

Laboratoire Kastler Brossel : Proposition de thèse pour l'année 2008

Ecole Doctorale : de Physique de la Région Parisienne N° : ED 107

Responsable de la thèse :

Nom : GROSS Prénom : Michel
Tél : 01 44 32 34 18 Fax : 01 44 32 34 34
Courriel : Michel.Gross@lkb.ens.fr

Nom du Laboratoire : Laboratoire Kastler Brossel

Équipes : « Optique des nano-objets » et « Optique et Biologie »

Code d'identification : UMR 8552 Organismes : ENS, UPMC, CNRS
Site Internet : <http://www.lkb.ens.fr/>
Adresse : Département de Physique de l'Ecole normale supérieure,
24 rue Lhomond, 75005 Paris

Titre de la thèse : Microscopie holographique : suivi 3D de nanoparticules, applications à la Biologie

Cette thèse repose sur une collaboration entre deux équipes du LKB : l'équipe « Optique des nano-objets » (Michel Gross) pour la partie microscopie holographique, et l'équipe « Optique et Biologie » (Pierre Desbiolles et Sébastien Courty) pour les applications visées. L'enjeu de cette thèse est de mettre au point un système de localisation capable de suivre en 3D des molécules individuelles. Cette thématique, destinée à l'étude *in vitro* et *in vivo* de processus biologiques, se développe dans de nombreuses équipes travaillant à l'interface Physique-Biologie, en France et à l'étranger, et représente un des enjeux majeurs de la microscopie contemporaine.

La plupart des techniques de microscopie optique permettent d'imager les détails contenus dans le plan focal d'un objectif, les éléments situés en dehors de ce plan restant inaccessibles. Le suivi par microscopie d'un objet se déplaçant dans un espace 3D nécessite donc d'ajuster en permanence la position du plan focal et celle de l'objet, opération quasi impossible lorsque le mouvement est rapide et aléatoire (mouvement Brownien d'un objet plongé dans milieu peu visqueux par exemple). La microscopie holographique supprime cette difficulté car elle permet de visualiser simultanément tous les plans d'un échantillon.

Le principe de la technique consiste à enregistrer sur une caméra CCD les interférences entre la lumière diffusée par l'échantillon (onde signal) et la lumière laser à l'origine de cette diffusion (onde de référence). A partir de ces interférences, il est possible de reconstruire, en utilisant un logiciel que nous avons mis au point et qui repose sur des calculs d'optique de Fourier, les images dans les différents plans de l'échantillon (1,2). La détection holographique est extrêmement sensible, car le signal utile est proportionnel à l'amplitude du champ optique diffusé, et non à son carré, comme ce serait le cas si l'intensité de la lumière diffusée était directement mesurée. Ainsi, nous sommes récemment parvenus à reconstruire des images holographiques à partir d'enregistrements ne contenant qu'un photo-électron (électron généré par un photon frappant le photodétecteur) par pixel et par image, limite théorique ultime de détection (shot noise) (3). Grâce à cette sensibilité extrême, la microscopie holographique permet de détecter dans un échantillon des objets de taille nanométrique, donc diffusant très peu de lumière. De plus, l'hologramme contenant toute l'information optique associée à chacun des objets, la position de ces objets dans l'échantillon peut être déterminée avec une bonne précision. La détection holographique constitue donc une détection idéale capable d'acquérir, avec une sensibilité optimale, toute l'information contenue dans la lumière diffusée par des nano-objets.

Les applications de cette technique, encore peu utilisée, sont multiples. Nous avons, par exemple, utilisé la microscopie holographique pour étudier *in vivo* la circulation sanguine des micro vaisseaux dans le crâne de la souris (4,5). Puisque les globules rouges circulant dans ces vaisseaux sont en mouvement, la fréquence de lumière qu'ils diffusent est décalée par effet Doppler. Nous sommes parvenus à séparer et à analyser les différentes composantes Doppler de cette lumière afin de déterminer la vitesse des globules rouges dans les vaisseaux (6,7). Nous avons réalisé ainsi, pour la première fois, une imagerie Laser Doppler plein champ, et ce à une cadence d'acquisition rapide (1 kHz) (8).

Notre projet de thèse vise d'autres applications. Il s'agit d'utiliser notre technique de microscopie holographique pour imager et suivre en 3D des nanoparticules individuelles en vue d'applications biologiques. Nous sommes récemment parvenus à suivre le mouvement Brownien de nanoparticules d'or en mouvement dans l'eau (9). Dans le cadre de la thèse, nous comptons poursuivre ces expériences afin de caractériser la sensibilité du dispositif en étudiant la diffusion brownienne de billes d'or de diamètre variable (10-200 nm) dans un milieu dont la viscosité pourra être modifiée. Ce milieu pourra être soit parfaitement transparent, soit légèrement diffusant.

Cette première étape de caractérisation achevée, notre but est d'utiliser la microscopie holographique pour approfondir nos connaissances de systèmes biologiques déjà étudiés au LKB dans l'équipe "Optique et Biologie". En couplant des nanobilles d'or aux biomolécules à étudier, il s'agira, par exemple, de suivre in vitro le mouvement d'enzymes individuelles lors de leur interaction avec de l'ADN. Nous étudions depuis plusieurs années les interactions entre une enzyme de restriction, EcoRV, et des molécules d'ADN étirées, dont les extrémités sont attachées à une surface (10). A partir d'expériences réalisées en microscopie de fluorescence, nous avons récemment montré que l'enzyme peut lentement "glisser" le long de l'ADN. Nous avons également observé des mouvements beaucoup plus rapides de l'enzyme, que nous avons interprétés comme des sauts le long de l'ADN étiré (11). La microscopie holographique devrait permettre de visualiser le mouvement 3D de l'enzyme au cours de ces mouvements rapides, et donc de mettre directement en évidence l'existence de tels sauts. Ces sauts sont prévus par de nombreuses études théoriques depuis plusieurs dizaines d'années, mais n'ont jamais été observés directement.

