



PSC-BIO 002

Marquage de l'étiquette polyhistidine et application à l'observation des structures de protéines

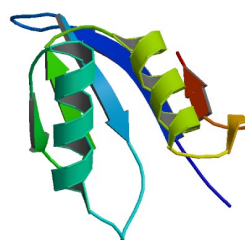
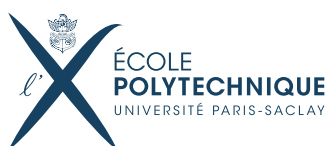
24 avril 2017

Coordinateur : Pierre Damien COUREUX — Tuteur : Pierre Damien COUREUX

Anne WUILLEMIN
Paul JEAMMET

Nathan RONCERAY
Paul RUECHE
Kevin Omar Alvarado VEGA

Mouhamad DRAME
Gabriel GOURAUD



0.1 Remerciements

Nous tenons à remercier Mme Antigoni ALEXANDROU, M. Cédric BOUZIGUES et M. Pierre-Damien COUREUX pour leur encadrement tout au long de notre projet scientifique collectif. Ils nous ont accompagnés de nombreuses heures et n'ont pas compté leur temps, nous permettant de découvrir la vie et les enjeux de leurs laboratoires respectifs.

Cette position à l'interface entre les deux laboratoires a rendu notre projet enrichissant, et c'est aux côtés de nos encadrants que nous avons découvert la complexité de l'interdisciplinarité de notre projet. Notre autonomie a été limitée sur certaines parties du projet, de la chromatographie à la microscopie, et nous sommes particulièrement reconnaissants envers MM. BOUZIGUES et COUREUX de nous avoir encadrés, rendant possible ce projet.

Nous remercions aussi toute l'équipe de chercheurs et de travailleurs du LOB et du BIOC qui sont très dévoués à la vie des laboratoires et que nous avons dérangé mais qui ont toujours été bienveillants à notre égard.

Table des matières

0.1	Remerciements	2
1	Présentation générale et objectifs du projet	6
1.1	Problème à résoudre	6
1.2	Voie proposée	6
1.3	Étapes du projet	7
2	Compte rendu du travail effectué	8
2.1	BIOC	8
2.1.1	Préparation du matériel et des cultures	8
2.1.2	Isolation des protéines aIF1	9
2.1.3	Dépôt de fluorophore sur les lamelles	11
2.1.4	Dépôt de fluorophore sur les grilles	12
2.2	LOB	12
2.2.1	Prise en main du matériel et fonctionnement	12
2.2.2	Dégradation de la fluorescence	14
2.2.3	Pertinence de se placer en ondes évanescentes	14
2.2.4	Choix de la longueur d'onde	14
2.2.5	La microscopie à fluorescence : point trop n'en faut	16
2.2.6	La microscopie électronique : des grilles très concentrées en protéines	16
2.2.7	Pistes pour coupler les deux microscopies	16
2.3	Traitement informatique	17
2.3.1	Les filtrages	17
2.3.2	La super-résolution	18
2.3.3	La super-localisation : une autre méthode point-par-point	19
3	Méthodes développées, protocole, voies à améliorer	20
3.1	Principaux problèmes et obstacles rencontrés	20
3.1.1	Faible couplage	20
3.1.2	Adhérence variable aux surfaces	20
3.1.3	Autofluorescence de la grille	21
3.2	Protocole proposé dans l'état de l'art	22
3.2.1	Couplage	22
3.2.2	Fixation sur la plaque	22
3.2.3	Observation au microscope optique	22
3.3	Etapes manquantes pour finaliser l'objectif initial	22

4	Conclusion	24
5	Bibliographie	32

Introduction

La recherche d'un sujet adapté pour le cadre du PSC a été une difficulté en soi. Nos premières idées de projets en biologie ayant avorté, faute de connaissances assez précises sur la faisabilité des expériences sur les poissons zèbre, nous avons rencontré M. Pierre-Damien Coureux et M. Yves Mechulam, pour réfléchir ensemble à un nouveau projet. Très vite, l'idée de travailler sur le couplage entre différents appareils d'optique nous a séduit : le bon équilibre entre théorie et pratique, entre physique, biologie et informatique (les trois matières majoritairement pratiquées dans le groupe) furent autant d'arguments qui nous poussèrent à nous y lancer.

C'est donc dans le cadre du travail de M. Pierre-Damien Coureux du laboratoire de Biochimie sur le démarrage de la traduction chez les archées, impliquant la protéine aIF1, que nous avons commencé notre travail. L'objectif fixé était de pouvoir corréler l'imagerie optique de fluorescence, pratiquée dans le Laboratoire Optique et Biosciences, avec l'imagerie électronique du laboratoire de BIOC, afin de pouvoir améliorer le traitement structurel des protéines par microscopie électronique.

Notre groupe, issu de différentes filières et origines, et s'orientant vers différentes voies par la suite, a su se répartir le travail conséquent que demandait le projet, et est parvenu à un stade avancé de sa réalisation. Le travail main dans la main hebdomadaire avec les chercheurs, nous a permis de mieux appréhender les enjeux scientifiques, professionnels et organisationnels du monde des équipes de recherche, avec notamment la préparation des séances, les compte rendus et la répartition du travail dont le résultat final est résumé dans le présent rapport.

Chapitre 1

Présentation générale et objectifs du projet

1.1 Problème à résoudre

L'étude structurale des protéines est d'une importance cruciale pour la compréhension du fonctionnement du vivant. En effet, les caractérisations « fonctionnelles » de protéines ont des limites, et il faut parfois s'intéresser à leur structure détaillée pour identifier leurs interactions, leur rôle au sein de la cellule. Aujourd'hui il existe peu de méthodes pour obtenir des structures de protéines et celles-ci sont limitées à certaines protéines. En effet, les méthodes faisant intervenir la cristallisation de protéines et la diffraction aux rayons X sont limitées. Il est très difficile, voire impossible de cristalliser certaines protéines. L'alternative est l'observation des protéines au microscope électronique, qui présente aussi des limites : elle est inadaptée à l'observation des plus petites protéines, et les images sont souvent bruitées. Tout cela rend long et incertain le chemin jusqu'à la structure probable de la protéine. C'est en partant de ce constat que nous avons défini l'objectif de notre PSC, sur proposition de M. Pierre Damien COUREUX.. Nous avons souhaité améliorer une méthode déjà existante permettant d'obtenir des images en haute résolution de protéine.

1.2 Voie proposée

Là où la limite de diffraction empêche la microscopie optique d'atteindre des résolutions suffisantes pour déterminer des structures de protéines, la microscopie électronique permet de dépasser cette limitation. En effet, comme la longueur d'onde (de de Broglie) que l'on peut faire atteindre aux électrons est largement inférieure à celle que l'on peut obtenir pour des photons visibles, la résolution de l'image obtenue est largement supérieure. Toutefois, lors de la prise d'une image d'un échantillon de protéines au microscope électronique il est nécessaire de distinguer les protéines des faux positifs, si cette étape n'est pas réalisée alors la définition de l'image obtenue est trop faible. La solution proposée consiste à coupler une méthode microscopie de fluorescence à notre microscope électronique de la but de repérer la position des protéines au préalable. Le repérage en question se fait par la localisation d'un fluorophore spécifique qui se lie à l'étiquette polyhistidine. Cette étiquette est une courte séquence d'acides aminés histidine répétés, utilisée pour la purification des protéines. Son marquage constitue donc un double usage de l'étiquette astucieux. Un traitement corrélatif des deux images obtenues permettra d'éliminer le bruit (faux positifs), et donc améliorer la résolution de la

structure tridimensionnelle envisagée. Cette méthode nécessite de fixer aux protéines un fluorophore, un composé émettant de la lumière après excitation à une certaine longueur d'onde. Cette lumière est observée en microscopie optique de fluorescence.

1.3 Étapes du projet

1. Purification de la protéine étiquetée polyhystidine
2. Choisir un fluorophore adapté
3. Observer le fluorophore seul au microscope optique
4. Tester le couplage fluorophore protéine
5. Observer la protéine couplée au microscope optique
6. Développer les méthodes de traitement d'images nécessaire pour cartographier l'échantillon
7. Développer par la même occasion la méthode de seuillage et de super résolution nécessaire au couplage de la microscopie optique et électronique
8. Trouver le moyen de vitrifier l'échantillon et de le transporter entre les dispositifs
9. Effectuer la prise de vue au microscope électronique
10. Effectuer la Corrélation

Chapitre 2

Compte rendu du travail effectué

Nous avons partagé nos expériences et manipulations entre les laboratoires de BIOOC (Biochimie) et le LOB (Laboratoire d'Optique et de Bioscience). Pour plus de clarté, nous séparons dans ce rapport la partie BIOOC et la partie LOB, même si chronologiquement les deux furent entremêlées.

2.1 BIOOC

Nous travaillons avec les bactéries BL21 Rosetta, et les plasmides pet15b-lpa-aIF1-Pa, et la protéine aIF1. La protéine aIF1 est une protéine provenant d'archées, des organismes extrêmophiles. Cette protéine a donc des propriétés de résistance bien particulières, par exemple en termes de température de dénaturation.

2.1.1 Préparation du matériel et des cultures

La première étape de notre travail fut d'obtenir des protéines aIF1 en grand nombre, car ce sont les protéines que nous utiliserons par la suite. Nous avons pour cela utilisé la méthode de réplique par un plasmide.

