



THÈSE

soutenue le mardi 17 décembre 2013 par
Sacha Maillot

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Spécialité : Physique

Fluorescence picoseconde de complexes bio-moléculaires hors équilibre dans un écoulement microfluidique

Membres du jury

Mme Sophie LECOMTE	Rapporteur
M. Robert PANSU	Rapporteur
M. Jacques HAIECH	Examineur interne
M. Jérémie LÉONARD	Directeur de thèse

« La vérité pure et simple est très rarement pure
et jamais simple. »

~ Oscar Wilde (1854 – 1900)



Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, Jérémie Léonard, pour m'avoir confié ce travail de thèse. Jérémie, ça a été un grand plaisir de travailler avec toi, ta motivation et ton enthousiasme communicatifs et quotidiens m'ont été d'une grande aide. Merci beaucoup.

Je voudrais également remercier Stefan Haacke, qui a cru à ce projet ambitieux et a tout fait pour qu'il se réalise dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier le jury, Sophie Lecomte, Robert Pansu et Jacques Haiech d'avoir accepté de juger mon travail.

Merci à Sébastien Harlepp, avec qui j'ai eu le plaisir d'encadrer des travaux pratiques et qui m'a aidé à plusieurs reprises au cours de ma thèse. Merci aussi pour les bons moments en Croatie.

Merci également aux doctorants de l'équipe BIODYN, qui ont participé également à ce que ma thèse se passe dans de bonnes conditions : Thomas Gelot, Thomas Roland, Alexandre Cheminal, Moussa Gueye et Li Liu. Je souhaite bon courage aux quatre derniers pour la fin de leurs thèses, et je n'ai aucun doute quant à leur succès. Je remercie les post-doc, Patricia Tourón Touceda, pour son aide et son caractère que j'apprécie beaucoup ; Julien Nillon et Jamie Conyard. Je souhaite également remercier les autres doctorants du DON parmi qui Stéphane Despax, Déborah Persuy, Fuchao Jia, Grégory Taupier, Alban Debacker, mes adorables collègues de bureau Monica Sanches Piaia, Jiwan Kim (post-doc), Maxime Liard et Erwan Terrier, et les anciens Laureen Mangot, Amani Zagdoud, Hélène Vonesch, Yannick Hirschberger, Jean Besbas et Bertrand Yuma.

Je souhaite remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation technique des expériences, notamment Jean-Pierre Vola pour l'électronique, Gauthier Dekyndt pour les pièces mécaniques, Alain Carvalho, Sabine Siegwald, Romain Bernard et la plateforme STnano pour la partie microfabrication, Sophie Ripp et Christian Rick pour leur aide salutaire avec la microfluidique, Émilid Couzigné et Émilid Voirin pour les produits chimiques, Dominique Quincé et Xavier Ledoux pour l'informatique, et enfin Sophie Barre, à qui revient dorénavant le costume d'experte en microfluidique à l'IPCMS. Merci également à Olivier Crégut et Marc Ziegler pour leur expertise en optique et aussi pour leur extrême gentillesse. Merci à Geneviève Pourroy pour nous avoir conseillé l'utilisation de ce couple de molécules si précieux car il nous a permis de réussir notre « pari ». Merci également à Estelle Brunette, secrétaire on ne peut plus efficace du DON. Merci à Virginie Kippeurt-Stortz, je crois que l'IPCMS a beaucoup perdu lorsque tu as choisi un autre institut.

Je tiens à souligner à quel point j'ai été impressionné par le niveau scientifique dans lequel j'ai évolué, et je suis reconnaissant pour tout ce que j'ai pu apprendre au cours de ma thèse.

Je remercie bien-sûr les stagiaires qui m'ont aidé soit au cours de mon stage de master soit au cours de ma thèse : Amina Neggache, May Saad, Madjid Abdessalam, Pierre Ayoub, Amine Ben Hassouna et Nagia Giannakopoulou.

Je souhaite longue vie à l'ADDEPT, amicale de l'IPCMS et je remercie les membres du bureau pour tous les moments agréables passés à préparer les sorties et autres soirées pétanque – BBQ.

J'adresse un salut amical à l'équipe du RUCK¹, qui compte dans ses rangs des membres aussi prestigieux que Thierry Charitat, Guillaume Rogez, Sylvain Grégoire, et qui recensait d'anciennes gloires du ballon ovale et de la matière molle telles que Philippe Lorchat et George Weber. Ceci constitue une liste non exhaustive de personnes à qui je dis merci pour les bons moments sans science (enfin, on a essayé) passés ensemble le mardi midi.

Enfin, *last but not least*, je souhaite remercier pour leur soutien ma famille, sans qui je n'aurais pas pu en arriver là, et mes amis « de l'université » Camille D, Cécile B, Delphine T, Gladys P, Juliane R, Patrycja P, Andru S, Christophe H, Filip S, Guillaume F, Jérôme R, Joseph L, Julien K, Manu G, Marc L, Mohamad H, Tristan B, Wojcech S, et j'en oublie... Merci à Arnaud Hemmerle, ami et confident avec qui j'ai passé de très bons moments depuis le master. Merci également à mes amis Marine et Guillaume. Et aussi merci à Julie, pour ton soutien permanent et la confiance que tu as eue en moi depuis le début.

