence entre les deux est de l'ordre de 30 ps.

Nous avons également essayé cette méthode sur des échantillons biologiques. Nous avons observé des cellules HEK-293 co-transfectées avec APP-YFP et CB1R-mCherry. Pour ces mesures, le signal de fluorescence étant plus faible, nous travaillons avec des temps d'acquisition sur la caméra de 250 ms, et des valeurs de gain plus élevées (tableau 4-13). Comme précédemment, nous pouvons remarquer que, en passant de l'acquisition multi-portes à la RLDc, il faut diminuer le gain de l'intensificateur de 50 V.

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	Aref	10	250	0	800	700-750
	RLDc	10	250	0	4800	750-800

Tableau 4-13 : valeurs des différents paramètres d'acquisition utilisés pour comparer les valeurs de temps de vie de fluorescence dans les cellules obtenues avec l'algorithme Aref, et en RLDc.

Ces deux fluorophores ont des temps de vie de fluorescence qui sont en limite de la gamme « optimale » que l'on peut mesurer en RLD avec des portes de 4,8 ns. Ainsi en se plaçant dans les conditions les plus défavorables, nous avons une idée de l'erreur qui peut être induite par cette technique en bord de bande.

	APP YFP				CB1 mCherry			
	MP Aref		RLDc		MP Aref		RLDc	
	Moy (ps)	Ec.t.(ps)	Moy (ps)	Ec.t.(ps)	Moy (ps)	Ec.t.(ps)	Moy (ps)	Ec.t.(ps)
Cellule 1	2294	228	2466	197	1364	64	1408	72
Cellule 2	2264	232	2477	176	1447	100	1470	112
Cellule 3	2461	215	2754	226	1357	97	1405	105
Cellule 4	2606	255	2750	224	1324	60	1346	56
Cellule 5	2505	258	2636	252	1306	51	1354	52
Moyenne	2426	238	2617	215	1360	74	1397	79
Ecart type	145		141		54		50	

Tableau 4-14 : mesures de temps de vie de fluorescence de la YFP et de la mCherry dans 5 cellules transfectées avec APP-YFP et CB1R-mCherry. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avec les modes d'acquisition multi-portes Aref et RLDc.

Nous constatons (tableau 4-14) que dans les deux cas, sur des échantillons biologiques, l'écart type de chacune des mesures et l'écart type sur les moyennes chutent, toujours pour les mêmes raisons (diminution de la quantité de signal de fluorescence, variabilité entre les échantillons). Pour les temps de vie longs (mesure sur YFP), il apparaît que l'acquisition RLDc surestime de manière assez importante (quasiment 200 ps) le temps de vie de fluorescence, ce qui est assez problématique. Par contre, pour les temps de vie courts (mesure sur mCherry), les résultats sont conformes à ceux obtenus avec l'acquisition multi-portes.

Enfin, dans ces conditions, le temps nécessaire à l'acquisition ne dépasse pas 5 secondes.

En conclusion, nous avons ici réussi à diminuer considérablement le temps d'acquisition, nous permettant ainsi de réduire le temps d'exposition de nos échantillons au rayonnement. Les résultats trouvés sont en parfait accord avec ceux obtenus avec l'algorithme de référence sur la gamme [1350 ps -2200 ps]. Pour des temps de vie plus longs, nous surestimons de manière assez importante le temps de vie en RLDc. Pour des temps de vie courts (1000 ps ou moins), on doit vraisemblablement avoir le même problème... C'est pourquoi, pour tenter de mettre en évidence du FRET de manière certaine, et de réussir à mesurer précisément les variations de temps de vie de fluorescence du donneur lors de ce transfert, nous préférons dans un premier temps utiliser l'algorithme à 9 portes.

II.5 - Mesures sur un témoin de FRET positif

En parallèle de notre travail sur la réduction du temps d'acquisition, nous avons pu, grâce aux neurobiologistes, obtenir des témoins positifs de FRET. Il s'agit de sondes (constructions moléculaires) qui ont, à chaque extrémité, un des deux fluorophores du couple FRET (CFP et YFP) séparés d'une distance connue. En insérant entre ces deux protéines un certain nombre d'acides aminés, il est possible de calculer l'éloignement et d'en déduire l'efficacité du transfert entre ces deux fluorophores.

Nous avons transfecté des cellules HEK-293 avec deux sondes : Cy 37 (CFP et YFP sont dans ce cas séparées par 37 acides aminés, ce qui correspond à une efficacité de FRET de 60%), et Cy 24 (CFP et YFP sont séparés par 24 acides aminés, ce qui assure une efficacité de 80%). Pour pouvoir comparer avec les mesures de temps de vie réalisées sur les cellules HEK-293 transfectées avec APP-CFP et APP-YFP et se placer dans les mêmes conditions, nous utilisons ici l'algorithme A_{ref} (tableau 4-15).