- Insertion plasmide dans les bactéries
- Préparation de 10 boîtes de Pétri. 2 sont tapissées de bactéries contenant les plasmides.
- On place le reste des bactéries dans 1 litre de fluide contenant un antibiotique, qu'on fait tourner pendant 1 nuit 37°C
- Préparation de gel polyacrylamide 15%
- On place le reste des bactéries dans 1 litre de fluide contenant un antibiotique, qu'on fait tourner pendant 1 nuit 37°C
- Préparation de gel polyacrylamide 15%
- Incubation 24h

- Repiquage des boîtes de Pétri. L'intérêt du repiquage est d'étaler les souches de bactéries pour éviter que des bactéries qui ne sont pas résistantes aux antibiotiques (et donc qui n'expriment pas la protéine aIF1) puissent être prélevées si elles surnagent sur d'autres bactéries qui sont résistantes.
A l'issue de ce repiquage on peut prélever des bactéries qui expriment toutes aIF1. On ne travaillera désormais qu'avec celles-ci.

2.1.2 Isolation des protéines aIF1

Préparation des solutions de tampon

Pour cela on a préparé 3 solutions tampons :

Tampon A

- 10mM Hepes pH 7,5
- 3mM BtaME
- 200mM NaCl
- 0,1 mM PMSF

Tampon Dialyse

- 10mM Hepes pH 7,5
- 3mM BtaME
- 100mM NaCl
- 0,1 mM PMSF

Tampon B

- 10mM Hepes pH 7,5
- 3mM BtaME
- 200mM NaCl
- 0,1 mM PMSF
- 500mM imizdazole

Quantités respectives

- Quantité 1 : 2 L
- Quantité 2 : 500 mL
- Quantité 3 : 500 mL

Intérêt de ces produits

- pH 7,5 est le pH physiologique dans lequel les bactéries et les protéines sont stables.
- BetaME est un réducteur qui détruira les ponts disulfures.
- PMSF est un anti-protéase, donc il empêche la destruction des protéines.

— NaCl permet de garder les protéines dans un état stable

Insertion

Insertion des bactéries dans le tampon A

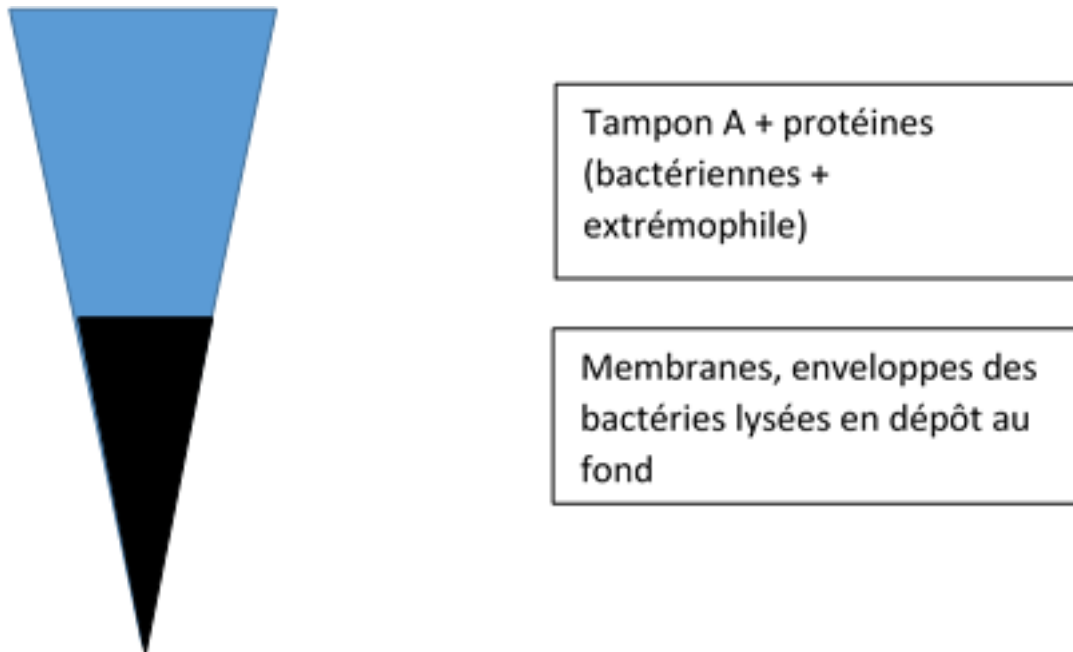


FIGURE 2.1 – Tampon A et bactéries

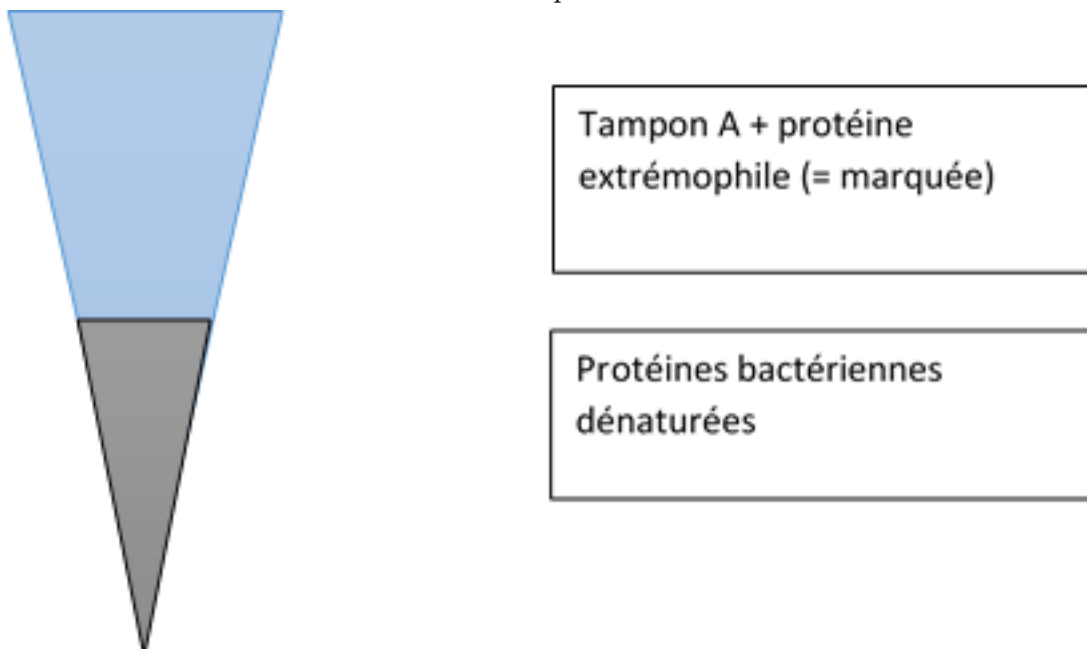


FIGURE 2.2 – Insertion de bactéries dans le tampon A

Sonication

On fait une sonication¹ pendant 5 minutes, avec 1 seconde pleine intensité et 1 seconde de repos. On a alors dans le tampon A les bactéries lysées avec tout ce qu'elles contenaient, en particulier nos protéines marquées.

- L'intérêt du tampon A est visible ici : il stabilise l'intérieur des bactéries pour ne pas qu'il y ait de dégradation du matériel génétique des bactéries.
- Centrifugeuse de l'échantillon pendant 30min 20.000 rpm² 4°C (la faible température permet de limiter la dégradation de notre échantillon).

On récupère ceci :

1. Tampon A + protéines (bactériennes + extrêmophile)
2. Membranes, enveloppes des bactéries lysées en dépôt au fond

La partie liquide est alors chauffée à 70°C pendant 10 min. Ce traitement permet de détruire les protéines classiques, alors que la protéine d'intérêt provient de cellules extrêmophiles et n'est donc pas affectée par cette température.

Après un nouveau passage dans la centrifugeuse, on récupère :

1. Tampon A + protéine extrêmophile (= marquée)
2. Protéines bactériennes dénaturées

Obtention de la protéine purifiée

- On marque une résine TALON (Cobalt + NTA) de la solution A, avec des marqueurs His-Tag, dans laquelle on fait passer le mélange tampon + protéine marquée, qu'on récupère après le passage dans la centrifugeuse. Les protéines marquées restent fixes dans la résine.
- On jette le substrat qui s'est écoulé de la résine (*a priori* les quelques protéines bactériennes qui n'auraient pas été enlevées par nos manipulations précédentes).
- On place alors un autre bûcher sous la résine, et on fait couler quelques gouttes de la solution B. L'objectif est de finir d'éliminer les dernières potentielles protéines bactériennes.
- Enfin, on installe un dernier bûcher sous notre résine
- On verse tout le tampon B. Ce tampon a la propriété d'avoir une meilleure affinité (par l'imidazole) aux marqueurs His-Tag que nos protéines extrêmophiles marquées. On récupère donc nos protéines marquées et du tampon A.
- On effectue une comparaison avec le SDS-Page avec une partie de notre solution d'intérêt.
- Dans un boudin de dialyse, on met notre solution d'intérêt avec 1 L de tampon dialyse.
- Rinsage de la dialyse avec le litre de tampon dialyse restant.
- Passage de la solution dans une résine échangeuse d'ions, qui attire les acides nucléiques et laisse couler notre protéine marquée.

On a ainsi obtenu notre protéine purifiée.