1. *Rugby Union Cronenbourg – Kronenbourg*

Table des matières

1	Introduction	1
2	Spectroscopie de fluorescence résolue en temps	7
2.1	Généralités	7
2.1.1	Coefficients d'Einstein	8
2.1.2	Cas des molécules	9
2.1.3	Durée de vie de fluorescence	15
2.1.4	Rendement quantique de fluorescence	16
2.1.5	Inhibition (ou <i>quenching</i>) de fluorescence	17
2.2	FRET : transfert d'énergie par résonance de type Förster	18
2.2.1	Principe	18
2.2.2	Sonde structurale	20
2.3	Mesure de fluorescence résolue en temps	22
2.4	Analyse des données	26
2.4.1	Convolution : effet de la résolution temporelle sur la mesure	27
2.4.2	Ajustement des déclin de fluorescence	27
2.5	Conclusion	30
3	Dispositifs microfluidiques	33
3.1	Modélisation de l'écoulement	34
3.1.1	Modèle de Poiseuille	34
3.1.2	Géométrie rectangulaire	35
3.1.3	Discussion	36
3.2	Production de micro-gouttes	39
3.2.1	Conception des dispositifs	40
3.2.2	Mécanisme du mélange au sein des gouttes	41
3.3	Fabrication des dispositifs	43
3.4	Mise en œuvre expérimentale	46
3.4.1	Montage	46

3.4.2	Production des gouttes d'eau dans l'huile	47
3.4.3	Imagerie	48
3.4.4	Mesure de la vitesse	49
3.4.5	Mesure de fluorescence résolue en temps	50
3.5	Mesure du temps de mélange par quenching dynamique de fluorescence . .	52
3.6	Conclusion	55
4	Mesure d'une cinétique bi-moléculaire	57
4.1	Choix du système utilisé	57
4.2	Résultats préliminaires	58
4.3	Cinétique bi-moléculaire mesurée par fluorescence résolue en temps	61
4.3.1	Traitement des données	61
4.3.2	Analyse globale	64
4.3.3	Article soumis	67
5	Perspectives	77
5.1	Étude d'interactions bio-moléculaires	77
5.1.1	Complexe protéine – ADN du VIH	77
5.1.2	Complexes organo-métalliques à base de Ruthénium liés à l'ADN . .	80
5.2	Mesure de fluorescence de gouttes uniques par comptage de photons corrélés en temps	81
5.2.1	Motivation	81
5.2.2	Montage expérimental et principe de la mesure	82
5.2.3	Résultats	84
5.2.4	Conclusion	86
	Conclusion	87
	Appendices	89
A	Spectroscopie d'absorption transitoire des molécules d'Alexa	91
A.1	Principe expérimental	91
A.2	Détermination des spectres d'absorption depuis l'état excité	93
A.3	Discussion	95
A.4	Conclusion	96
B	Convolution d'une somme d'exponentielles avec une gaussienne	97
B.1	Somme d'exponentielles convoluée par un gaussienne	97
B.2	Cas d'une composante non résolue	99

C Dispositifs microfluidiques	101
C.1 Fabrication	101
C.1.1 Procédé de photolithographie en salle blanche	101
C.1.2 Moulage du PDMS	102
C.1.3 Finalisation du dispositif microfluidique	103
C.1.4 Matériel pour la mise en œuvre expérimentale	103
C.2 Modèle de Poiseuille	104
C.2.1 Géométrie circulaire	104
C.2.2 Géométrie rectangulaire	105
Bibliographie	111

Liste des acronymes

- BSA** *Bovine Serum Albumine*, albumine de sérum bovin
- CBF** caméra à balayage de fente
- DMF** dispositifs microfluidiques
- ESA** *Excited State Absorption*, absorption depuis l'état excité
- IRF** *Instrument Response Function*, fonction de réponse instrumentale
- FLIM** Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, microscopie par imagerie de durée de vie de fluorescence
- FRET** Förster Resonance Energy Transfer, transfert d'énergie par résonance de type Förster
- FRT** fluorescence résolue en temps
- GSB** *Ground State Bleaching*, photoblanchiment
- LASER** *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, amplification de la lumière par émission stimulée de rayonnement
- LED** diodes électroluminescentes
- MCP** *Multi Channel Plate*, galette à multi canaux
- PBS** *Phosphate Buffered Saline*, tampon phosphate salin
- PBV** Patent Blue Violet
- PDMS** Poly-(Diméthylsiloxane)
- PFD** Perfluorodecanaphtalene
- PTFE** Poly-(tetrafluoroethylene) ou Teflon
- RMN** résonance magnétique nucléaire
- SE** *Stimulated Emission*, émission stimulée
- SF** *stopped-flow*
- SVD** *Singular Value Decomposition*, décomposition en valeurs singulières

TCSPC comptage de photons uniques corrélés en temps (*Time Correlated Single Photon Counting*)

VIH virus de l'immunodéficience humaine

Chapitre 1

Introduction

Les processus biologiques sont régis par des interactions entre molécules et notamment par des mécanismes de liaison entre macromolécules. En particulier, la reconnaissance biomoléculaire est à la base de nombreuses fonctions biologiques. Afin d'expliquer la reconnaissance biomoléculaire, plusieurs modèles ont été développés, comme le concept d'*induced-fit*. Énoncé il y a plus de cinquante ans [1], ce dernier prédit qu'une protéine change de conformation afin de favoriser la création d'une liaison avec un ligand [1, 2]. Un ligand est une molécule qui se lie de façon réversible sur une autre molécule appelée hôte. Plus récemment, les principes de sélection conformationnelle [3] et de « paysage énergétique » [4, 5] ont permis d'affirmer que la fonction d'une protéine n'est pas uniquement déterminée par une structure moyenne mais par un ensemble de conformations préexistantes, décrites par l'exploration dynamique d'un paysage énergétique [6, 7]. Le concept de sélection conformationnelle implique qu'un ligand sélectionne l'état liant d'une protéine fluctuant de façon dynamique entre plusieurs états conformationnels et déplace l'équilibre chimique de l'ensemble ligand-protéine vers cet état. La figure 1.1 illustre les concepts d'*induced-fit* et de sélection conformationnelle ainsi que leur différence. Le paysage énergétique d'une protéine définit l'ensemble de ses conformations en équilibre. Il est admis depuis longtemps que la fonction d'une protéine est déterminée par sa structure tridimensionnelle, mais il existe des fonctions réalisées par des protéines intrinsèquement désordonnées [8, 9]. Ainsi, à l'équilibre, plusieurs conformations de biomolécules peuvent coexister : c'est ce qu'on appelle l'hétérogénéité structurale. L'étude de l'hétérogénéité structurale des biomolécules est important pour comprendre les mécanismes biologiques, mais il est également important d'étudier leur dynamique : comment ces structures évoluent dans le temps [5, 10]. La figure 1.2 présente des exemples illustrant la dynamique des mécanismes relatifs à la molécule d'acide ribonucléique (ARN) et les techniques biophysiques permettant de les caractériser. Elle montre que les mécanismes de liaisons de ligands, de repliement d'ARN ou de protéines, par exemple, interviennent à des échelles

