

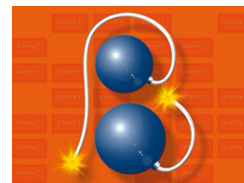
Détection de molécules immobiles in vivo par fluorescence

Vladislav Tempez

10 juillet 2015

Rapport de stage de L3 effectué au sein l'équipe INRIA Beagle à Lyon.

Stage effectué par Vladislav Tempez dans le cadre de son année de L3 parcours Recherche et Innovation du département Informatique de l'École normale supérieure de Rennes.



Résumé

Les progrès des techniques de microscopie permettent dans certains cas de suivre de très petits groupes de molécules in vivo. De plus les détecteurs de photons sont maintenant suffisamment précis pour capter les photons individuellement et ceci permet d'envisager de nouvelles techniques de détection se basant sur cette précision nouvelle. Dans cet article nous explorerons une méthode de détection de molécules in vivo basée sur ces nouveaux détecteurs de photons.

Introduction

Les techniques de microscopie par fluorescence comme la FCS[4] et le PCH[1] ont affiné les capacités d'observation de la matière jusqu'au niveau du suivi de quelques molécules.

L'équipe de Laurent Héliot du laboratoire Phlam de Lille a utilisé de telles techniques pour étudier les dynamiques de transcription à l'intérieur du noyau[2].

Pour cela des marqueurs fluorescents ont été fixés sur les molécules à étudier, et ces molécules ont été excitées par un LASER. Suite à cette excitation ces molécules ont émit des photons qui ont été captés par un microscope à fluorescence. Dans ces enregistrements ont été détectées des émissions successives de trois photons (des triplets) dans un intervalle de temps très court ($1\mu s$).

L'équipe a conjecturé que ces triplets d'émission étaient dus principalement à des molécules "immobiles" dans le faisceau du LASER et estiment que l'observation de ces triplets serait un moyen de déterminer quantitativement la présence de ces molécules "immobiles".

Le but de notre travail est de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Pour cela deux approches seront utilisées.

La première sera la formalisation du problème en terme de probabilités d'émission pour tenter de déterminer s'il est significativement plus probable de détecter ces triplets pour des molécules "immobiles" que pour des molécules "mobiles". L'estimation du nombre de molécules "immobiles" à partir du nombre de triplet sera aussi abordée.

La seconde sera la simulation informatique de l'expérience pour déterminer si les triplets observés sont bien dus aux molécules "immobiles" et si le nombre de triplets observés permet de compter efficacement les molécules immobiles.

Nous aborderons donc les points suivants :

Table des matières

1 Observations in vivo par Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence	3
2 Détection par la présence de triplets de photons	4
3 Modèles Probabiliste	4
3.1 Modèle d'émission des photons	4
3.2 Photoblanchiment	5
3.3 Triplets hétérogènes	6
3.4 Intensité du LASER non uniforme	6
3.5 Molécules mobiles	7
4 Simulations	8

4.1	Type de Modèle	8
4.2	Détails du programme	8
4.3	Mouvement Brownien	9
4.4	Environnement	10
4.5	Simulations	10
4.6	Résultats	12
5	Conclusion	14
6	Remerciements	14

1 Observations in vivo par Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence

La FCS (Fluorescent Correlation Spectroscopy ou Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence) est une des rares techniques actuelles qui permet de quantifier le mouvement de protéines dans les cellules vivantes avec une résolution temporelle entre la seconde et la microseconde.

Elle utilise l'étude statistique des fluctuations dues à l'agitation thermique dans le milieu étudié. Plus précisément, des mesures régulières de l'intensité de fluorescence sont effectuées dans le milieu. Pour cela on fixe par génie génétique des marqueurs fluorescents sur les molécules à suivre, la cellule est ensuite illuminée par un LASER dont la longueur d'onde est fixée de manière à exciter les marqueurs fluorescents (ici il s'agit de marqueurs GFP, Green Fluorescent Protein ou protéine fluorescente verte). Les photons émis par les marqueurs fluorescents sont ensuite captés et on obtient ainsi le nombre de photons reçu dans un intervalle de temps δ . Ce signal est appelé intensité de fluorescence.

On calcule ensuite la corrélation de ce signal avec lui même, l'autocorrélation. La fonction d'autocorrélation G de l'intensité de fluorescence, permet de mesurer indirectement des constantes d'évolution.

On a :

$$G(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle_t$$

On peut exprimer mathématiquement $G(\tau)$ comme une fonction des coefficients de diffusion des différentes espèces, des coefficients de réaction et des paramètres des instruments[3]. Par exemple dans le cas simple de la diffusion d'une seule espèce en deux dimensions, la variation de l'autocorrélation sera liée au mouvement Brownien, on pourra donc faire apparaître le coefficient de diffusion dans son expression :

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N(t) \rangle_t \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)}$$

avec $\tau_D = \frac{w_x w_y}{4D}$ où D est le coefficient de diffusion, w_x et w_y des coefficients d'atténuation de l'intensité du LASER, connu lors de l'expérience, et $\langle N(T) \rangle_t$ la moyenne du nombre de molécules dans le volume d'observation au cours du temps.

La calcul de $G(\tau)$ permet donc de mesurer des coefficients de diffusion dans les cellules vivantes et de quantifier certaines réaction chimiques simples (du type $A \rightleftharpoons B$). Cette technique possède cependant des limitations, en particulier lors de la présence de différentes espèces dont les coefficients de diffusion sont trop proches (lorsque que l'un n'est pas au moins le triple de l'autre) ou quand une espèce est minoritaire (l'une est moins de 10 fois moins présente que l'autre) il devient impossible d'obtenir des valeurs fiables des coefficients de diffusion.

Le PCH (Photon Counting Histogram ou Histogramme de Décompte des Photons) utilise l'étude statistique de la répartition des pics d'intensité lumineuse dans le milieu étudié.

Plus précisément, on détermine expérimentalement la probabilité d'émettre i photons $P(i)$ dans un intervalle de mesure Δt en comptant le nombre de pas de temps dans lesquels i photons sont émis et en normalisant par le nombre total de pas de temps au cours de l'expérience.

Or $P(i)$ s'exprime théoriquement en fonction du nombre moyen de molécules dans le milieu observé, de la brillance de ces molécules et des paramètres des instruments[1].