2.1.3 Dépôt de fluorophore sur les lamelles

L'objectif de nos manipulations à terme est de créer une grille de fluorophore et de protéines couplées, c'est-à-dire très faciles à observer. L'intensité du signal observé au microscope à fluorescence dépend de la quantité de fluorophore déposée sur la lamelle. Nous avons commencé nos observations

1. méthode de lyse par impulsions sonores
2. tours/minutes

avec du fluorophore seul, pour ne pas gâcher de protéines. Nous avons déposé du fluorophore très peu concentré (1%), sur des lamelles. Le protocole est le suivant :

- dépôt du fluorophore en solution sur la lamelle
- attente de 30 min
- 2 rinçages avec du PBS pour éliminer l'excès de fluorophores et de solution

La première difficulté fut la mauvaise fixation du fluorophore sur la lamelle, et l'inhomogénéité du dépôt à la surface de notre lamelle. Un autre problème fut le photo-blanchiment du fluorophore lorsqu'il est exposé à la lumière du microscope. Nous n'avions que très peu de temps pour observer notre lamelle. Nous avons paré à cela en utilisant un filtre absorbant pour réduire l'intensité de la lumière perçue par le fluorophore.

2.1.4 Dépôt de fluorophore sur les grilles

Pour fixer le fluorophore sur une grille, on nettoie celle-ci au plasma cleaner, et on procède comme pour une lamelle de verre, avec un dépôt d'un peu moins de 500 mL de solution de concentration adaptée. En revanche, pour un dépôt de protéine, on fait en sorte de charger la surface de la grille pour permettre l'adhérence. En effet les interactions de type Van der Waals qui sont alors permises améliorent la qualité du dépôt, et les protéines se fixent bien.

2.2 LOB

Le travail avec le Laboratoire Optique et Biosciences de l'École polytechnique s'est déroulé sous la coordination de Mr Cédric Bouzigues et Mme Antigoni Alexandrou. Sur l'intervalle de trois séances, nous avons pu tester le fluorophore afin d'en déterminer plusieurs caractéristiques importantes pour la suite de notre travail, notamment la détermination des concentrations de ce fluorophore cohérentes avec le mode d'observation et sa capacité d'adhérence à une surface de verre traitée en fonction de cette concentration.

2.2.1 Prise en main du matériel et fonctionnement

La première séance, effectuée avec un doctorant sur ses propres manipulations, a eu pour but de prendre en main le matériel, notamment :

- Revoir le chemin optique emprunté par le laser, avec en particulier les étapes de focalisation et collimation successives du faisceau gaussien du Laser afin d'avoir un waist le plus faible possible dans le plan focal de l'objectif.
- Les précautions de sécurité du Laser : trouver une configuration spatiale pour pouvoir manipuler de manière efficace tout en respectant un certain nombre de règles de sécurité dû au type de laser utilisé. En particulier on a travaillé avec un laser de catégorie 4 et le réflexe de fermeture des paupières n'est pas assez rapide pour éviter des lésions en cas de déviation de la direction de la lumière émise vers l'œil.
- La préparation des surfaces des lamelles pour qu'elles soient les plus propres possible : avec l'utilisation d'un Plasma Cleaner : cet appareil pompe l'air afin d'arriver à une pression faible et déclencher l'ionisation de l'air restant, ce qui va décaper la surface de la lamelle et la laisser chargée, donc propre, un certain temps
- L'utilisation du microscope optique : réglages pour la vision directe ou via la caméra CCD, l'utilisation d'une huile pour augmenter l'ouverture numérique, le dépôt de l'échantillon (liquide)

- sur la lamelle, délimité par un joint, les réglages de position et de focale plus classiques.
- La particularité de la microscopie de fluorescence : les filtres et miroirs dichroïques à mettre en place, et le choix entre la vision en épi-fluorescence (éclairage de tout l'échantillon) ou en ondes évanescentes (seulement la partie proche de la lamelle est visible)
- La prise en main du logiciel contrôlant la caméra CCD et les différents paramètres (fréquence d'exposition, luminosité, gain, etc). Les puits font 16 micromètres de côté, et les pixels représentent 160nm.

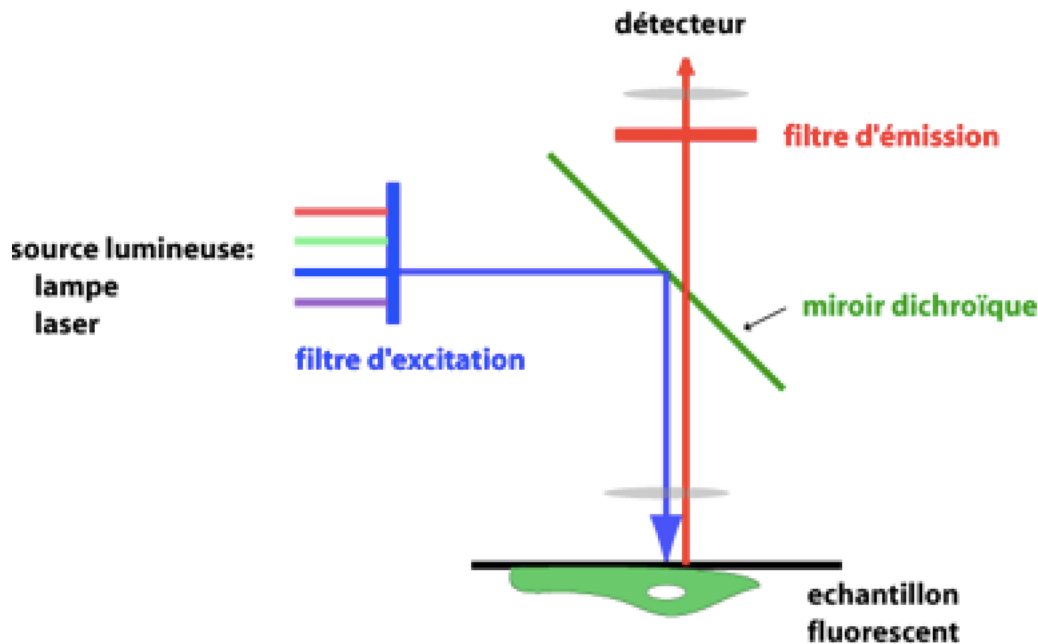


FIGURE 2.3 – schéma de principe microscopie

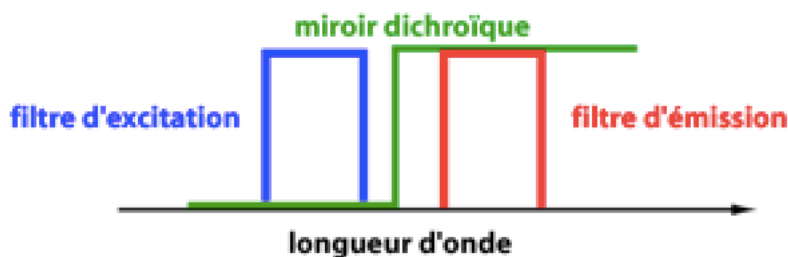


FIGURE 2.4 – schéma de principe microscopie

2.2.2 Dégradation de la fluorescence

Pour pouvoir observer la fluorescence il est nécessaire d'éclairer l'échantillon à sa longueur d'onde d'absorption. Pour ce faire on utilise un laser dont la longueur d'onde est adaptée. A l'aide d'un système de lentilles et de miroirs qu'il est possible de régler, le faisceau est focalisé sur l'échantillon. Pour pouvoir séparer la lumière d'excitation de la lumière émise par fluorescence on utilise des filtres. Ici on a notamment un miroir qui laisse passer les fréquences d'émission et qui réfléchit la fréquence du laser. Puis un deuxième filtre assure la pureté du signal. Dans notre cas les spectres d'émission et d'absorption se chevauchent, la fréquence de séparation de notre miroir doit donc se trouver entre les 2 maxima. Pour améliorer la qualité de l'image il est aussi possible de choisir la longueur d'onde du laser légèrement en dessous de la longueur d'onde d'absorption du fluorophore.

L'échantillon est placé sur une lame de verre dont l'épaisseur est standardisée et il est possible de régler la distance entre l'objectif et l'échantillon. Une goutte d'huile est déposée entre l'objectif et la lame de verre, l'indice optique de l'huile permet d'augmenter l'ouverture numérique.

2.2.3 Pertinence de se placer en ondes évanescentes

Plutôt que d'éclairer la totalité de l'échantillon, il est plus pertinent de se placer en ondes évanescentes. Pour cela il faut incliner le faisceau du laser en modifiant l'orientation des miroirs jusqu'à atteindre l'angle de réflexion totale³. Seule une fine couche de l'échantillon de la surface de la lame de verre est alors claire, ce qui permet de réduire la luminosité.

Enfin il est possible d'observer l'image à l'oeil nu ou à l'aide d'une caméra. Sur la caméra il est possible de régler certains paramètres comme le temps d'exposition pour avoir une image de meilleure qualité. Il est aussi possible de filmer, mais il faut pour cela que le temps qui sépare deux images soit supérieur au temps d'exposition.

Les premières images obtenues sont complètement saturées, pour pouvoir observer des tâches, on passe en ondes évanescentes puis on réduit le temps d'exposition et on diminue fortement (une dilution par 10 000 permet d'obtenir des résultats) la concentration en fluorophore dans l'échantillon.