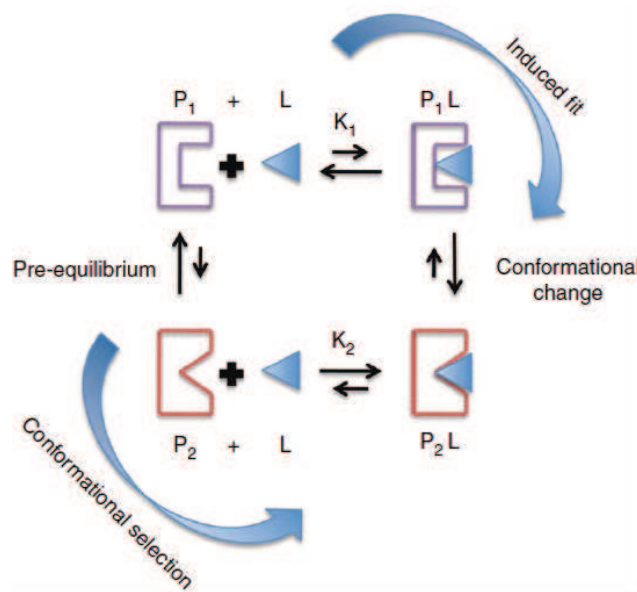


FIGURE 1.1 – Schéma présentant les mécanismes d'*induced-fit* et de sélection conformationnelle, illustrant leur différence. Une protéine possédant deux états conformationnels en équilibre P_1 et P_2 se lie avec un ligand (L). Le processus d'*induced-fit* indique que la protéine change de conformation lors de la liaison, vers son état P_2 . La sélection conformationnelle prédit que c'est le ligand qui va préférentiellement se lier à l'état P_2 de la protéine. Figure issue de [6].

allant de la milliseconde à la seconde. Ce manuscrit de thèse présente une technique permettant de sonder sur de telles échelles les hétérogénéités de structures moléculaires, voire biomoléculaires, par spectroscopie de fluorescence résolue en temps et d'étudier leur relaxation grâce à l'outil microfluidique.

De nombreuses techniques à haute résolution spatiale comme la cristallographie par rayons X, la spectroscopie de masse ou encore la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont permis de résoudre de façon très précise des structures de biomolécules ou de complexes biomoléculaires [5, 11, 12]. Bien qu'elles fournissent une résolution spatiale faible, les spectroscopies résolues en temps ou de molécules uniques [13] s'avèrent de meilleurs outils pour révéler des hétérogénéités de structures et leur dynamique, par opposition aux structures figées ou moyennes le plus souvent observées par les techniques à haute résolution spatiale [5, 14, 15, 16]. Les spectroscopies résolues temporellement et les études de molécules uniques permettent la résolution des dynamiques conformationnelles

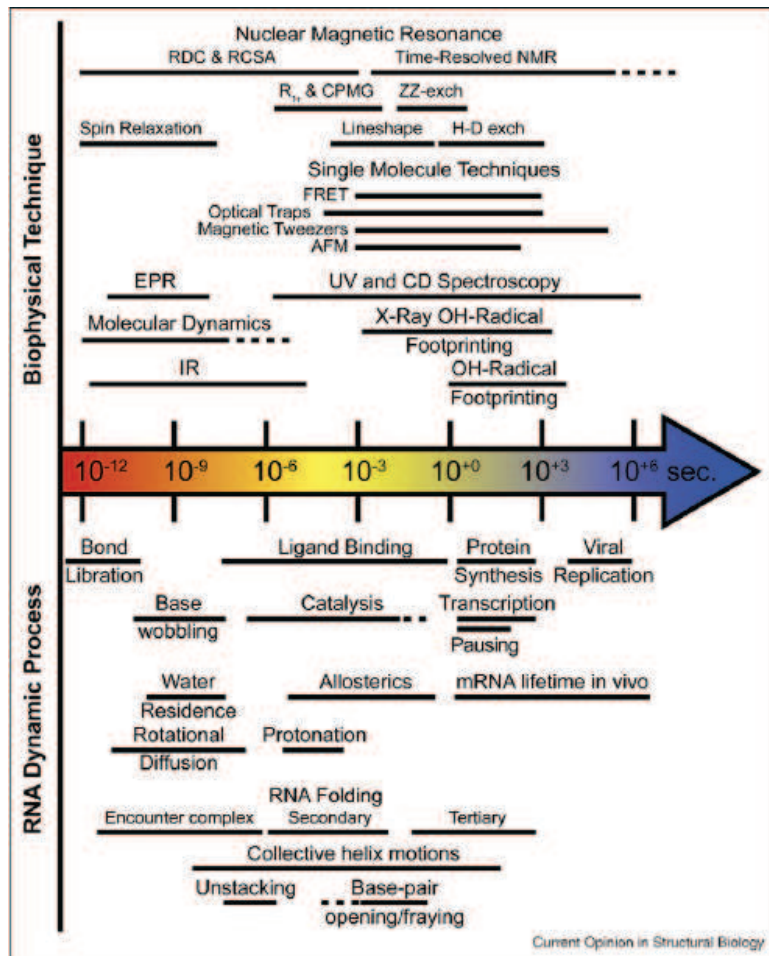


FIGURE 1.2 – Illustration des échelles de temps sur lesquelles les mécanismes d'intérêt ont lieu pour les molécules d'ARN et les techniques employées couramment. En particulier, la fenêtre contenant les dynamiques de liaisons entre molécules, de repliement de protéines ou d'ARN ($10^{-2} - 10^1$ s) peut être sondée par étude hors d'équilibre, en particulier grâce dans la microfluidique. Figure issue de [10].