On peut ainsi déterminer ces paramètres, et en particulier, cette technique permet de résoudre le cas où deux coefficients de diffusion sont trop proches pour être déterminés par FCS. Cependant le PCH ne permet pas de résoudre le cas pour lequel une espèce est minoritaire.

Un objectif de l'équipe de L.Héliot(Phlam Lille) est justement de résoudre la situation de l'espèce minoritaire dans le cas où l'une des deux espèces est immobile.

2 Détection par la présence de triplets de photons

Au cours de leur travaux sur les rôles distincts des différents facteurs de transcription et les liens entre ces rôles et la mobilité de ces facteurs de transcription[2], les auteurs ont pu utiliser de nouveaux capteurs de photons suffisamment sensibles pour détecter l'arrivée de ceux-ci sur le détecteur individuellement. Les données disponibles ne sont donc plus des moyennes du nombre de photons pendant un intervalle de temps mais les valeurs exactes de ce nombre.

Dans le noyau, la protéine PTEFb présente deux formes, l'une libre et diffusant en trois dimensions et l'autre immobile fixée sur un chromosome. Les séries temporelles obtenues via ces mesures ont montré des séries de trois photons dans des intervalles de temps très courts. Le premier et le second photon étaient espacés d'entre 200ns et 400ns et le troisième suivait le second 400ns à 600ns plus tard. Ces triplets étaient donc observés dans un intervalle d'au plus 1 μ s.

L'hypothèse formulée par l'équipe et que nous allons examiner est la suivante :

Sous le faisceau excitant du LASER, se trouvent deux types de molécules : des molécules dont la mobilité n'est pas entravée et qui sont soumises au mouvement Brownien, et des molécules fixées à de plus grosses structures (des chromosomes) qui se déplacent bien plus lentement et sont considérées comme immobiles à l'échelle de l'expérience.

Les triplets mesurés sont des événements rares (2 à 3 toutes les 10 minutes) et l'hypothèse est que ces triplets seraient caractéristiques de la présence de molécules immobiles sous le LASER.

Les molécules immobiles auraient donc plus l'opportunité d'émettre les triplets de photons observés lors des expériences.

Dans les modèles nous incluons l'influence du phénomène de photo blanchiment (ou photobleaching)[5] : après l'émission d'un trop grand nombre de photons (dans le cas étudié, de l'ordre de 15000) les marqueurs fluorescents sont irréversiblement dégradés et donc incapables d'émettre des photons à partir de cet instant.

3 Modèles Probabiliste

3.1 Modèle d'émission des photons

L'émission d'un photon par une molécule est modélisée par un processus de Poisson de paramètre $\mu = \epsilon I(x, y, z)$ avec I l'intensité du LASER en (x, y, z) , la position de la molécule et ϵ un facteur de brillance dépendant de la nature de la molécule. La brillance d'une molécule est une grandeur dépendant des conditions de l'expérience de valeur $\langle \mu \rangle$.

Comme cette émission est un processus de Poisson de paramètre μ le nombre moyen de photons émis en 1s est μ .

Le nombre de photons émis au cours d'un intervalle τ par un processus de Poisson se répartit selon une loi de Poisson de paramètre $\mu\tau$. C'est à dire que :

$$P(\text{nb photons} = k) = P(k, \tau) = \frac{(\mu\tau)^k}{k!} e^{-\mu\tau}$$

Ainsi, la probabilité d'obtenir un triplet provenant d'une unique molécule de brillance μ pendant un intervalle de temps τ pour une molécule qui émet selon un processus de Poisson est

$$P_3 = \frac{(\mu\tau)^3}{3!} e^{-\mu\tau}$$

La probabilité d'obtenir un triplet provenant de deux molécules de même brillance μ est

$$P_{2,1} = P(2, \tau)P(1, \tau) = \frac{(\mu\tau)^3}{2} e^{-2\mu\tau}$$

car les deux processus de Poisson qui modélisent l'émission de photons pour les deux molécules sont indépendants l'un de l'autre. Cette indépendance donne aussi que la probabilité d'obtenir un triplet provenant de trois molécules de même brillance μ est

$$P_{1,1,1} = P(1, \tau)^3 = (\mu\tau)^3 e^{-3\mu\tau}$$

On appelle triplet homogène un triplet provenant d'une unique molécule et triplet hétérogène un triplet provenant de deux ou trois molécules.

Pour les valeurs de paramètres suivantes,

- $I(x, y, z) = 1$ en première approche
- $\varepsilon = 2700s^{-1}$ déterminé expérimentalement
- $\tau = 1.0 \times 10^{-6}s$ pour distinguer les triplets
- $T_{max} = 610.s$ déterminé par la durée des expérience de l'équipe de L.Héliot

on obtient

- $P_3 = 4.0 \times 10^{-7}$
- $P_{2,1} = 1.2 \times 10^{-6}$
- $P_{1,1,1} = 2.3 \times 10^{-6}$

Pour une mesure d'une durée totale de 600 secondes on a $n_\tau = 6.0 \times 10^8$ intervalles, l'espérance du nombre de triplets homogènes pour N molécules est donc

$$E_H = P_3 n_\tau = 240.N$$

car les processus de Poisson sont des processus sans mémoire : la probabilité d'émettre un photon durant un intervalle τ ne dépend que de la longueur de cet intervalle et est indépendante de l'émission de photons aux instants précédents.

3.2 Photoblanchiment

Le phénomène de photo blanchiment perturbe un peu cette indépendance en réduisant à 0 la probabilité d'émettre un nombre de photons plus important que le nombre maximal possible pour la nature de la molécule fluorescente.

En considérant les phénomènes de photo blanchiment pour les marqueurs fluorescents utilisés par les chercheurs (GFP) on réduit la durée d'activité fluorescente moyenne d'une molécule à six secondes.

On a alors $n_\tau = 6.0 \times 10^6$ et $E_H = 2.4N$

3.3 Triplets hétérogènes

Pour la suite on notera n_τ le nombre total de pas de temps dans l'expérience et $n_{\tau\text{bleach}}$ le nombre moyen de pas de temps avant le photo blanchiment.

On a $n_\tau = 6.0 \times 10^8$ et $n_{\tau\text{bleach}} = 6.0 \times 10^6$

On suppose que le milieu sous le faisceau LASER contient F molécules immobiles (fixes) en $(0,0,0)$.