2.2.4 Choix de la longueur d'onde

Pour pouvoir observer la fluorescence il est nécessaire d'éclairer l'échantillon à sa longueur d'onde d'absorption. Pour ce faire on utilise un laser dont la longueur d'onde est adaptée. A l'aide d'un système de lentilles et de miroirs qu'il est possible de régler, le faisceau est focalisé sur l'échantillon. Pour pouvoir séparer la lumière d'excitation de la lumière émise par fluorescence on utilise des filtres. Ici on a notamment un miroir qui laisse passer les fréquences d'émissions et qui réfléchit la fréquence du laser. Puis un deuxième filtre assure la pureté du signal. Dans notre cas les spectres d'émission et d'absorption se chevauchent, la fréquence de séparation de notre miroir doit donc se trouver entre les 2 maximums. Pour améliorer la qualité de l'image il est aussi possible de choisir la longueur d'onde du laser légèrement en dessous de la longueur d'onde d'absorption du fluorophore.

3. d'où l'intérêt de bien choisir l'indice du milieu de contact

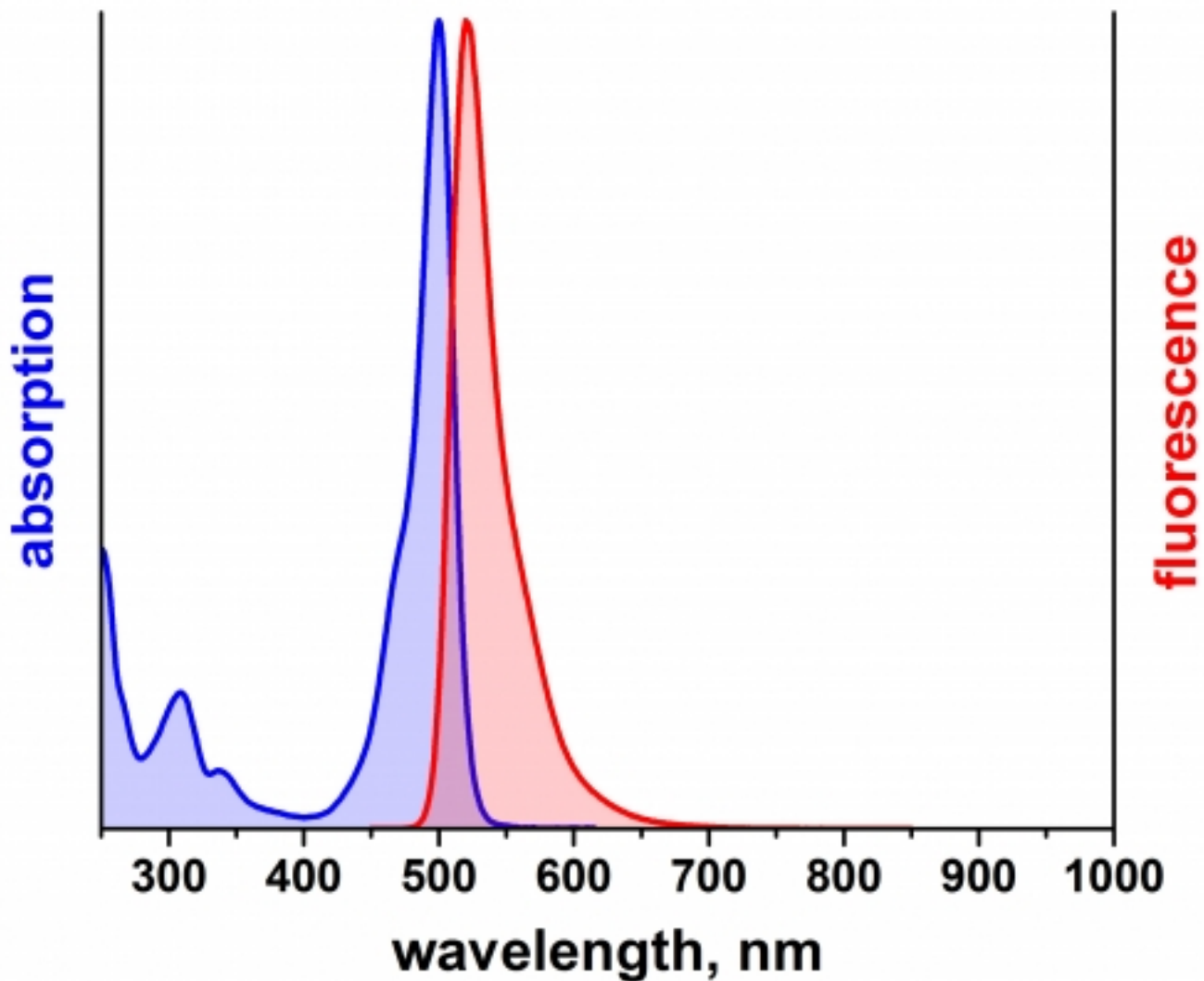


FIGURE 2.5 – Spectre de fluorescence

⁴ La préparation d'un échantillon diffère beaucoup entre la microscopie électronique et la microscopie à fluorescence. C'est dans la différence que réside la gageure que représente ce projet scientifique collectif. En effet, pour arriver à bénéficier des avantages des deux microscopies, on a travaillé pour rendre les deux compatibles sur un même échantillon. Nous allons à présent détailler les spécificités de ces deux microscopies et les et insister sur les points qui ont été au coeur de ce projet.

4. Cf annexe pour voir les courbes qu'on a obtenu expérimentalement au laboratoire et les comparaisons avec la théorie

2.2.5 La microscopie à fluorescence : point trop n'en faut

Comme expliqué précédemment, nous avons pu constater lors des expérimentations au Laboratoire d'Optique et Biosciences que lorsque la concentration du fluorophore est trop élevée, on n'arrive pas à résoudre les signaux individuellement. L'observation en microscopie à fluorescence apporte donc essentiellement la contrainte sous forme d'une densité surfacique maximale de fluorophores sur l'échantillon. Typiquement, pour distinguer des protéines individuelles, cette densité surfacique maximale est de l'ordre de une par micron carré.

2.2.6 La microscopie électronique : des grilles très concentrées en protéines

L'observation en microscopie électronique se fait après avoir déposé l'échantillon sur une grille métallique préalablement recouverte d'un revêtement par vaporisation de carbone. Ce revêtement est déposé de façon à ne pas boucher complètement les trous de la grille. Cela permet de préserver des trous, qui ont une double fonction. Tout d'abord, de par leur taille bien choisie, ils permettent de réduire considérablement l'absorption et la dispersion. De plus, dans les trous, le solvant peut venir se loger, ce qui permet à la protéine de rester dans des conditions non dénaturantes. Ces poches de solvant constituent donc des lieux particulièrement propices à l'observation.

À l'inverse de la microscopie à fluorescence, la microscopie électronique nécessite des grandes densités surfaciques d'objets à observer. Typiquement, cette densité est de l'ordre de la centaine de particules par micron carré. Il faut en effet avoir un grand nombre de projections bidimensionnelle de la protéine pour reconstituer une représentation tridimensionnelle. Et comme le temps d'acquisition est limité à 48 heures sur les instruments auxquels nous avons pu avoir accès, une densité importante était nécessaire pour obtenir assez de signal. En outre, la durée de collecte est limitée par un phénomène d'épaississement progressif de la glace qui piège les particules. Ce phénomène d'épaississement s'accompagne d'une perte de contraste et d'une augmentation du bruit de fond qui sont indésirables pour l'acquisition d'un bon signal.

2.2.7 Pistes pour coupler les deux microscopies

On peut observer que les contraintes de densité surfacique de particules associées aux deux microscopies sont incompatibles. Afin d'assurer le couplage entre microscopie à fluorescence et microscopie électronique, il faut donc adapter le dispositif d'au moins une des deux observations.

Observer au microscope à fluorescence sur une grille de microscopie électronique

La corrélation entre les deux images exclut toute modification de l'échantillon entre les deux observations. L'ordre logique est d'effectuer d'abord l'observation au microscope à fluorescence, puis celle au microscope électronique. En effet, le microscope électronique implique des rayonnements plus énergétiques et donc plus à même de dénaturer l'échantillon. Il faudra donc effectuer l'observation en microscopie à fluorescence sur une grille de microscopie électronique. A priori, cela demande du temps, mais malgré quelques séances consacrées à cette mise en place, on n'a pas réussi à avoir une aussi bonne résolution qu'en observant l'échantillon sur une lame de verre.

Améliorer la microscopie à fluorescence par traitement informatique

La première d'entre elles nous a été suggérée par Cédric Bouzigues, et consiste à pousser la résolution de la microscopie à fluorescence jusqu'à ses limites par un traitement informatique des images

recueillies. L'idée est de gagner dans la précision sur la localisation des fluorophores par des méthodes de traitement de signal : on cherche à localiser les extrema des signaux recueillis, sans que les fluorophores soient facilement distinguables. Bien que nous n'ayons pu mettre en oeuvre la méthode sur nos images que sur des cas idéaux, il semble envisageable qu'elle permette de relever la densité surfacique maximale à l'ordre de la dizaine de particules par micron carré. Cela permettrait donc de gagner un ordre de grandeur sur les deux qu'il y a entre les deux seuils qu'il faut relier pour rendre compatibles les deux microscopies.

Diminuer la densité de la grille

Le deuxième ordre de grandeur est plus compliqué à trouver, dans la mesure où il ne correspond pas à une méthode déjà mise au point comme celle qui précède. Au prix d'une perte de quantité de signal (ou de contraste), on a cherché à abaisser la densité surfacique de particules, pour éventuellement travailler en dessous des 100 particules par micron carré habituelles. Mais cela a posé un problème : l'équilibre entre le gain de résolution associé à la méthode d'imagerie corrélative que nous avons commencé à développer et la perte accompagnant la baisse de la densité.