et de structures intermédiaires au cours de relaxations biomoléculaires [13]. Cependant, étudier des molécules uniques requiert l'emploi de concentrations très faibles en réactifs (sub-nanomolaires) et ainsi l'observation de la relaxation de complexes biomoléculaires issus d'interactions entre deux entités est peu probable. C'est pourquoi la mesure de fluorescence résolue en temps (FRT) sur des ensembles plus concentrés de tels complexes est plus appropriée : plusieurs structures coexistantes contribuent à un signal total. La

FRT est utilisée dans les expériences de Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, microscopie par imagerie de durée de vie de fluorescence (FLIM). Elle fournit des mesures des durées de vie moyenne de fluorescence pour chaque élément résolu par imagerie de microscopie. Cette technique permet de s'affranchir de fluctuations dans les concentrations et d'observer uniquement les interactions entre molécules. Elle est employée en particulier pour sonder l'environnement de macromolécules marquées par des sondes fluorescentes au sein de cellules [17]. Cependant, le FLIM mesure une durée de vie moyenne, or un signal de FRT peut présenter des formes complexes, rendant compte de différentes interactions entre biomolécules et de leur hétérogénéité conformationnelle. Pour des mesures d'ensemble, cette dernière est caractérisée par une distribution de durées de vie de fluorescence [18, 19, 20, 21, 22, 23]. L'équipe où j'ai effectué ma thèse a pour domaine les spectroscopies ultra-rapides [24, 25, 26] et en particulier la mesure de FRT sur des biomolécules par technique de conversion de fréquence [23]. Mon travail a contribué à développer l'utilisation de la FRT comme sonde structurale sur des biomolécules, en y ajoutant l'aspect *hors d'équilibre* grâce à la microfluidique.

Afin de mesurer la dynamique de complexes biomoléculaires, la technique de *stopped-flow* est un outil approprié. Elle consiste à mélanger dans une cellule deux réactifs en un temps proche de la milliseconde, afin de mesurer des cinétiques biomoléculaires par spectroscopie d'absorption ou de fluorescence, et d'obtenir ainsi des informations sur la dynamique de structures [27, 28, 29, 30, 31]. Cependant, cet outil consomme des volumes importants pour un nombre de mesures limité, ce qui est un inconvénient pour l'étude de biomolécules, disponibles en général en faibles quantités. C'est pourquoi ce travail de thèse a consisté à développer la technique de microfluidique [32]. La microfluidique de goutte permet de réaliser des conditions hors d'équilibre afin d'étudier la dynamique de biomolécules ou de complexes biomoléculaires, et de miniaturiser les volumes utilisés [33]. Des gouttelettes de quelques 100 picolitres peuvent être créées et dans lesquelles des réactifs sont mélangés en un temps pouvant être inférieur à la milliseconde [34, 35, 36].

Des implémentations de la mesure de fluorescence résolue en temps (FRT) afin d'effectuer des expériences de FLIM dans des dispositifs microfluidiques ont permis de caractériser les processus de diffusion dans le processus de mélange [37, 38, 39]. Par ailleurs, la FRT a été associée à des dispositifs microfluidiques dits "à flux continu" pour observer des relaxations de structures, pour des expériences de repliement de protéines [40, 41, 42, 43]. Cependant, seules les études employant l'analyse des composantes multiples des signaux de fluorescence pour révéler des hétérogénéités et des intermédiaires dans le repliement pendant la relaxation de la protéine (comme par exemple [42] et [43]), par contraste avec les autres études n'exploitant que la durée de vie moyenne (FLIM).

Ce manuscrit de thèse décrit le développement d'un outil expérimental associant la spectroscopie de fluorescence résolue en temps à la technique de microfluidique de gouttes afin d'étudier des interactions biomoléculaires. L'hétérogénéité des structures sera accessible par la mesure de fluorescence résolue en temps et leur dynamique révélée par les conditions hors d'équilibre créées au sein de réacteurs microfluidiques. J'introduirai dans le chapitre 2 la spectroscopie de fluorescence, en particulier résolue en temps. Je montrerai, au travers des mécanismes de *quenching* et de transfert d'énergie résonante, que cette mesure peut donner accès à une information structurale et notamment à l'hétérogénéité structurale. Je présenterai le mécanisme de Förster Resonance Energy Transfer, transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). Ce dernier est très utilisé dans le domaine de la spectroscopie sur les biomolécules pour obtenir des informations structurales quantitatives et peut servir de « règle moléculaire » [44]. Puis, les techniques expérimentales permettant de mesurer la fluorescence résolue en temps seront présentées, en particulier le principe de fonctionnement d'une caméra à balayage de fente.

Dans le chapitre suivant, la technique de microfluidique sera présentée. La production de gouttes stables d'eau dans l'huile sera discutée. Je décrirai leur utilisation pour effectuer le mélange de deux réactifs. Notamment, je présenterai la mesure du temps de mélange grâce au *quenching* dynamique de la fluorescéine par collisions avec des ions iodure. Cette expérience a montré que l'association de la microfluidique avec la spectroscopie de fluorescence résolue en temps permettait de mesurer un temps de mélange au sein des micro-gouttes.