L'espérance du nombre de triplets hétérogènes est alors

$$\begin{aligned} E_h &= E_{h,2,1} + E_{h,1,1,1} \\ &= P_{2,1} n_{\tau\text{bleach}} \binom{F}{1}^2 + P_{1,1,1} n_{\tau\text{bleach}} \binom{F}{3} \end{aligned}$$

Pour les valeurs de paramètres utilisées précédemment, et $F = 10$ on obtient

$E_{h,2,1} = 720$. et $E_{h,1,1,1} = 1700$.

On note que le nombre prévu de triplets hétérogènes est très supérieur à ce qui est observé expérimentalement.

De plus, le nombre de triplets hétérogènes est grand devant le nombre de triplets homogènes (et croit comme le cube du nombre de molécules en conséquence du terme $\binom{F}{3}$).

3.4 Intensité du LASER non uniforme

Dans la littérature, l'intensité du LASER est modélisée de la manière suivante (pour tenir compte des pertes lors de la traversée du milieu) :

$$I(x, y, z) = I_0 e^{-2\left(\frac{x}{w_x}\right)^2 - 2\left(\frac{y}{w_y}\right)^2 - 2\left(\frac{z}{w_z}\right)^2}$$

Cette modélisation sera celle utilisée dans notre modèle.

On appelle volume focal le volume autour du faisceau du LASER en dehors duquel le nombre de photons émis est négligeable. Pour un volume focal modélisé par un parallélépipède centré en 0 et de côté $k.w_x, k.w_y$ et de hauteur $l.w_z$ on a $2 \left(\left(\frac{x}{w_x}\right)^2 + \left(\frac{y}{w_y}\right)^2 + \left(\frac{z}{w_z}\right)^2 \right) > 2(2k^2 + l^2)$ et ainsi $\mu_{out} < \mu_0 e^{-2(2k^2 + l^2)}$

On obtient pour $k = l = 1$

- $P_3 < 3.7 \times 10^{-14}$
- $P_{2,1} < 3.7 \times 10^{-14}$
- $P_{1,1,1} < 3.7 \times 10^{-14}$

et pour $k = l = 2$

- $P_3 < 2.2 \times 10^{-38}$
- $P_{2,1} < 6.6 \times 10^{-38}$
- $P_{1,1,1} < 1.3 \times 10^{-37}$

On voit donc que les probabilités d'émission décroissent très rapidement quand on s'éloigne du centre du faisceau.

On peut alors considérer un volume focal de côté w_x, w_y et de hauteur w_z . En dehors de ce volume les molécules ne produisent quasiment aucun triplet puisque la probabilité d'émission décroît comme l'exponentielle de la taille des côtés du parallélépipède et l'augmentation du nombre de triplets hétérogène liée au nombre de molécules augmente comme la puissance 9 de la taille des côtés (et pour les triplets homogènes l'augmentation suit la puissance 3 de la taille des côtés).

On a, pour des molécules immobiles réparties uniformément dans le parallélépipède et plus précisément pour un milieu de concentration homogène tel que le parallélépipède de dimensions $(r.w_x, r.w_y, r.w_z)$ contienne cr^3 molécules.

La variation infinitésimale de la quantité de molécules à l'intérieur du parallélépipède, que nous appellerons densité surfacique de molécules σ est donc $\sigma = 2cr^2$.

Cette densité surfacique permet de calculer l'espérance du nombre de triplets en tenant compte de la variation de l'intensité avec r et de la variation du nombre de molécules. On va remplacer dans l'expression précédente de l'espérance le nombre de molécules par cette densité surfacique puis intégrer ceci entre 0 et r_{max} pour obtenir l'espérance du nombre de triplet à l'intérieur du parallélépipède de dimensions $(r_{max}w_x, r_{max}w_y, r_{max}w_z)$.

On note $M_r = (rw_x, rw_y, rw_z)$ et on a :

$$\begin{aligned} E_{H,int,immobile}(r_{max}) &= \int_0^{r_{max}} P_3(M_r)\sigma(r)n_{\tau bleach}(M_r) dr \\ &= \int_0^{r_{max}} P_3(M_r)n_{\tau bleach}(M_r)2cr^2 dr \\ E_{h,int,immobile} &= \int_0^{r_{max}} n_{\tau bleach}(M_r) \left(P_{2,1}(M_r) \left(\frac{\sigma(r)}{1} \right)^2 + P_{1,1,1}(M_r) \left(\frac{\sigma(r)}{3} \right) \right) dr \\ &= \int_0^{r_{max}} n_{\tau bleach}(M_r) \left(P_{2,1}(M_r) \left(\frac{2cr^2}{1} \right)^2 + P_{1,1,1}(M_r) \left(\frac{2cr^2}{3} \right) \right) dr \end{aligned}$$

On obtient numériquement pour $c = 10$ et $r_{max} = 1$ à l'intérieur du parallélépipède :

$$E_{H,int,immobile} = 0.096$$

$$E_{h,int,immobile} = 1.18662176019$$

à l'extérieur du parallélépipède :

$$E_{H,ext,immobile} = 1.9 \times 10^{-6}$$

$$E_{h,ext,immobile} = 0.000878643940845$$

Nous pouvons donc en conclure que le nombre de triplets hétérogènes est toujours 100 fois plus élevé que le nombre de triplets homogènes et que les dimensions choisies pour les volume focal sont cohérentes car le nombre de triplets émis à l'extérieur est très faible.

3.5 Molécules mobiles

Les molécules mobiles ne restent en moyenne pas suffisamment longtemps sous le faisceau pour subir le photo blanchiment (le temps de traversée du faisceau est en de l'ordre de la milliseconde, très faible devant le temps de photo blanchiment).

On va donc considérer que celles ci ne subissent pas le phénomène de photoblanchiment.

Dans une première approximation nous allons considérer que le volume focal contient une concentration constante c de molécules mobiles distribuées uniformément

On a la même concentration et la même densité surfacique pour les molécules mobiles d'où

$$\begin{aligned} E_{H,int,mobile} &= n_{\tau} \int_0^{r_{max}} P_3(M_r)\sigma(r) dr \\ E_{h,int,mobile} &= n_{\tau} \int_0^{r_{max}} \left(P_{2,1}(M_r) \left(\frac{\sigma(r)}{1} \right)^2 + P_{1,1,1}(M_r) \left(\frac{\sigma(r)}{3} \right) \right) dr \end{aligned}$$

On obtient numériquement pour $c = 10$ et $r = 1$

à l'intérieur du parallélépipède :

$$E_{H,int,mobile} = 28.$$

$$E_{h,int,mobile} = 186.119754138$$

à l'extérieur du parallélépipède :

$$E_{H,ext,mobile} = 2.1 \times 10^{-6}$$

$$E_{h,ext,mobile} = 0.000952771540716$$

Nous pouvons donc en conclure que les molécules mobiles produisent beaucoup plus de triplets, aussi bien homogènes qu'hétérogènes, que les molécules immobiles. Nous pouvons aussi remarquer que les dimensions du volume focal sont aussi cohérentes avec des molécules mobiles : très peu de triplets sont émis en dehors.