2.3 Traitement informatique

Comme nous l'avons indiqué dans les parties précédentes, augmenter la précision sur la localisation des fluorophores est un enjeu de taille. En effet, l'image d'un point infiniment petit par un microscope, est une tache (réponse impulsionnelle du système ou PSF). Les images de deux points séparés par une distance inférieure au rayon caractéristique de la PSF ne pourront pas être distinguées comme deux structures individuelles. Ceci vaut pour des structures ponctuelles, mais également pour des structures comme les fluorophores. Nous avons tenté d'étudier et de mettre en place des techniques pour dépasser ces limites de résolution.

Au regard de l'état de l'art actuel dans le domaine, nous avons pu observer que les techniques de super résolution peuvent être comparées selon de multiples critères : cadence d'acquisition, difficulté de mise en oeuvre, etc. Néanmoins on peut les regrouper en deux grandes familles : les techniques point-à-point où les fluorophores sont observés indépendamment puis reconstitués et les techniques d'ensemble.

2.3.1 Les filtrages

Du fait de l'interaction entre les particules et de leur fluorescence, nous avons mis en place des algorithmes pour détecter la position des particules. Nous avons en particulier développé des algorithmes (sous Python) de filtrage spatial⁵. Ainsi pour détecter les positions des fluorophores, on a modifié localement la valeur de chaque pixel en fonction de la valeur de ses voisins immédiats. Pour ce faire on calcule la distance entre chaque pixel et ses voisins puis on compare celle-ci avec un certain seuil. Si le pixel n'est pas très distant de ses voisins on décide qu'il fait partie du bruit relativement uniforme. Sinon il y a une rupture nette et on a une particule. L'inconvénient de cette méthode est de savoir comment faire varier ce seuil et surtout de ne pas bien distinguer les amas de fluorophores. Ainsi en pratique sur les images qu'on a effectivement obtenues en laboratoire on n'a pas des résultats très

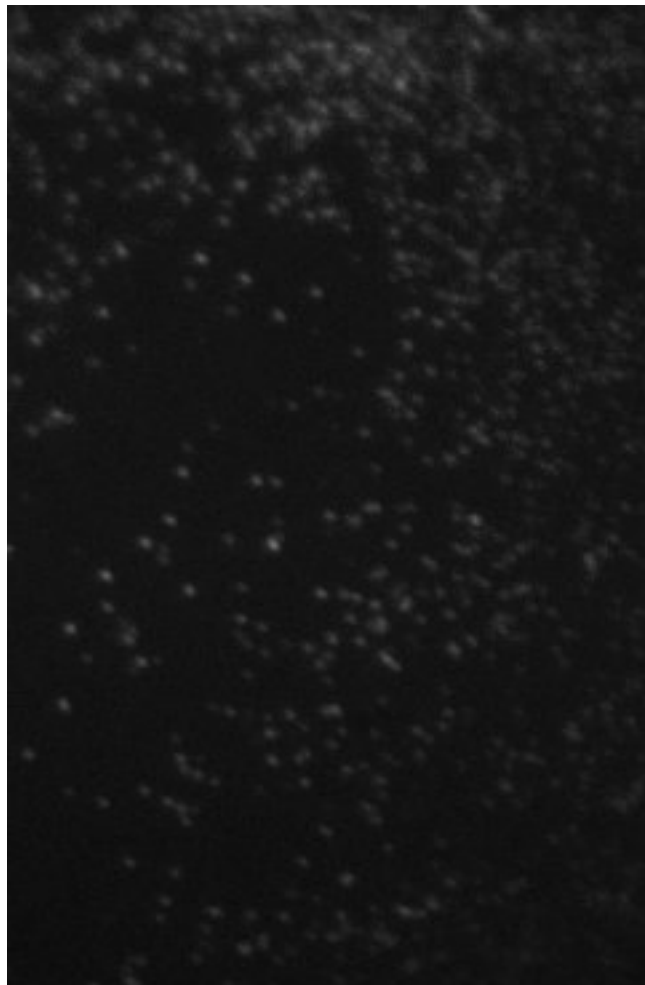
5. qui existe déjà dans l'environnement Matlab cependant

tranchants mais on arrive à mettre en évidence certains détails dans les zones de recouvrement des particules.

2.3.2 La super-résolution

Principe

Face à l'inadéquation des méthodes précédentes, M.Bouzigues nous a orienté vers une autre voie plus riche pour nos données. Il s'agit de l'utilisation des fluctuations d'intensité. Les fluorophores uniques ne sont pas parfaitement stables, ils présentent généralement une intensité fluctuante et une perte de fluorescence après un certain nombre de cycles d'absorption et d'émission de photons. En utilisant ces fluctuations d'intensité, il est possible d'extraire un signal super-résolu à partir de plusieurs images, sans avoir besoin d'images bien distinctes des fluorophores activés. La méthode SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging) permet d'augmenter la résolution d'un facteur important, à partir de la mesure de l'autocorrélation de la fluorescence pour chaque pixel. Cette technique nécessite également plusieurs milliers d'images pour atteindre une bonne reconstruction de l'image super-résolue, avec une résolution en pratique limitée à 50-60 nm. Nous n'avons pas eu le temps de finir l'implémentation sous Python de cette technique (elle existe sous Matlab) mais nous avons bien étudié la littérature autour et on le suggèrera en sujet de PSC pour l'année prochaine pour une approche plus exhaustive.



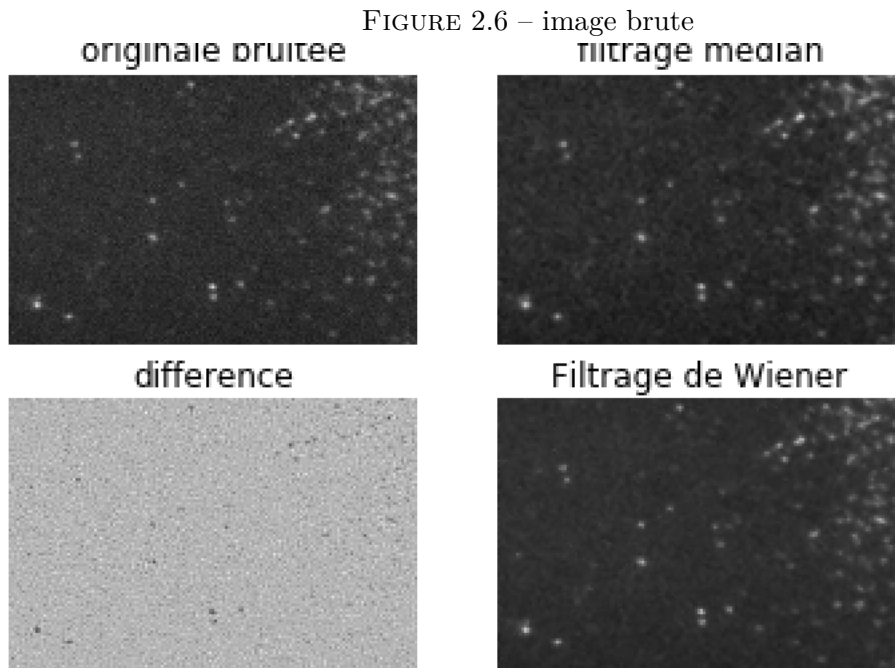


FIGURE 2.7 – Image après les différentes opérations de filtrage

2.3.3 La super-localisation : une autre méthode point-par-point

Les images de la figure précédente montrent l'effet de la fluorescence sur l'image d'un échantillon avec un marquage dense : il est impossible de résoudre individuellement des objets distincts. En revanche, si on arrive à n'observer qu'un seul fluorophore, il est possible de détecter le barycentre de son image. Cette mesure permet d'obtenir une estimation de la position du barycentre du fluorophore avec une précision bien meilleure que 200 nm, dépendant du nombre de photons reçus (20 nm pour 100 photons détectés) [12]. Il s'agit donc ici de super-localisation et pas strictement de super-résolution. L'image super-résolue n'est révélée qu'en combinant les positions de tous les fluorophores présents après qu'ils aient été excités séquentiellement et individuellement. En réalisant cette manipulation pour les différents fluorophores d'un échantillon, on reconstruit donc indirectement la structure de l'objet étudié, avec une résolution bien meilleure qu'en microscopie conventionnelle.

Chapitre 3

Méthodes développées, protocole, voies à améliorer

3.1 Principaux problèmes et obstacles rencontrés

Revenons sur les obstacles que nous avons rencontrés lors de l'avancée de notre projet. Ceux-ci ont jalonné régulièrement notre parcours, nous contraignant à revoir nos ambitions à la baisse mais suscitant des réflexions qui ont alimenté les rebondissements du projet. Certains écueils auraient pu être abordés de façon plus pertinente scientifiquement mais des contraintes liées à l'agenda (alternance entre LOB et BIO) ou au matériel (quantité de fluorophore disponible) nous ont dicté la démarche suivie. L'inventaire qui suit est non linéaire mais suit un ordre logique correspondant à celui de l'expérimentation.