L'association de la microfluidique avec une détection de fluorescence résolue en temps par caméra à balayage de fente, afin de mesurer une cinétique bi-moléculaire, a constitué une preuve de principe. Elle est présentée dans le chapitre 4, où la relaxation d'un couple chromophore – protéine est observée tout au long du parcours des micro-gouttes. Une analyse globale et multiexponentielle des cinétiques de fluorescence, mesurées au cours de la relaxation du système biomoléculaire, révèle l'hétérogénéité et la dynamique structurales du complexe étudié. L'association des techniques de microfluidique et de fluorescence résolue en temps a constitué une part importante de ce travail de thèse, de même que le choix du système modèle afin de valider le concept. De plus, il a fallu développer une façon d'analyser les données pour ce nouveau type d'expérimentation, détaillée dans le chapitre. Les résultats probants ont donné lieu à la rédaction d'un article [45] (soumis).

Enfin, les perspectives relatives à ce travail de thèse seront présentées. Elles s'orientent dans deux directions. L'une, fondamentale, utilisera la technique décrite ci-dessus pour l'étude des hétérogénéités structurales hors d'équilibre, afin de sonder des interactions biomoléculaires d'intérêt thérapeutique ou diagnostique. L'étude de ces systèmes biomoléculaires s'inscrit dans le contexte de la recherche sur de nouvelles stratégies de thérapies contre le HIV d'une part et de diagnostic du cancer d'autre part, au travers d'interactions protéine-ADN, ARN-ADN ou chromophore-ADN. L'autre direction concerne une

recherche plus appliquée, dans le domaine de la recherche pharmacologique : des expériences préliminaires menées au cours de ma thèse et que je décrirai dans le chapitre 5 ont donné lieu au dépôt d'un brevet [46]. Ce projet s'inscrit également dans le contexte de la recherche pour l'émergence de nouvelles thérapies : l'application pourrait, à moyen voire long terme, de développer un dispositif de criblage à haut débit. Le criblage consiste à tester de nombreuses molécules potentiellement thérapeutiques sur des biomolécules cibles. L'aspect haut-débit est apporté par le fait que 1000 gouttes par seconde pourraient être analysées en temps réel, dans un développement futur.

Chapitre 2

Spectroscopie de fluorescence résolue en temps

De nos jours, les techniques de spectroscopie de fluorescence, de microscopie de fluorescence et de fluorescence résolue en temps sont des outils largement utilisés dans de nombreux domaines des sciences de la matière. L'optique non linéaire permet d'obtenir des sources laser à impulsions ultra-courtes, d'une dizaine de femtosecondes. Ces dernières sont utilisées pour étudier des phénomènes ultra-rapides au sein de la matière grâce, entre autres, à la mesure d'absorption transitoire, ou à la FRT. Dans le domaine de la biologie notamment, des techniques telles que le FLIM et le FRET mesuré par FRT permettent d'accéder à des informations supplémentaires par rapport aux mesures non résolues [47].

Dans ce chapitre seront introduits les éléments nécessaires à la compréhension du phénomène de fluorescence, notamment en ce qui concerne les molécules en solution. Nous montrerons que l'étude de la fluorescence résolue en temps permet d'obtenir des informations sur la dynamique de l'état excité des molécules, puis nous décrirons le processus de FRET. Enfin nous exposerons les techniques courantes de mesure de FRT et en particulier l'utilisation d'une caméra à balayage de fente.

2.1 Généralités

Au début du vingtième siècle, un article d'Einstein [48] décrit les interactions fondamentales entre la lumière et la matière : un système à deux niveaux discrets d'énergie peut absorber ou émettre une radiation électromagnétique, sous forme de quanta de lumière appelés photons, voir schémas figure 2.1. Aux processus d'absorption, d'émission stimulée et d'émission spontanée sont associés des coefficients de probabilité, appelés coefficients d'Einstein.

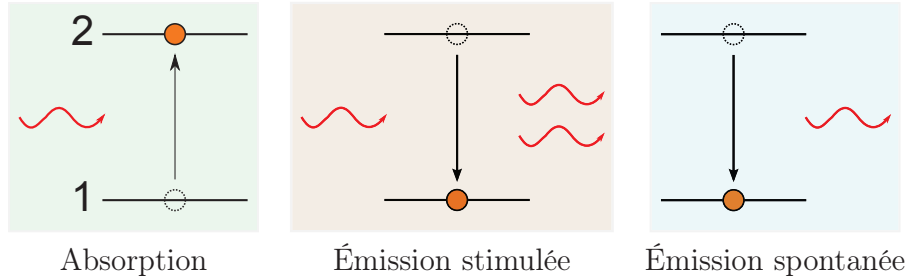


FIGURE 2.1 – Schémas à deux niveaux d'énergie illustrant les principes de l'absorption, de l'émission stimulée et de l'émission spontanée. Les flèches rouges symbolisent les photons incidents ou d'émission.

2.1.1 Coefficients d'Einstein

Considérons d'une part un système à deux niveaux, 1 (fondamental) et 2 (excité), et d'autre part un rayonnement de corps noir, à l'équilibre thermodynamique. La densité de radiation ρ est décrite par la loi de Planck :

$$\rho(\nu) = \frac{8\pi h\nu^3 n^3 c^{-3}}{\exp(\frac{h\nu}{k_B T}) - 1} \quad (2.1)$$

où ν est la fréquence de la radiation, h est la constante de Planck, n est l'indice de réfraction du milieu, c est la vitesse de la lumière et $k_B T$ l'énergie d'activation thermique.

- La probabilité d'absorption d'un quantum d'énergie de radiation (photon) par le système vaut :

$$N_1 B_{12} \rho(\nu_{12}) \quad (2.2)$$

où N_1 est le nombre d'atomes dans l'état 1, B_{12} est le coefficient dit d'Einstein lié à l'absorption et $\rho(\nu_{12})$ est la densité de radiation pour la fréquence de transition ν_{12} . L'énergie du photon est égale à $h\nu_{12}$. Le système est porté dans son état excité.