Cependant, le mouvement Brownien provoque des fluctuations du nombre de molécules à l'intérieur du volume focal. On observe expérimentalement (lors des simulations présentées plus loin) que celui-ci se distribue selon une loi normale de moyenne c et de variance $c^{\frac{1}{2}}$

On calcule numériquement l'espérance pour $\langle c \rangle = 10$ du nombre de triplets en générant 100 réalisations c_i de la variable aléatoire C réparties selon la loi $\mathcal{N}(c, c^{\frac{1}{2}})$ et en calculant la moyenne des espérances du nombre de triplets pour une concentration constante c_i .

L'espérance du nombre de triplets homogènes est donc

$$E_{H,int,mobile} = 28.$$

et pour les triplets hétérogènes de

$$E_{h,int,mobile} = 230.70474379$$

4 Simulations

4.1 Type de Modèle

Afin de confirmer ou d'infirmer les prédictions du modèle probabiliste nous avons procédé à des simulations qui permettront d'analyser les différentes influences des molécules mobiles ou immobiles.

La simulation sera ici faite à l'aide d'un modèle multi-agent en C++. L'écriture du programme a pris une quarantaine d'heures réparties de manière assez uniforme sur la durée du stage.

De nombreuses modifications ont été apportées au fur et à mesure de l'élaboration du modèle probabiliste et des résultats des simulations.

Chaque molécule sera modélisée par une instance d'une classe adaptée. La durée de la simulation est divisée en intervalles de temps de longueur δ .

L'algorithme est le suivant :

L'algorithme traite les données reçues (émission de photons) en parallèle de la simulation pour ne garder trace que des n-uplets de photons émis avec n un paramètre.

4.2 Détails du programme

Le code est divisé en différentes classes et modules :

- `molecule` : instancie les molécules et définit la manière dont elles interagissent avec l'environnement (déplacement, émission de photons, etc)

Algorithm 1 Simulation des Molécules

```
for Chaque intervalle do
  for Chaque molécule do
    Évaluation de la probabilité d'émission de k photons en fonction de l'intensité lumineuse locale
    Émission d'un ou plusieurs photon avec la probabilité calculée
    Déplacement Brownien dans une direction aléatoire
  end for
  Traitement des données reçues
end for
```

- environnement : calcule des grandeurs statistiques pour valider le mouvement Brownien
 - fluxmicroscope : récupère les photons émis par les molécules, traite les signaux de manière à garder que les séries voulues (doublet, triplet, etc) écrit ensuite les données pertinentes sur le disque. Calcule la fonction d'autocorrélation
 - focalvolume : instancie un volume d'observation et compte le nombre de molécules dans ce volume à intervalles de temps réguliers.
 - intensity : donne l'intensité du LASER en tout point
 - main : organise les différents modules entre eux
- Le programme lui même peut être lancé avec plusieurs options, selon le but voulu.

Les options au lancement sont respectivement les suivantes :

- ID : entier, détermine le numéro de l'expérience. Ceci permet de refaire les expériences et d'enregistrer les données dans des fichiers de noms différents.
- C : flottant, détermine la concentration moyenne des molécules dans la solution.
- moving : booléen, détermine si les molécules sont fixes ou soumises au mouvement Brownien
- bleaching : booléen, détermine si les molécules sont sensibles au photo blanchiment ou non
- maxTime : flottant, détermine la durée total de l'expérience
- countPhoton : booléen, détermine si on initialise un microscope pour compter les photons ou non
- checkBM : booléen, détermine si la simulation sera une vérification des caractéristiques du mouvement Brownien (changement du nombre de molécules, de la durée et des traitements effectués).
- lookAtFocalVolume : booléen qui détermine si la simulation comptera régulièrement le nombre de molécules à l'intérieur du volume focal.

4.3 Mouvement Brownien

Le mouvement Brownien auquel sont soumises les molécules est un processus continu que nous allons simuler de manière discrète selon le modèle dit de "mouvement Brownien suramorti" dans lequel on considère des frottement suffisamment fort pour négliger l'inertie. Sous ces hypothèses, à chaque pas de temps et pour chaque coordonnée on tire une réalisation de la variable aléatoires X de loi $\mathcal{N}(0, 1)$ et les coordonnées évoluent de la manière suivante : $x_i(t + \delta) = x_i(t) + \sqrt{(2D_{x_i}\delta)}X$

Ces variables aléatoires sont générées à l'aide de la bibliothèque random de C++11 qui utilise l'algorithme Mersenne-Twisterensemencé par des graines non déterministes provenant du matériel sur lequel tourne la simulation.

La simulation du mouvement Brownien telle qu'implémentée présente bien les caractéristiques attendues du mouvement Brownien qui sont :

- Pour chaque coordonnée x_i une moyenne nulle au cours du temps : $\langle x_i(t) - x_i(0) \rangle_t = 0$
- Pour chaque coordonnée une variance qui est une fonction linéaire du temps de pente $2D$: $\langle (x_i(t) - x_i(0))^2 \rangle_t = 2Dt$

On voit en effet sur la figure 1 que la moyenne des positions est autour de 0 et que la moyenne des carrés des positions est bien une fonction linéaire du temps, de pente le double du coefficient de diffusion.