Plus largement, notre but est d'utiliser la microscopie holographique pour approfondir nos connaissances sur les mécanismes et les stratégies de recherche de cible dans des systèmes biologiques. L'objectif est d'estimer expérimentalement le temps qu'il faut à un chercheur (une nanoparticule par exemple) animé d'un mouvement Brownien pour atteindre pour la première fois une cible à un endroit donné. La détermination de ce temps, appelé " temps moyen de premier passage ", est un problème réputé difficile. Pourtant, une estimation précise du temps moyen de premier passage ouvre de nombreuses perspectives d'applications, que ce soit en mathématique, en physique, en finance ou bien en biologie. Jusqu'à présent, les travaux en physique statistique n'avaient permis de calculer le temps de premier passage que dans le cas de situations simplifiées où la position de la cible n'est a priori pas connue. Récemment, des théoriciens du Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée (CNRS-UPMC_Paris 6) ont revisité cette question et ont apporté une solution générale et simple où l'expression du temps moyen de premier passage dépend uniquement du volume du milieu de confinement, de la distance entre le point de départ du chercheur et la position de la cible, et de la vitesse de déplacement du chercheur (pour une nanoparticule, son coefficient de diffusion) (12). Nous proposons ici d'utiliser une micro goutte comme milieu de confinement et de suivre en 3D, au moyen de la technique holographique, la trajectoire d'une nanoparticule jusqu'à une cible formée par un faisceau laser fortement focalisé dans la goutte. Cependant, à l'échelle micrométrique, l'hydrodynamique au voisinage des bords de la goutte peut fortement influencer sur la diffusion de la nanoparticule (déviation par rapport à la loi de Stokes-Einstein). Avec la technique de microscopie holographique, nous pensons extraire en chaque région de l'espace, c'est à dire en fonction de la distance au bord de la goutte, le coefficient de diffusion de la nanoparticule et remonter ainsi à une carte 3D de diffusion. Cette carte permettrait ainsi d'estimer précisément le temps de premier passage dans un milieu confiné micrométrique, échelle typique des systèmes biologiques.

Compétences requises :

Cette thèse s'adresse à un(e) étudiant(e) prêt(e) à s'investir dans un projet combinant optique expérimentale, traitement de données, et application à des expériences de suivi de molécules individuelles. Une formation en optique est souhaitable. Une formation à l'interface Physique/Biologie serait bienvenue, mais ne constitue pas un pré-requis indispensable.

1. Le Clerc, F., Collot, L. and Gross, M. (2000) Numerical heterodyne holography with two-dimensional photodetector arrays. *Optics letters*, **25**, 716-718.
2. Atlan, M., Gross, M. and Absil, E. (2007) Accurate phase-shifting digital interferometry. *Optics letters*, **32**, 1456-1458.
3. Gross, M. and Atlan, M. (2007) Digital holography with ultimate sensitivity. *Optics letters*, **32**, 909-911.
4. Atlan, M., Gross, M., Forget, B.C., Vitalis, T., Rancillac, A. and Dunn, A.K. (2006) Frequency-domain wide-field laser Doppler in vivo imaging. *Optics letters*, **31**, 2762-2764.
5. Atlan, M., Forget, B.C., Boccara, A.C., Vitalis, T., Rancillac, A., Dunn, A.K. and Gross, M. (2007) Cortical blood flow assessment with frequency-domain laser Doppler microscopy. *Journal of biomedical optics*, **12**, 024019.
6. Gross, M., Goy, P., Forget, B.C., Atlan, M., Ramaz, F., Boccara, A.C. and Dunn, A.K. (2005) Heterodyne detection of multiply scattered monochromatic light with a multipixel detector. *Optics letters*, **30**, 1357-1359.
7. Atlan, M. and Gross, M. (2007) Spatiotemporal heterodyne detection. *Journal of the Optical Society of America*, **24**, 2701-2709.
8. Atlan, M. and Gross, M. (2006) Laser doppler imaging, revisited. *Review of Scientific Instruments*, **77**, -.
9. Atlan, M., Gross, M., Desbiolles, P., Absil, E., Tessier, G. and Coppey-Moisan, M. (2008) Heterodyne holographic microscopy of gold particles. *Optics letters*, **33**, 500-502.
10. Crut, A., Lasne, D., Allemand, J.F., Dahan, M. and Desbiolles, P. (2003) Transverse fluctuations of single DNA molecules attached at both extremities to a surface. *Phys Rev E*, **67**, 051910.
11. Bonnet, I., Biebricher, A., Porté, P.-L., Loverdo, C., Bénichou, O., Voituriez, R., Wende, W., Pingoud, A. and Desbiolles, P. (2008) Sliding and jumping of single EcoRV restriction enzymes on non-cognate DNA. *soumis*.
12. Condamin, S., Benichou, O., Tejedor, V., Voituriez, R. and Klafter, J. (2007) First-passage times in complex scale-invariant media. *Nature*, **450**, 77-80.