- La probabilité d'émission stimulée est symétrique à la probabilité d'absorption et vaut donc

$$N_2 B_{21} \rho(\nu_{21}) \quad (2.3)$$

en considérant la transition inverse d'énergie $h\nu_{21}$. L'émission stimulée a pour effet de faire retourner le système dans son état fondamental en créant un photon ; le photon incident est toujours présent après le processus. L'effet *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, amplification de la lumière par émission stimulée de rayonnement (LASER) est basé sur ce phénomène.

- L'interaction du système avec les fluctuations quantiques du vide donnent lieu à l'émission spontanée :

$$N_2 A_{21} \quad (2.4)$$

où A_{21} est le coefficient d'Einstein lié à l'émission spontanée. Il ne dépend d'aucune densité de radiation lumineuse. La probabilité d'émission spontanée dépend de l'interaction entre le système et son environnement. Elle est déclenchée par les fluctuations quantiques du vide, décrites dans le cadre de la théorie de l'électrodynamique quantique, où le champ électromagnétique est quantifié.

Un système excité peut retourner à l'état fondamental par les deux processus d'émission cités, à un taux égal à

$$N_2[A_{21} + B_{21}\rho(\nu_{21})] \quad (2.5)$$

or à l'équilibre thermodynamique, les taux d'absorption et d'émission doivent être égaux

$$N_1 B_{12}\rho(\nu_{12}) = N_2[A_{21} + B_{21}\rho(\nu_{21})] \quad (2.6)$$

Pour obtenir la relation entre les taux d'émission spontanée et d'émission stimulée, on peut avoir recours à la loi de Boltzmann. En effet, pour deux états de populations N_1 et N_2 à l'équilibre thermique, la loi de Boltzmann donne :

$$\frac{N_2}{N_1} = \exp\left[-\frac{h\nu_{21}}{k_B T}\right]. \quad (2.7)$$

En combinant les équations (2.1), (2.6) et (2.7), et en posant $B_{12} = B_{21}$ et $\nu_{12} = \nu_{21}$, on peut établir la relation suivante entre l'émission spontanée et l'émission stimulée :

$$A_{21} = 8\pi h\nu_{21}^3 n^3 c^{-3} B_{21} \quad (2.8)$$

Cependant, pour décrire les phénomènes intervenant au sein des molécules, un modèle de système à deux niveaux est insuffisant, en raison de la complexité de tels objets.

2.1.2 Cas des molécules

Afin de correctement décrire les interactions photon-matière pour les molécules, en plus des états électroniques, il faut considérer les degrés de liberté internes liés à la torsion, l'élongation ou la vibration des noyaux à l'échelle microscopique. Par la suite, à chaque état électronique seront associés des états vibrationnels. Ainsi, une molécule peut être portée dans un état électronique excité mais aussi dans un certain état vibrationnel. Pour retourner à l'état fondamental, elle peut effectuer une transition radiative et émettre de la fluorescence à partir de l'état vibrationnel de plus basse énergie, après une relaxation au sein de l'état électronique excité. La relaxation intramoléculaire, non radiative, peut être de nature vibrationnelle (thermalisation), électronique (conversion interne) ou s'effectuer par changement conformationnel. Des voies de désexcitation par transfert d'énergie

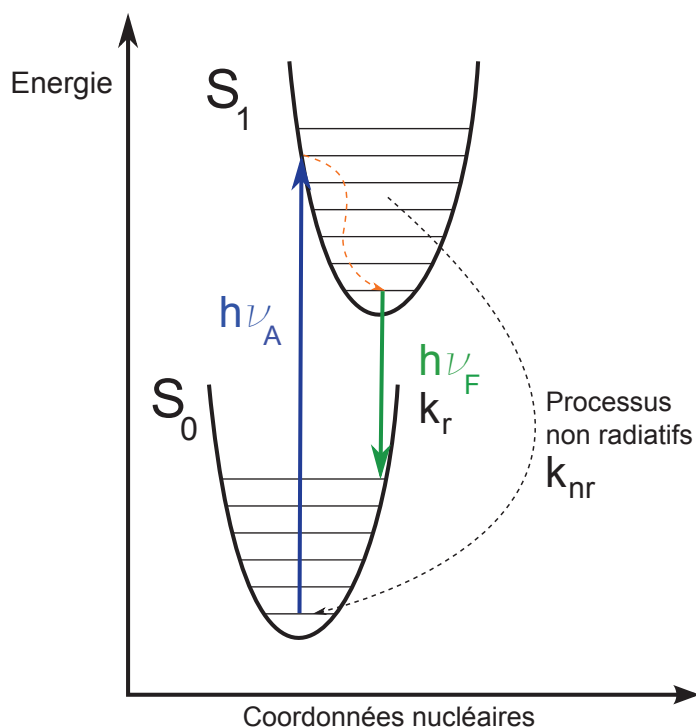


FIGURE 2.2 – Diagramme de Franck-Condon. Un photon d'énergie $h\nu_A$ porte le système dans le premier état excité S_1 . Selon la loi empirique dite de Kasha, le retour à l'état fondamental S_0 doit se faire depuis l'état excité le plus bas, après désexcitation vibrationnelle, s'accompagnant d'une émission de fluorescence, d'énergie $h\nu_F$ vers un état vibrationnel qui n'est pas nécessairement le plus bas : flèche verte. Cette désexcitation radiative peut être caractérisée par un taux d'émission k_r . Les processus non-radiatifs éventuels sont quantifiés par le taux k_{nr} ; voir section 2.1.4. Enfin, la molécule relaxe vers l'état vibrationnel le plus bas de l'état fondamental.

(FRET, voir section 2.2) ou d'électron peuvent intervenir à l'échelle intermoléculaire. La figure 2.2 illustre la fluorescence par un diagramme dit de Franck-Condon.