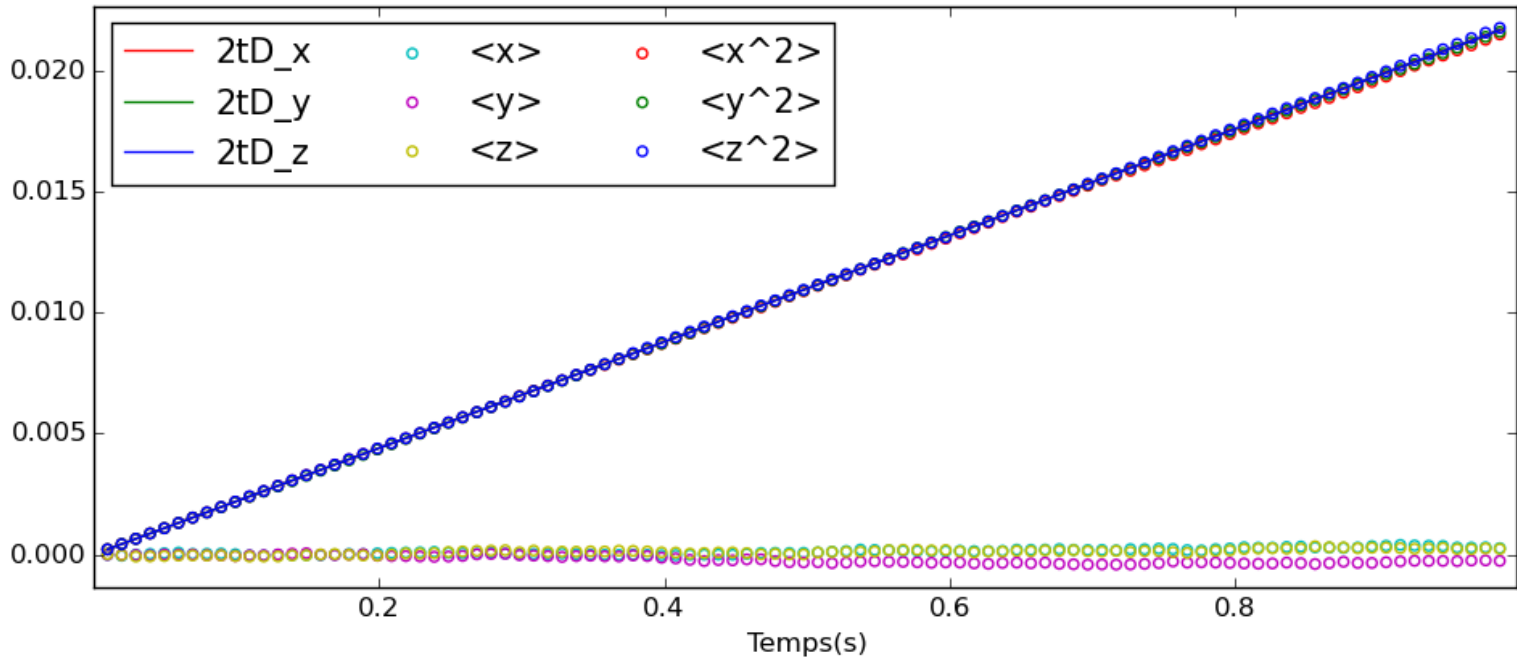


FIGURE 1 – Moyenne des moment d’ordre 1 et 2 de la simulation du mouvement Brownien dans un environnement non borné. $2 \cdot 10^5$ molécules

4.4 Environnement

L’environnement simulé est un parallélépipède de côté c et de hauteur h

Le LASER y émet une intensité $I_0 e^{-2\frac{x^2}{w_x^2} - 2\frac{y^2}{w_y^2} - 2\frac{z^2}{w_z^2}}$

Les molécules qui atteignent le bord du cylindre subissent un rebond sans perte d’énergie, c’est à dire que si le mouvement d’une molécule la faisait sortir de la zone simulée celle ci avance jusqu’à la bordure puis voit la distance restante à parcourir subir une symétrie par rapport à la bordure, ce qui simule le rebond sans perte d’énergie.

Le nombre de molécules est calibré de manière à obtenir une concentration globale c cependant le mouvement Brownien fait varier localement cette concentration et celle ci se répartit au cours du temps selon une loi normale de moyenne c et de variance \sqrt{c} .

La figure 2 présente la distribution stationnaire du nombre de molécules dans le volume focal pour différentes concentrations moyennes ainsi que les lois normales approchant ces répartitions. Ces distributions proviennent de 50 simulations indépendantes dans chacune desquelles 100 mesures ont été faites réparties régulièrement au cours de l’expérience.

La concentration se répartit selon une loi normale dont la moyenne est c et la variance est proportionnelle à \sqrt{c} .

La figure 3 présente avec une échelle log log l’évolution de la variance et la compare à la racine de la concentration. On confirme que la variance est proportionnelle à \sqrt{c} .

4.5 Simulations

L’acquisition des données par simulation prends ici un temps assez important : plusieurs jours de calculs sur deux serveurs de 24 cœurs chacun ont été nécessaires pour obtenir les données présentées