3.1.1 Faible couplage

Avant de tester la microscopie optique avec des fluorophores couplés aux protéines, nous avons souhaité effectuer un test pour nous assurer que le couplage s'était bien effectué. En fait, ce test aurait probablement dû intervenir immédiatement après la purification de la protéine AIF1. Mais nous avons enchaîné à ce moment là sur de nombreuses séances au LOB pour tenter d'observer le fluorophore seul, pour des raisons d'agenda. Ce test, effectué tardivement et dont les résultats sont présentés en 2.1, s'est révélé décevant. Le couplage entre la protéine et le fluorophore est d'après nos expériences très faible voire inexistant. En observant la fiche descriptive du fabricant (Sigma Aldrich), on s'attendait à un faible couplage mais le résultat des expériences est qu'on ne peut pas affirmer que le couplage a bien eu lieu. Ce couplage étant un prérequis pour que notre dispositif soit fonctionnel, la conclusion négative du test a constitué une sérieuse remise en cause de nos objectifs prévisionnels. Cela dit, on a proposé des pistes pour contourner ces écueils.

3.1.2 Adhérence variable aux surfaces

La seconde difficulté (la première si l'on considère l'ordre chronologique) qui s'est présentée est l'adhérence très variable du fluorophore sur les lamelles de microscopie optique. On pourrait se demander : pourquoi tenter de fixer le fluorophore sur une lamelle de verre alors que cela ne sert à rien dans le dispositif final imaginé. En effet, on y attache la protéine à la surface à la protéine et le fluorophore à la protéine, et non le fluorophore directement à la surface.

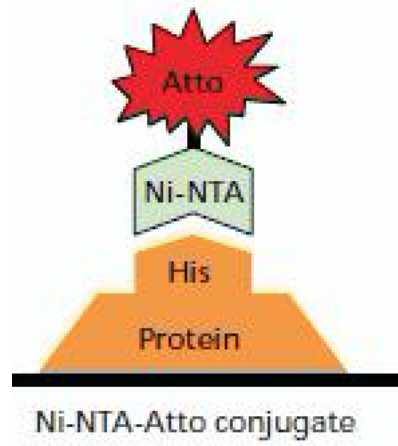


FIGURE 3.1 – schéma de l'adhérence

Encore une fois, cette ambition pas tout à fait rationnelle du point de vue scientifique était dictée par des contraintes temporelles et matérielles : commencer par l'étude du fluorophore seule nous a permis d'obtenir des images de microscopie optique plus rapidement. Nous en avons besoin en particulier pour notre rapport intermédiaire, mais également pour fournir à Mouhamad des images pour démarrer le traitement informatique. D'un essai à l'autre, nous avons pu observer des affinités très variables du fluorophore pour la surface de verre de la lamelle. Nous avons fait varier les concentrations de fluorophore jusqu'à identifier une concentration donnant un résultat acceptable la plupart du temps : 10mM. Nous avons tenté de rendre les manipulations de dépôt sur lamelle reproductibles, en fixant le protocole. Notamment, c'est le constat de non-reproductibilité qui nous a amenés à utiliser le plasma cleaner. Outre que l'outil est spectaculaire, les résultats ont été (légèrement) plus probants après son usage. Lorsque nous sommes passés au dépôt sur grille, nous avons vu revenir ces problèmes que nous croyions avoir partiellement résolus : le dépôt était très irrégulier. Globalement, le fluorophore se déposait seulement autour du trou, donnant des résultats inexploitable. La densité de fluorophore y était localement trop grande pour pouvoir résoudre les protéines individuelles et on n'en observait aucune dans les zones d'intérêt.

3.1.3 Autofluorescence de la grille

Le troisième et dernier problème auquel nous avons été confrontés est l'autofluorescence de la grille. Ce phénomène consiste en un phénomène de fluorescence qui se manifeste chez un matériau non conçu à cet effet. En l'occurrence, c'est la grille de microscopie électronique qui a révélé ce comportement. Et on ne saurait le lui reprocher : une grille de microscopie électronique n'est pas destinée à être observée en microscopie optique. Ce comportement est en somme normal pour un objet qui n'a pas été pensé pour l'optique. En revanche, s'il était prévisible, ce phénomène constitue un obstacle de taille pour réaliser une imagerie corrélative. Le signal d'autofluorescence nuit grandement à la qualité du signal, et rend difficilement envisageable toute super-résolution. Pour une imagerie corrélative, il faudrait alors des grilles de microscopie électronique différentes, ce qui semble difficilement envisageable. De plus, il ne semble pas évident au premier abord de réaliser un matériau qui remplisse le cahier des charges pour composer une grille de microscopie électronique compatible avec l'optique. Il faudrait à ce matériau, en plus de l'absence d'autofluorescence, remplir tout le cahier des charges de la microscopie électronique. En particulier le contrôle de la forme de la grille (trous, etc.) se fait par des dépôts en

phase gazeuse qui fonctionnent très bien avec le carbone mais sont difficilement applicables à d'autres matériaux.

3.2 Protocole proposé dans l'état de l'art

L'idée de cette section est de proposer un protocole opérationnel, basé sur notre travail durant cette année, de sorte que, si le projet était repris, on puisse avancer en reprenant au point où nous avons été contraints de nous arrêter.

On suppose les étapes de fabrication de la protéine avec queue poly-Histidine, ainsi que celles de la purification de la protéine déjà réalisées (cf II.1), celles-ci étant d'une part des manipulations plus classiques en biologie et d'autre part dépendant de la nature de la protéine, si bien qu'il n'existe pas de processus générique pour cela, si ce n'est l'utilisation de la résine TALON-Cobalt en fin de purification, qui est spécifique de l'His-tag.

3.2.1 Couplage

La constante de dissociation entre la queue His-tag et le fluorophore NTA Atto 488 étant relativement élevée (couplage faible), il convient de faire ce couplage dans des conditions d'excès de protéine.

Ainsi, on s'assure d'une part que chaque fluorophore observé est vraisemblablement lié à une protéine, et d'autre part que la concentration effective de fluorophore ne dépasse pas la limite de distinction optique (voir le traitement informatique pour améliorer la localisation des points), tout en gardant des concentrations en protéine raisonnables pour de l'imagerie électronique. Enfin, le coût du fluorophore étant plus élevé que celui de production des protéines, ce dosage paraît raisonnable.

On réalise donc une solution cent fois plus concentrée en protéine qu'en fluorophore, la concentration en protéine étant déterminée par les contraintes de l'imagerie électronique.

3.2.2 Fixation sur la plaque

La plaque de microscopie doit être au préalable nettoyée et chargée grâce à un nettoyeur à plasma. On dépose ensuite l'échantillon sur la plaque. Les expériences menées montrent que le fluorophore se fixe peu sur la plaque, mais que la protéine, elle, y arrive. Des recherches futures pourraient se fixer de quantifier la fixation du complexe protéine/fluorophore sur la grille.

Le milieu de dilution utilisé est le PBS à 10%.

3.2.3 Observation au microscope optique

Comme développé ci dessus, on privilégiera l'utilisation du microscope en ondes évanescentes, avec un éventuel problème de zone de focalisation, auquel il faudra remédier en retournant la grille afin d'avoir les protéines au plus près de la focale.

On utilise un filtre afin de recevoir seulement les photons autour de 488nm dans le récepteur CCD.

3.3 Etapes manquantes pour finaliser l'objectif initial

Les étapes suivantes, qu'il faudra développer afin de parfaire cette technique, consisteront à passer à l'observation au microscope électronique, avec toutes les étapes de vitrification et préparation de l'échantillon qui pourraient déranger l'ordre établi lors de la mesure optique.

La fixation du couplage effectif entre la plaque et le complexe protéine/fluorophore devra être testé

quantitativement (étant donné que le fluorophore ne se fixe pas, des points fluorescents stationnaires prouveraient la réussite de ce couplage).

Il faudra également réfléchir à un système commode de marquage, afin de savoir dans quel sens la grille devra être placée pour que les deux systèmes d'imagerie puisse corroborer efficacement.

Enfin, le développement du traitement informatique pourra être approfondi afin de permettre une automatisation de la localisation des protéines directement sur l'image du microscope électronique à partir des données optiques recueillies précédemment.

Chapitre 4

Conclusion

En conclusion, le projet développé au cours de l'année en vue de coupler l'imagerie optique et électronique nous a permis de développer un certain nombre de techniques, détaillées dans le présent rapport, dont nous allons ici rappeler les grandes lignes.

La méthode choisie a été le couplage entre la protéine étudiée et le fluorophore NTA Atto 488, via la création d'une protéine de fusion (consistant à rajouter une queue poly-Histidine). La création et purification de cette protéine a donc été la première étape de ce travail.

Une deuxième phase expérimentale a consisté à la prise en main et l'utilisation du matériel d'observation du Laboratoire Optique et Biosciences, afin de maîtriser l'utilisation du microscope, du laser, et l'observation d'échantillons du fluorophore. Enfin, un second travail avec le laboratoire de Biochimie a été réalisé dans le but de caractériser le couplage entre le fluorophore et la protéine.

Les conclusions de ce travail expérimental sont les suivantes : La fabrication spécifique d'une protéine de fusion entre aIF1 et la queue poly-Histidine est une réussite, et peut être réalisé sans problème. De même, le matériel du LOB semble bien adapté pour l'observation du fluorophore et, le cas échéant, la protéine couplée au fluorophore, en ayant cependant un signal plus difficile à exploiter en raison de l'auto-fluorescence de la grille de microscopie électronique.

Le problème majeur réside dans le mauvais couplage entre protéine et fluorophore, même si le couplage a tout de même effectivement lieu. L'utilisation en excès de protéine et la mauvaise fixation du fluorophore seul sur la grille sont susceptibles de palier à ce problème pour l'objectif final.