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	Aref	10	250	0	800	750 à 850

Tableau 4-15 : valeurs des différents paramètres d'acquisition. Nous utilisons l'algorithme A_{ref} , et nous faisons varier la valeur du gain suivant le signal de fluorescence.

Nous avons rapporté ci-dessous une image représentative de ce que l'on obtient avec la transfection Cy 24 (figure 4-16).

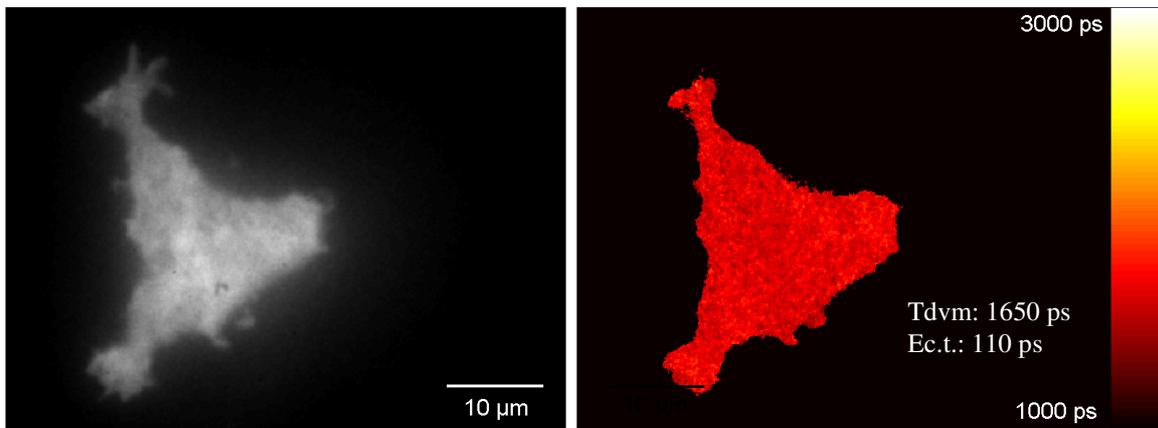


Figure 4-16 : images en intensité (à gauche) et en durée de vie (à droite) de fluorescence de la CFP d'une cellule HEK-293 transfectée avec la sonde Cy 24, témoin positif de FRET avec une efficacité de 80%.

Les valeurs numériques obtenues avec chacune des sondes figurent dans les tableaux 4-16 et 4-17.

Transfection Cy37		
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
Cellule 1	1731	67
Cellule 2	1769	66
Cellule 3	1705	78
Cellule 4	1899	89
Cellule 5	1648	73
Cellule 6	1777	76
Cellule 7	1765	63
Cellule 8	1656	70
Cellule 9	1746	72
Cellule 10	1713	70
Cellule 11	1791	70
Moyenne	1745	
Ecart type	69	

Transfection Cy24		
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
Cellule 1	1723	88
Cellule 2	1656	59
Cellule 3	1664	36
Cellule 4	1683	64
Cellule 5	1650	51
Cellule 6	1697	64
Cellule 7	1643	50
Cellule 8	1604	48
Cellule 9	1617	46
Cellule 10	1624	45
Moyenne	1656	
Ecart type	37	

À gauche : Tableau 4-16 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 11 cellules transfectées avec la sonde Cy 37 (60% FRET).

À droite : Tableau 4-17 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 10 cellules transfectées avec la sonde Cy 24 (80% de FRET).

Dans un premier temps, si on compare ces résultats à ceux obtenus avec des cellules transfectées avec APP-CFP / CB1R-YFP (1,5 μg de chaque ADN), pour lesquelles nous obtenons un temps de vie moyen de fluorescence de 2055 ps (tableau 4-3), nous avons pour les deux sondes des valeurs nettement plus courtes. Avec la sonde Cy 37 (60% de FRET), nous trouvons une moyenne sur les 11 acquisitions réalisées qui est 310 ps plus basse, et avec la seconde sonde Cy 24 (80% de FRET), la moyenne (cette fois sur 10 acquisitions) est 399 ps plus basse. Ainsi nous pouvons très nettement mettre en évidence des différences de temps de vie de fluorescence entre des échantillons sans FRET et des échantillons avec une efficacité de 60% et plus de FRET.

Ensuite, nous sommes apparemment capables de faire la distinction entre des efficacités de FRET différentes de 20%. Dans ce cas, la différence sur la moyenne des temps de vie est inférieure à 100 ps, et vaut 89 ps. Pour pouvoir être catégoriques, cette différence étant relativement faible, il faut augmenter le nombre d'échantillons pour avoir des statistiques correctes, mais une telle mesure est tout à fait envisageable.