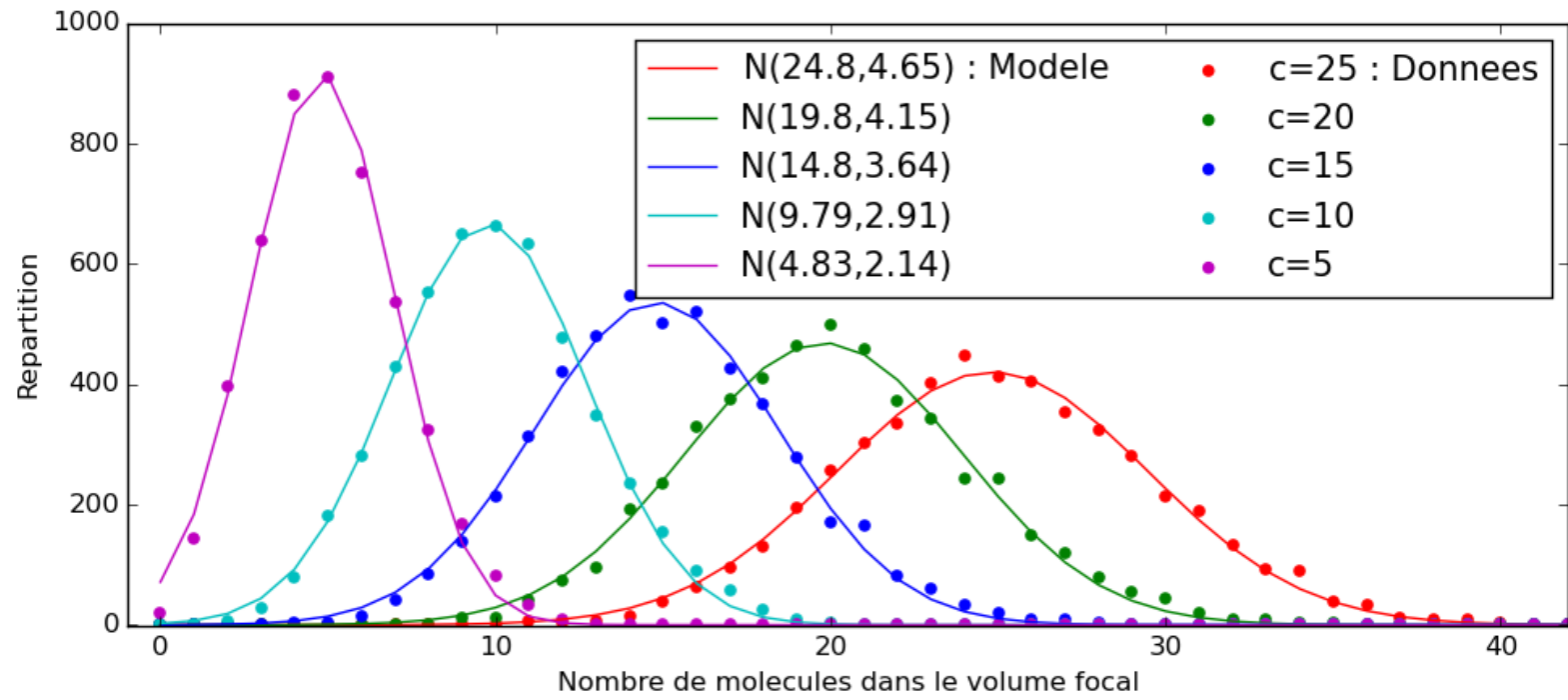


FIGURE 2 – Répartition de la concentration sous le faisceau du LASER

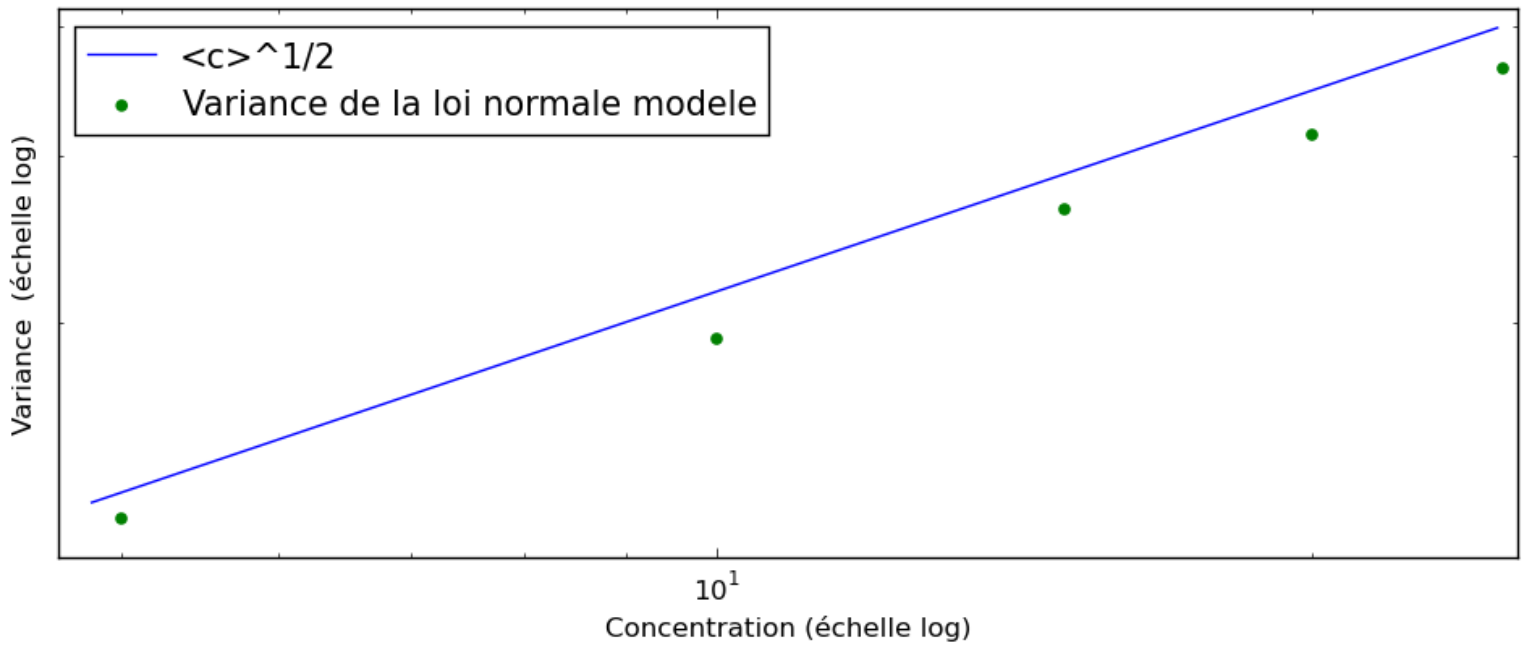


FIGURE 3 – Evolution de la variance et comparaison avec \sqrt{c}

ici.

La complexité de l'algorithme est linéaire en :

- La durée de l'expérience simulée
- La concentration

De plus la prise en compte du phénomène de photo blanchiment limite la durée de l'expérience simulée (celle ci s'arrête quand toutes les molécules sont incapables d'émettre un photon).

L'activation ou non du mouvement Brownien réduit le temps nécessaire d'un facteur très élevé pour plusieurs raison : la première étant qu'en l'absence de mouvement il est inutile de simuler une zone plus importante que la zone éclairée par le faisceau.

On divise ainsi par 8 le volume simulé et donc le nombre de molécules. De plus il est aussi inutile de générer des nombres aléatoires pour le mouvement Brownien ce qui ramène le traitement de chaque molécule à la génération d'un seul nombre aléatoire au lieu de 4. On peut ainsi considérer que le temps nécessaire est divisé par au moins 16 en l'absence de mouvement Brownien.

Les temps de calcul du programme est réparti de la manière suivante :

- Génération des trajectoires de mouvement Brownien : 57% du temps de calcul
- Émission de photons : 25,1% dont 7.44% de calcul de l'intensité du LASER
- Gestion des itérateurs sur les listes : 3.07%
- Calculs ($\log, \text{pow}, \text{exp}, \text{sqrt}$) : 20.6%

L'occupation mémoire de celui ci est faible (moins de 4 mo).