La dernière partie a consisté à la mise en place de techniques de traitement des images obtenues durant nos manipulations au laboratoire et en un balayage de ce qui pourrait être fait pour être complet sur le sujet.

La réalisation de ce projet nous a permis de nous pencher sur un problème concret, mêlant biologie, physique, chimie et informatique. L'aspect à la fois théorique et pratique nous a donné des outils précieux dans ces différentes matières que nous envisageons tous de poursuivre. Le travail régulier avec les chercheurs du LOB et du laboratoire BIOC nous a donné l'opportunité, trop rare à l'École Polytechnique, de permettre la rencontre entre nous, étudiants, et le monde de la recherche, ce qui nous sera bénéfique en terme de projet professionnel et d'orientation. Par ailleurs, le travail en groupe, l'organisation prévisionnelle du travail, pourtant difficile au début du projet, s'est finalement terminée sur une réussite, avec, là encore, de multiples enseignements sur la gestion du travail d'équipe. Le fait de ne pas avoir pu, faute de temps, terminer le projet, est compensé par la satisfaction de l'avoir fait progresser dans ses différents axes, et d'avoir ainsi pu acquérir de nombreuses connaissances tout au long de l'année. Nous espérons sincèrement que le projet pourra trouver un aboutissement afin d'avoir pu participer à l'amélioration de techniques d'observation à la pointe de la recherche française.

Annexe

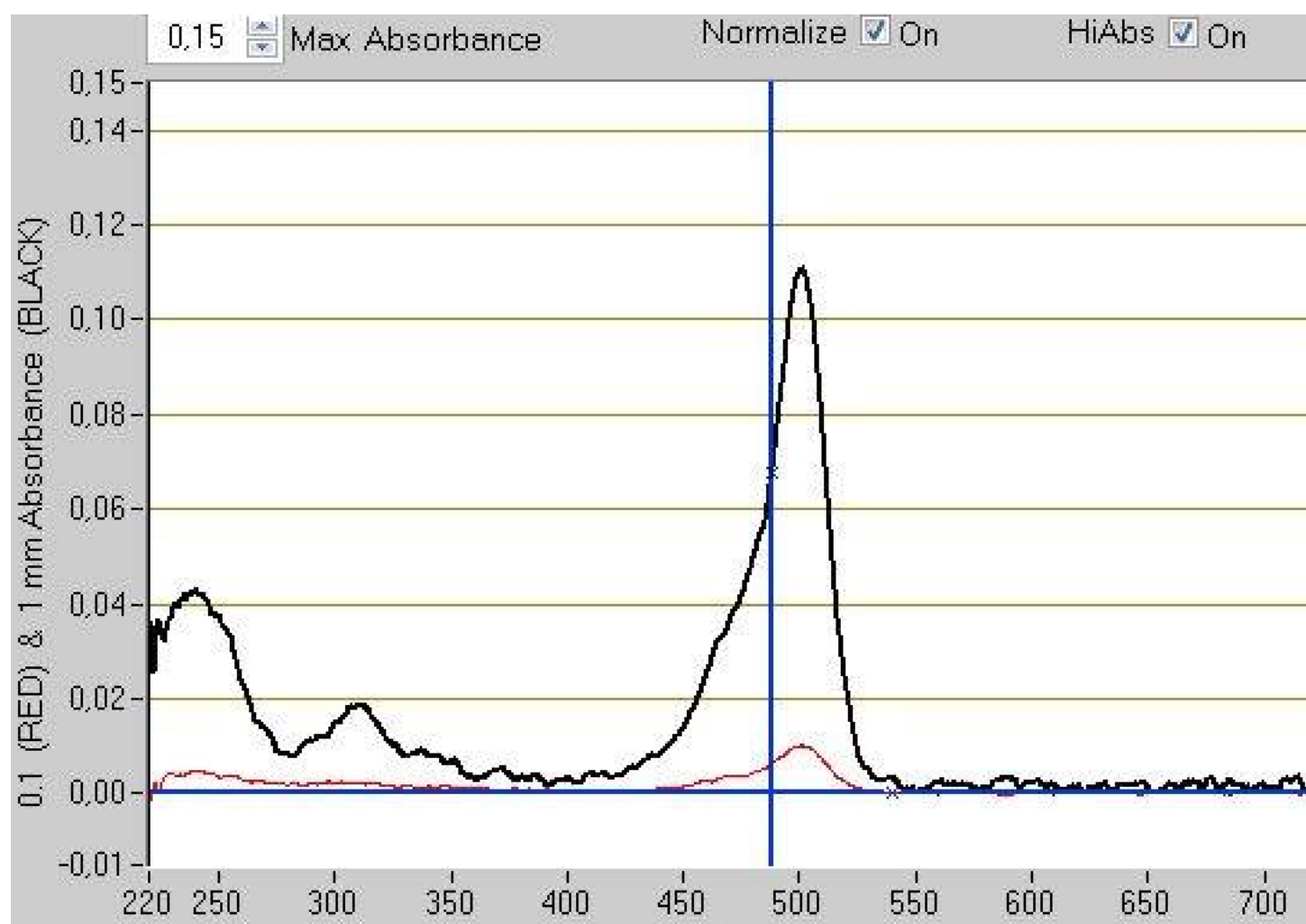


FIGURE 4.1 – Spectre d'absorption obtenu expérimentalement

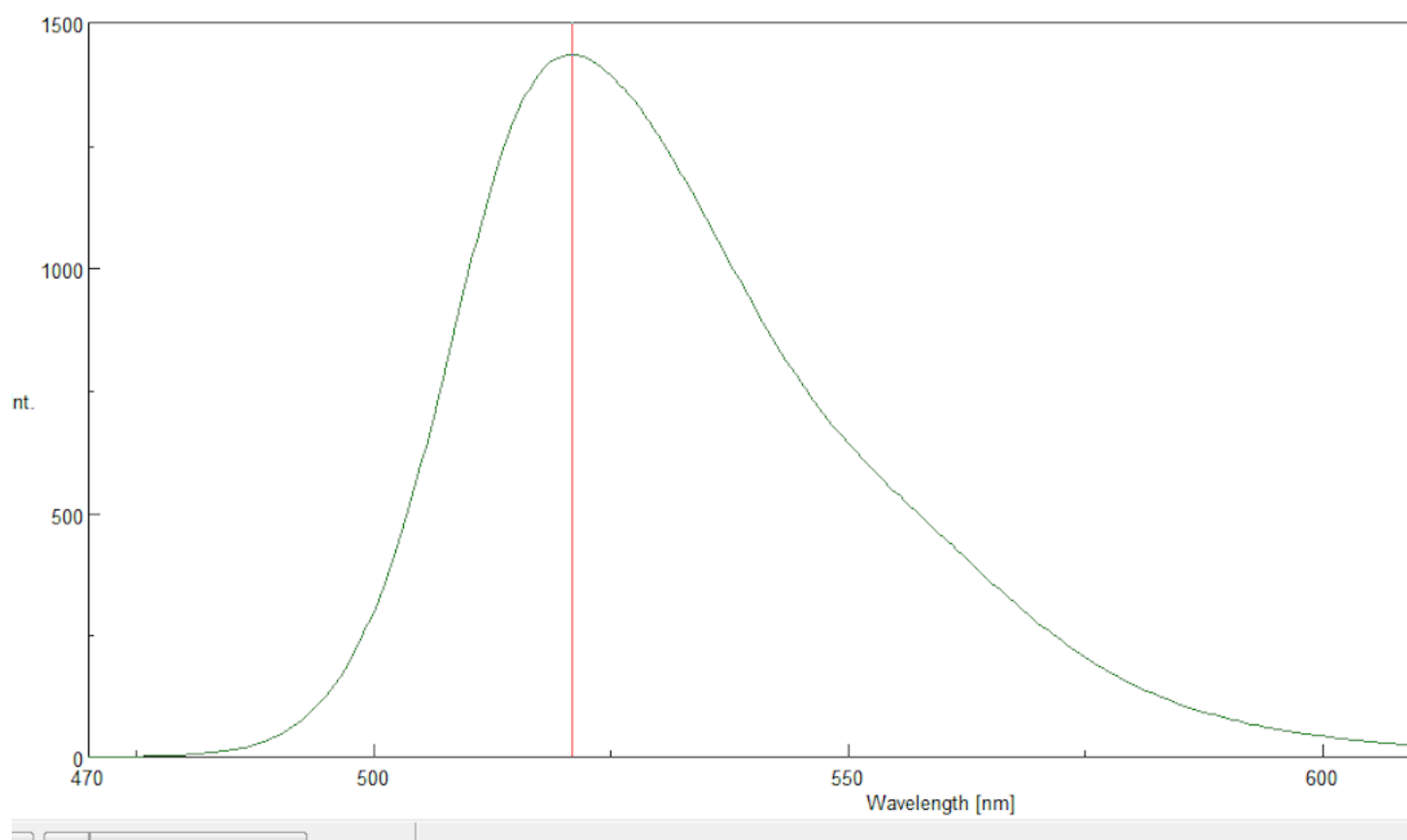


FIGURE 4.2 – Spectre d'émission obtenu expérimentalement

Specification Sheet

Product Name	NTA - Atto 488, BioReagent, suitable for fluorescence, ≥80%
Product Number	39625
Product Brand	SIGMA
Storage Temp	-20°C