Le principe de Franck-Condon implique que le mouvement des électrons est bien plus rapide que celui des noyaux. Ainsi, les transitions sont dites verticales, selon le diagramme représenté figure 2.2. La transition entre les états S_0 et S_1 est favorisée si l'énergie du photon $h\nu_A$ est résonante avec la différence d'énergie entre les deux niveaux. Elle est caractérisée par un moment de transition, représentant le dipôle transitoire formé par le déplacement des charges pendant la transition [49]. On définit l'opérateur moment dipolaire $\mathbf{M} = \sum_i e \mathbf{r}_i$, où e est la charge élémentaire et \mathbf{r}_i est le vecteur entre l'électron j et le noyau.

Expérimentalement, le spectre d'absorbance d'une molécule est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre. L'intensité de lumière I absorbée par rapport à l'intensité incidente I_0 sert à définir l'absorbance A d'une molécule en solution par la relation $A = \log \frac{I_0}{I}$. La densité optique est déterminée par la concentration c , en mole par litre, et l'épaisseur traversée par la lumière e , en centimètres, ainsi que d'un coefficient propre à la molécule, appelé coefficient d'extinction molaire ε_m , en litre par mole par centimètre. Ces trois grandeurs sont liées entre elles par la loi de Beer-Lambert, définissant A , sans unité, telle que

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_m c e \quad (2.9)$$

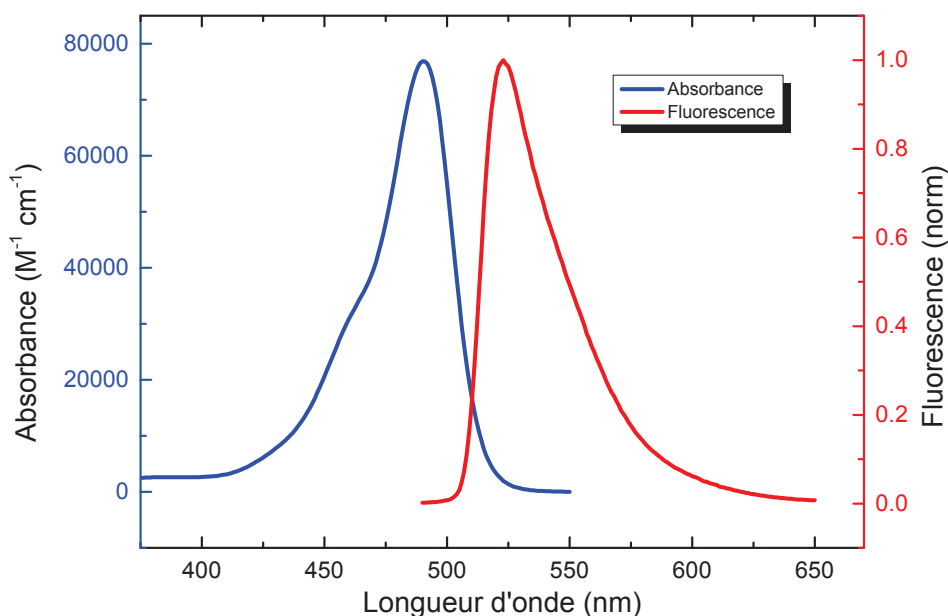


FIGURE 2.3 – Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la molécule de Fluorescéine en solution tampon (PBS) à $\text{pH} = 7.4$. Le spectre d'absorption est maximal pour une longueur d'onde de 490 nm. Le coefficient d'extinction molaire vaut $76900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [50]. Le spectre de fluorescence est normalisé (valeur et unité arbitraires).

La mesure d'un spectre de fluorescence met en évidence l'effet de déplacement de Stokes. Ce dernier est l'illustration de la relaxation vibrationnelle : le photon d'émission de fluorescence est moins énergétique que le photon ayant porté le système dans l'état

excité. C'est pourquoi le spectre de fluorescence se trouve généralement dans un domaine de plus grandes longueurs d'onde que le spectre d'absorption. La figure 2.3 l'illustre en présentant les spectres d'absorption et de fluorescence de la molécule de Fluorescéine, dont les maxima sont décalés de 37 nanomètres l'un par rapport à l'autre.

L'état quantique des molécules peut être décrit par les fonctions d'onde des états électroniques θ_l et θ_u , avec l'indice l pour *low*, état fondamental et u pour *up*, état excité. Pour chaque état électronique, on peut associer des états nucléaires vibrationnels, rotationnels ou translationnels. Dans un article de 1962, Strickler & Berg [51] portent le choix uniquement sur les états vibrationnels. Ils utilisent l'approximation de Born-Oppenheimer consistant à représenter les états vibroniques ψ comme le produit de la fonction d'onde électronique $\theta(x, Q)$, dépendant des coordonnées électroniques x et nucléaires Q (noyaux fixes par rapport aux électrons), avec la fonction d'onde associée aux états vibrationnels atomiques, notée $\phi(Q)$. On a donc

$$\psi_{la}(x, Q) = \theta_l(x, Q)\phi_{la}(Q) \quad (2.10)$$

$$\psi_{ub}(x, Q) = \theta_u(x, Q)\phi_{ub}(Q) \quad (2.11)$$

Les indices a et b discriminent les états vibrationnels, et les équations présentées dans le cas du système atomique à deux niveaux peuvent être exprimées avec les états la et ub au lieu de l et u . Par exemple, l'équation (2.8) devient :

$$A_{ub \rightarrow la} = 8\pi h\nu_{ub \rightarrow la}^3 n^3 c^{-3} B_{ub \rightarrow la} \quad (2.12)$$