Cette acquisition nécessite de lancer plusieurs simulations pour obtenir des valeurs moyennes et non pas uniquement des réalisations de variables aléatoires soumises à d'importantes fluctuations. Dans le cas présent nous avons lancé 24 simulations en parallèle pour chaque jeu de paramètres. Les données ont ensuite été rassemblées et moyennées à l'aide de scripts en python.

La représentation graphique de ces données a aussi été faite en python à l'aide de la bibliothèque matplotlib.

4.6 Résultats

Les simulations donnent les résultats suivants : la figure 4 présente le nombre moyen de triplets enregistrés pour 24 simulations indépendantes pour des molécules non soumises au photoblanchiment. On y voit très nettement que les triplets hétérogènes sont largement majoritaires. En l'absence de phénomène de photoblanchiment, les triplets sont, à concentration égale, plus présents pour des molécules mobiles que pour des molécules immobiles.

La figure 5 présente le nombre moyen de triplets enregistrés pour 24 simulations indépendantes pour des molécules soumises au photoblanchiment.

Là encore le nombre de triplets homogènes est très nettement inférieur au nombre de triplets hétérogènes. Pour cette figure on voit que les molécules mobiles produisent un nombre de triplet beaucoup plus important que les molécules immobiles.

Ce nombre plus important de triplets provenant des molécules mobiles est du au phénomène de photoblanchiment et aux fluctuations du nombre de molécules qui sont amplifiées par le fait que le triplets hétérogènes croissent comment le cube du nombre de molécules présentes. Ceci relève la moyenne du nombre de triplets car $\langle x \rangle^3 < \langle x^3 \rangle$

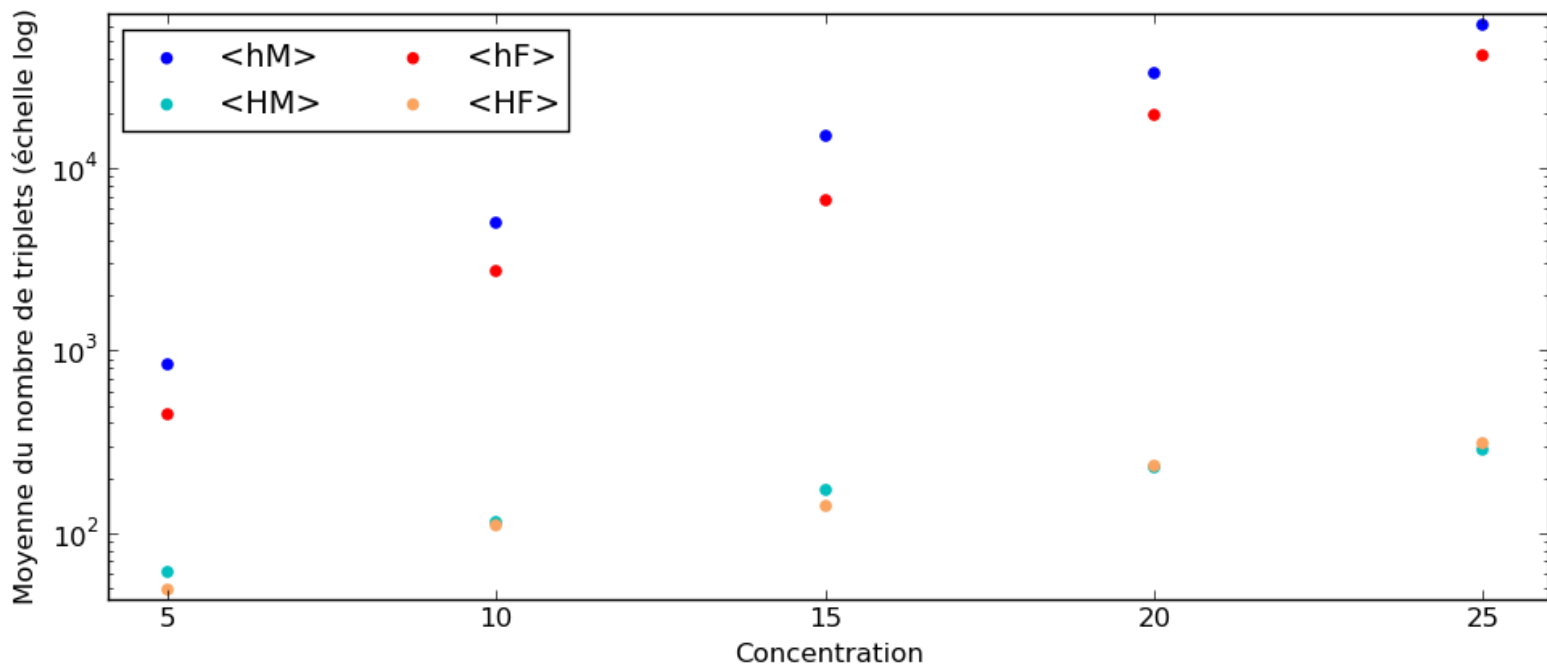


FIGURE 4 – Moyenne sur 24 simulations du nombre de triplets en fonction de la concentration. Molécules mobiles et immobiles et non soumises au photo blanchiment