TEST

SPECIFICATION

APPEARANCE (COLOR)	Red to Dark Red
APPEARANCE (FORM)	Powder or Crystals
PURITY (HPCE AREA %)	≥ 80.0 %
SOLUBILITY (COLOR)	FOR INFORMATION
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR (VISUAL)
SOLUBILITY (METHOD)	5 mg/ml in water
EMISSION MAXIMUM	523 ± 5 nm
REMARKS ON LUMINESCENCE	EX. 501 NM IN PBS

FIGURE 4.3 – NTA-specifications

Algorithme de filtrage :

```
import scipy as sp
from scipy import misc
from scipy import signal
import numpy as np
from scipy import ndimage
import matplotlib.pyplot as plt
j = misc.imread('Atto488.tif')
Réduction de bruit
j = misc.imread('Atto488.tif')
f , ax = plt . subplots (2 ,2 , sharex=True)
jbruitee = j + 0.9* j.std ()*np.random.random( j . shape)
jmedian = ndimage.medianfilter(jbruitee,3)
jdiff = jmedian-jbruitee
jWiener = sp.signal.wiener(jbruitee)
ax[0,0].imshow(jbruitee, cmap=plt.cm.gray)
ax[0,0].set-title('originale bruitee')
ax[0,0].axis('off')
ax[0,1].imshow(jmedian ,cmap=plt.cm.gray)
ax[0,1].set-title('filtrage median')
ax[0,1].axis('off')
ax[1,0].imshow(jdiff ,cmap=plt.cm.gray)
ax[1 ,0]. set-title('difference')
ax[1,0].axis('off')
ax[1 ,1].imshow(jWiener ,cmap=plt .cm.gray)
ax[1,1].set-title('Filtrage de Wiener')
ax[1,1].axis('off')
plt.show()
```

Algorithme d'extraction des points :

```
from numpy import sqrt
import sys
from PIL import Image,ImageFilter

def Norme(p1,p2,p3,p4) :
n = sqrt((p1[0]-p3[0])*(p1[0]-p3[0]) + (p2[0]-p4[0])*(p2[0]-p4[0]))
return n

ouverture du fichier image
ImageFile = 'images-cryoEM/Atlas-1.jpg'
try :
img = Image.open(ImageFile)
except IOError :
print ('Erreur sur ouverture du fichier '+ ImageFile)
exit(1)
```

récupération de la largeur et hauteur de l'image
colonne, ligne = img.size

création des images intermédiaires
imgF = Image.new(img.mode, img.size)
imgC = Image.new(img.mode, img.size)

transformation de l'image couleur en niveau de gris
for i in range(ligne) :
for j in range(colonne) :
pixel = img.getpixel((j,i)) rÈcupÈration du pixel
calcul du poids de chaque composante du gris dans le pixel (CIE709)
gris = int(0.2125 * pixel[0] + 0.7154 * pixel[1] + 0.0721 * pixel[2])
en gris les 3 composantes RGB sont identiques
p = (gris, gris, gris)
composition de la nouvelle image
imgF.putpixel((j,i), p)

extraction des contours en niveau de gris
seuil = 30
for i in range(1, ligne-1) :
for j in range(1, colonne-1) :
p1 = img.getpixel((j-1,i))
p2 = img.getpixel((j,i-1))
p3 = img.getpixel((j+1,i))
p4 = img.getpixel((j,i+1))
n = Norme(p1,p2,p3,p4
) if n > seuil :
p = (255,255,255)
else :
p = (0,0,0)
imgC.putpixel((j-1,i-1),p)

Convolution :
importation des librairies
import sys
from PIL import Image

définition de la fonction de convolution
avec une matrice masque de convolution de 3x3 def Convolution(Filtre, TPix, x, y) :
p0 = p1 = p2 = 0
for i in range(-1,1) :
for j in range(-1,1) :
p0 += Filtre[i+1][j+1]*TPix[y+i,x+j][0]
p1 += Filtre[i+1][j+1]*TPix[y+i,x+j][1]
p2 += Filtre[i+1][j+1]*TPix[y+i,x+j][2]

normalisation des composantes

```
p0 = int(p0/9.0)
```

```
p1 = int(p1/9.0)
```

```
p2 = int(p2/9.0)
```

retourne le pixel convolué

```
return (p0,p1,p2)
```

```
Filtre = [[-1,-2,-1],[-2,16,-2],[-1,-2,-1]]
```

ouverture du fichier image

```
ImageFile = 'Atto.jpg'
```

try :

```
img = Image.open(ImageFile)
```

except IOError :

```
print 'Erreur sur ouverture du fichier ' + ImageFile
```

```
exit(1)
```

récupération de la largeur et hauteur de l'image

```
colonne,ligne = img.size
```

image filtrée

```
imgF = Image.new(img.mode, img.size)
```

boucle de traitement de l'image par convolution avec Filtre

```
TabPixel = img.load()
```

```
for x in range(1,ligne-1) :
```

```
for y in range(1,colonne-1) :
```

```
p = Convolution(Filtre,TabPixel,x,y)
```

```
imgF.putpixel((y,x),p)
```

affichage de l'image filtrée

```
imgF.show()
```

fermeture du fichier image

```
img.close()
```

Fusion de 2 images :

importation des librairies

```
import sys
```

```
from PIL import Image
```

ouverture du fichier image

```
ImageFile1 = 'Atto1.jpg'
```

try :

```
img1 = Image.open(ImageFile1)
```

except IOError :

```
print 'Erreur sur ouverture du fichier ' + ImageFile1
```

```
exit(1)
```

```
ImageFile2 = 'Atto2.jpg'
```

try :

```
img2 = Image.open(ImageFile2)
except IOError :
print 'Erreur sur ouverture du fichier ' + ImageFile2
exit(1)

récupération de la largeur et hauteur de l'image 1
colonne1,ligne1 = img1.size
récupération de la largeur et hauteur de l'image 2
colonne2,ligne2 = img2.size

calcul des dimensions de l'image fusionnée
colonne = min(colonne1, colonne2)
ligne = min(ligne1,ligne2)

création d'une image de même type
imgF = Image.new(img1.mode,(colonne,ligne))

boucle de traitement des pixels
for i in range(ligne) :
for j in range(colonne) :
p1 = img1.getpixel((j,i))
p2 = img2.getpixel((j,i))
p = (max(p1[0],p2[0]),max(p1[1],p2[1]),max(p1[2],p2[2]) )
imgF.putpixel((j,i), p)

affichage de l'image
imgF.show()

fermeture des fichiers image
img1.close()
img2.close()
```

Chapitre 5

Bibliographie

- [1] R. F. Thompson, M. Walker, C. A. Siebert, S. P. Muench, et N. A. Ranson, An introduction to sample preparation and imaging by cryo-electron microscopy for structural biology, *Methods*, vol. 100, p. 3 ?15, mai 2016.
- [2] J. L. S. Milne et al., Cryo-electron microscopy : A primer for the non-microscopist, *The FEBS journal*, vol. 280, no 1, p. 28, janv. 2013.
- [3] E. Callaway, The revolution will not be crystallized : a new method sweeps through structural biology, *Nature News*, vol. 525, no 7568, p. 172, sept. 2015.
- [4] S. Poupart, Synthèse de complexes de lanthanides pour le marquage fluorescent de protéines : détection de protéines étiquetées poly-histidine, Rouen, 2008.
- [5] Nobuaki Soh ,Selective Chemical Labeling of Proteins with Small Fluorescent Molecules Based on Metal-Chelation MethodologyÊÊ, *Sensors*, fev. 2008
- M. Perkovic et al., Correlative Light- and Electron Microscopy with chemical tags, *Journal of Structural Biology*, vol. 186, no 2, p 205-213, mai 2014
- [7] M. H. Ellisman, T. J. Deerinck, X. Shu, et G. E. Sosinsky, Picking faces out of a crowd : Genetic labels for identification of proteins in correlated light and electron microscopy imaging, *Methods Cell Biol*, vol. 111, p. 139 ?155, 2012.
- [8] A. Sartori, R. Gatz, F. Beck, A. Rigort, W. Baumeister, et J. M. Plitzko, Correlative microscopy : Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography, *Journal of Structural Biology*, vol. 160, no 2, p. 135 ?145, nov. 2007.
- [9] A. Doerr, Single-particle cryo-electron microscopy, *Nature Methods*, vol. 13, no 1, p. 23 ?23, janv. 2016.
- [10] Specific and Stable Fluorescence Labeling of Histidine-Tagged Proteins for Dissecting Multi-Protein Complex Formation - *Journal of the American Chemical Society (ACS Publications)*ÊÊ. [En ligne]. Disponible sur : <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja0563105>. [Consulté le : 11-janv-2017].

- [11] H. T. Kratochvil, D. G. Ha, et M. T. Zanni, Counting tagged molecules one by one : Quantitative photoactivation and bleaching of photoactivatable fluorophores, *The Journal of Chemical Physics*, vol. 143, no 10, p. 104201, sept. 2015.
- [12] D. Karadagli and T. Wilson. Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy. *Micron* (Oxford, England : 1993), 39(7), 2008.

Table des figures

2.1	Tampon A et bactéries	10
2.2	Insertion de bactéries dans le tampon A	10
2.3	schéma de principe microscopie	13
2.4	schéma de principe microscopie	13
2.5	Spectre de fluorescence	15
2.6	image brute	18
2.7	Image après les différentes opérations de filtrage	19
3.1	schéma de l'adhérence	21
4.1	Spectre d'absorption obtenu expérimentalement	25
4.2	Spectre d'émission obtenu expérimentalement	26
4.3	NTA-specifications	27