A la lumière de ces résultats, nous sommes relativement confiants, car nous estimons être capables de mettre en évidence un accroissement de FRET supérieur à 20% dans les cellules. Ainsi, si l'augmentation de la quantité de cholestérol à la membrane dans les cellules HEK-293 transfectées avec APP-CFP et APP-YFP provoque une hausse du FRET entre CFP et YFP dans ces proportions, nous devrions le mesurer avec notre dispositif.

II.6 - Mesures sur APP-CFP dans les nouvelles conditions

Nous réalisons une nouvelle série d'expériences en exploitant les résultats que nous venons de présenter. Pour ne pas photoblanchir la CFP, nous exposons nos échantillons à une puissance laser incidente inférieure à 450 μW , et nous ne mesurons le temps de vie de fluorescence qu'en quatre instants : avant l'ajout du cholestérol, 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes après. De plus, nous utilisons l'algorithme A_9 (tableau 4-18). Dans un premier temps, nous n'utilisons pas la RLDC, puisque avec une acquisition multi-porte et un ajustement du déclin par la méthode des moindres carrés, nous obtenons des mesures plus précises. Or comme nous ne connaissons pas l'augmentation de l'efficacité du FRET qui peut être induite par l'ajout de cholestérol, nous voulons être sûrs de ne pas passer à côté. Si avec cet algorithme, nous arrivons à mettre en évidence une différence de temps de vie de fluorescence de la CFP, nous essaierons alors la RLDC.

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	A9	10	250	0	800	750-850

Tableau 4-18 : valeurs des différents paramètres d'acquisition. Nous utilisons l'algorithme A_9 , et nous faisons varier la valeur du gain suivant le signal de fluorescence.

Nous commençons par regarder le contrôle, c'est-à-dire les cellules HEK-293 transfectées avec APP-CFP / CB1R-YFP (1,5 μg de chaque ADN). Avec cette transfection, l'ajout de cholestérol ne doit pas augmenter le FRET, et le temps de vie de fluorescence de la CFP doit rester stable. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 4-19 et dans la figure 4-17. Dans ces conditions de transfection, nous avons une diminution moyenne de 32 ps.

	Avant cholestérol		15 min après cholestérol	
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
cellule 1	1950	189	1895	178
cellule 2	1948	221	1999	220
cellule 3	2076	187	1989	171
cellule 4	2067	187	2029	165
Moyenne	2010		1978	
Ecart type	71		58	

Tableau 4-19 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 4 cellules transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 15 minutes après.

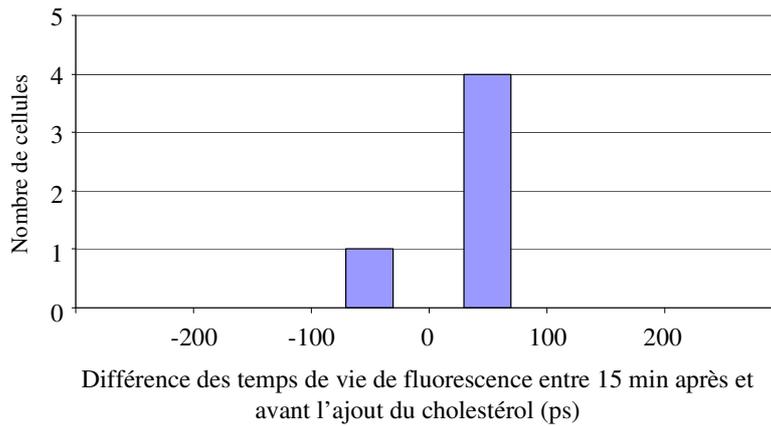


Figure 4-17 : histogramme relatant l'évolution du temps de vie de la CFP entre avant et 15 minutes après l'ajout de cholestérol pour une transfection APP-CFP / CB1R-YFP.

Nous mesurons alors l'évolution du temps de vie de la CFP après l'ajout de cholestérol sur des cellules HEK-293 transfectées avec APP-CFP / APP-YFP, et nous espérons obtenir une diminution du temps de vie supérieure à 32 ps, au moins de l'ordre de 100 ps.

	Avant cholestérol		15 min après cholestérol	
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
cellule 1	2166	157	2129	147
cellule 2	2123	127	2123	135
cellule 3	1983	138	1977	123
cellule 4	2006	118	2029	125
cellule 5	2164	158	2069	132
Moyenne	2088		2065	
Ecart type	88		64	

Tableau 4-20 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 5 cellules transfectées avec APP-CFP et APP-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 15 minutes après.