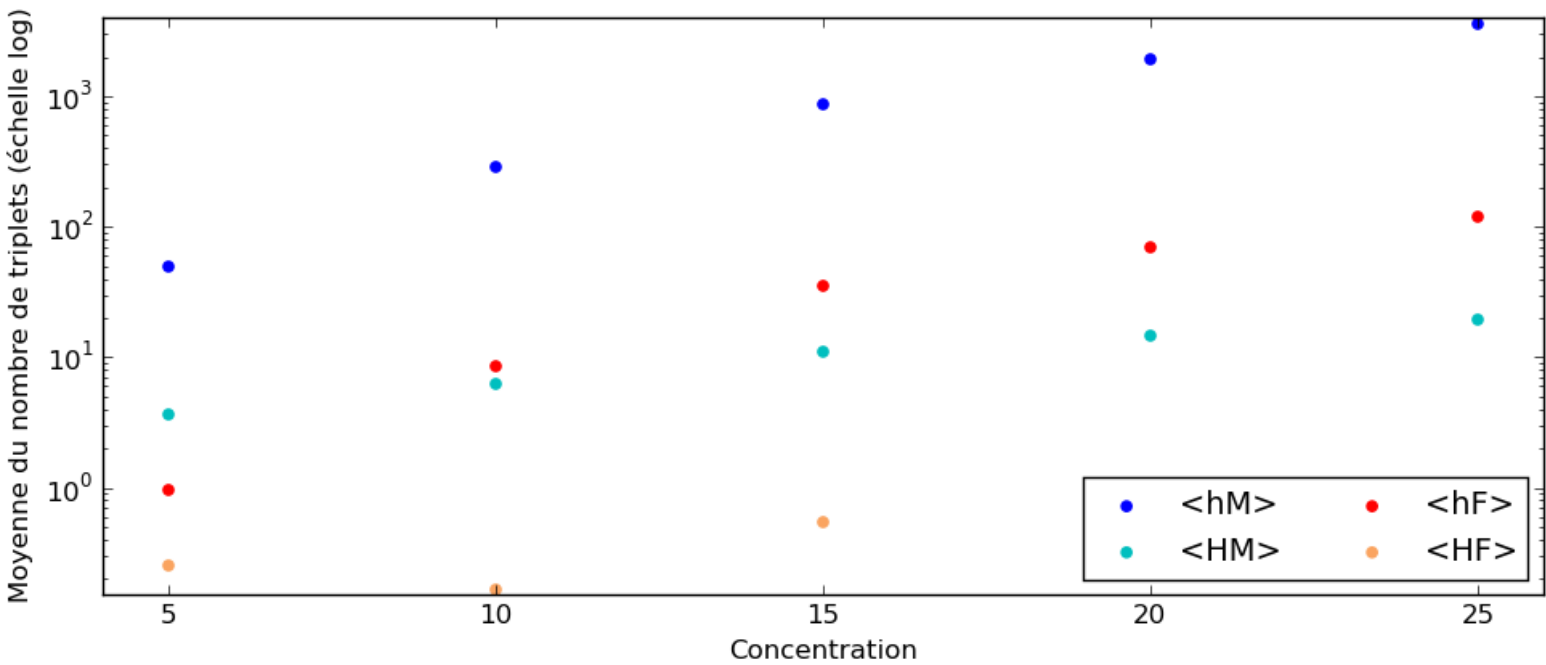


FIGURE 5 – Moyenne sur 24 simulations du nombre de triplets en fonction de la concentration. Molécules mobiles et immobiles et soumises au photo blanchiment

5 Conclusion

Nous avons ici exploré l'hypothèse suivante : des molécules fluorescentes immobiles sous un faisceau LASER ont tendance à émettre plus de triplets de photons dans un court intervalle de temps ($1\mu s$) que des molécules libres soumises au mouvement Brownien.

Nous avons tiré du modèle les conclusions suivantes : l'influence des molécules immobiles serait, à concentration égale, plutôt plus faible que celle des molécules mobiles. En effet, le phénomène de photoblanchiment (ou photobleaching) limite la durée de fluorescence des premières.

De plus, le nombre de triplets hétérogènes évoluant comme le carré du nombre de molécules sous le faisceau, les fluctuations du mouvement Brownien ont pour conséquence que le nombre de triplets provenant des molécules mobiles est bien plus important que celui provenant des molécules immobiles.

Nous avons ensuite conduit des simulations afin de déterminer si les résultats prédit par les modèles se vérifiaient.

Un algorithme multi-agent en C++ a été utilisé et ces simulations confirment l'influence plus faible (voire négligeable) des molécules immobiles.

Nous pouvons donc conclure que l'hypothèse avancée par l'équipe de Laurent Héliot ne semble pas valide et que les triplets de photons ne sont pas la signatures de molécules immobiles.

Cependant, les simulations ont conduit à la détection d'un nombre de triplets très supérieur à ce qui est observé expérimentalement, ce qui limite la pertinence de la réponse de ce modèle à la question posée initialement. De plus, même si les prédictions quantitatives faites par le modèle probabiliste ont le même comportement que les simulations, il apparaît que celles ci divergent d'un facteur multiplicatif des prédictions du modèle.

Dans notre modélisation, il a été fait abstraction du phénomène de conversion inter système (ou photoblinking)[5] mais cet effet aurait une influence similaire à celle du photoblanchiment et pourrait réduire encore l'influence des molécules immobiles sur l'émission de triplets de photons.

La possibilité pour les molécules mobiles de s'immobiliser en se fixant sur le même type de site que les molécules immobiles n'a pas non plus été pris en compte.

La diffusion considérée pour les molécules mobiles est une diffusion normale. Cependant certaines pourraient avoir, du fait de l'encombrement de l'espace intra-nucléaire, un mouvement sous diffusif. Ce mouvement sous diffusif impliquerait que les molécules feraient de temps en temps de pauses d'une durée très longue ce qui pourrait modifier grandement les résultats observés.

Ces conclusions pourraient être complétées par l'utilisation d'un modèle de probabilités continues plutôt que discret pour évaluer l'influence des molécules immobiles, l'implémentation d'un tel modèle pourrait être envisagée mais serait bien plus complexe que le modèle discret utilisé ici.

Par ailleurs les phénomènes omis dans la simulation (conversion inter système, sous diffusion et fixation des molécules libres) pourraient être testées.

6 Remerciements

Je tiens à remercier toute l'équipe INRIA Beagle pour m'avoir accueilli et accompagné pendant ce stage.

Mais je voudrais remercier plus particulièrement mon maitre de stage Hugues Berry pour m'avoir conseillé et guidé pendant ces 8 semaines, pour le temps passé à répondre à mes questions à relire ce rapport, ainsi que Raphaël Bournhonesque pour ses conseils.

References

- [1] Yan Chen et al. "The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy". In: *Biophysical journal* 77.1 (1999), pp. 553–567.
- [2] Ignacio Izeddin et al. "Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus". In: *Elife* 3 (2014), e02230.
- [3] Oleg Krichevsky and Gregoire Bonnet. "Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications". In: *Reports on Progress in Physics* 65.2 (2002), p. 251.
- [4] Douglas Magde, Elliot Elson, and Watt W. Webb. "Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy". In: *Physical Review Letters* 29.11 (1972), p. 705.
- [5] Peter TC So and Chen Y Dong. "Fluorescence spectrophotometry". In: *eLS* (2002).