Par ailleurs, on a une relation d'égalité entre les coefficients d'émission stimulée et d'émission spontanée. La discussion sur la dégénérescence en spin n'est pas abordée puisque la fluorescence concerne des transitions entre états singulets, dites *autorisées* selon les règles de sélection. La relation entre les coefficients d'absorption et d'émission stimulée est donc :

$$B_{ub \rightarrow la} = B_{la \rightarrow ub} \quad (2.13)$$

À partir de l'équation de Beer-Lambert (2.9), on peut exprimer le coefficient d'Einstein correspondant à l'absorbance, en fonction du coefficient d'extinction molaire $\epsilon(\nu)$ ainsi que celui correspondant à l'émission stimulée avec l'équivalent du coefficient d'extinction molaire pour un gain, noté $\epsilon_{se}(\nu)$:

$$B_{l0 \rightarrow u} = \sum_b B_{l0 \rightarrow ub} = \frac{1000 \ln(10)c}{h\nu n \mathcal{N}_A} \int_{l0 \rightarrow u} \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu \quad (2.14)$$

$$B_{u0 \rightarrow l} = \sum_a B_{u0 \rightarrow la} = \frac{1000 \ln(10)c}{h\nu n \mathcal{N}_A} \int_{u0 \rightarrow l} \frac{\epsilon_{se}(\nu)}{\nu} d\nu \quad (2.15)$$

Le spectre d'absorption est intégré sur toute la bande spectrale.

2.1. Généralités

Les coefficients B sont liés au couplage entre S_0 et S_1 : on peut donc les relier à l'opérateur moment dipolaire de transition $\mathbf{M}(x)$, introduit dans la section 2.1.2 :

$$B_{la \rightarrow ub} = B_{ub \rightarrow la} \quad (2.16)$$

$$= K \left| \iint \psi_{la}^*(x, Q) \mathbf{M}(x) \psi_{ub}(x, Q) dx dQ \right|^2 \quad (2.17)$$

$$= K \left| \iint \theta_l^*(x, Q) \phi_{la}^*(Q) \mathbf{M}(x) \theta_u(x, Q) \phi_{ub}(Q) dx dQ \right|^2 \quad (2.18)$$

Si on note $\int \theta_l^*(x, Q) \mathbf{M}(x) \theta_u(x, Q) dx := \mathbf{M}_{lu}(Q)$, intégrale du moment de transition électronique pour des positions des noyaux fixes Q , on peut effectuer le développement suivant :

$$\mathbf{M}_{lu}(Q) = \mathbf{M}_{lu}(0) + \sum_i \left(\frac{\partial \mathbf{M}_{lu}(Q)}{\partial Q_i} \right)_0 Q_i + \dots \quad (2.19)$$

$$\simeq \mathbf{M}_{lu}(0) \quad (2.20)$$

pour des transitions fortement autorisées et de faibles mouvements des noyaux par rapport à leur position d'équilibre. On peut réécrire l'équation (2.18) pour une absorption à partir de l'état de plus basse énergie vibrationnelle $l0$ vers les états u :

$$B_{l0 \rightarrow u} = \sum_b B_{l0 \rightarrow ub} \quad (2.21)$$

$$= K |\mathbf{M}_{lu}(0)|^2 \sum_b \left| \int \phi_{la}^* \phi_{ub} dQ \right|^2 \quad (2.22)$$

$$= K |\mathbf{M}_{lu}(0)|^2 \quad (2.23)$$

car les fonctions ϕ sont orthogonales dans l'espace des coordonnées Q . Le coefficient A , émission spontanée depuis l'état excité relaxé vibrationnellement $u0$ vers tout état l , peut également s'écrire en fonction de l'opérateur moment dipolaire, en partant de l'équation (2.12) :

$$A_{u0 \rightarrow l} = \sum_a A_{u0 \rightarrow la} \quad (2.24)$$

$$= 8\pi h n^3 c^{-3} K |\mathbf{M}_{lu}(0)|^2 \frac{\sum_a \nu_{u0 \rightarrow la}^3 \left| \int \phi_{la}^* \phi_{ub} dQ \right|^2}{\sum_a \left| \int \phi_{la}^* \phi_{ub} dQ \right|^2} \quad (2.25)$$

où le dénominateur $\sum_a \left| \int \phi_{la}^* \phi_{ub} dQ \right|^2 = 1$ est introduit artificiellement pour pouvoir évaluer cette expression en fonction de paramètres expérimentaux. En effet, chaque terme du

numérateur est proportionnel à une bande vibronique du spectre de fluorescence et chaque terme du dénominateur est proportionnel à ν^{-3} fois l'intensité d'une bande vibronique. Les sommes sur toutes les bandes peuvent être remplacées par les intégrales sur le spectre de fluorescence $I(\nu)$. Avec les équations (2.14) et (2.23) on peut enfin écrire :

$$A_{u_0 \rightarrow l} = k_r = 1/\tau_0 \quad (2.26)$$

$$= 8\pi h n^3 c^{-3} K |\mathbf{M}_{lu}(0)|^2 \frac{\int I(\nu) d\nu}{\int I(\nu) \nu^{-3} d\nu} \quad (2.27)$$

$$= \frac{8000 \ln(10) \pi n^2}{c^2 \mathcal{N}_A} \frac{\int I(\nu) d\nu}{\int I(\nu) \nu^{-3} d\nu} \int \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu \quad (2.28)$$

où k_r est le taux de désexcitation radiative et τ_0 est le temps de vie de l'état excité dans le cas d'une désexcitation uniquement radiative (voir section 2.1.4). En adoptant une notation plus compacte et en remplaçant $\nu(\text{s}^{-1})$ en $c (\text{cm/s}) \times \nu (\text{cm}^{-1})$:

$$\boxed{1/\tau_0 \simeq 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \langle \nu^{-3} \rangle^{-1} \int \epsilon(\nu) d \ln \nu} \quad (2.29)$$

Cette équation prédit assez précisément le temps de vie pour les fluorophores avec des hydrocarbures aromatiques polycycliques : fluorescéine, pérylène, etc. Pour d'autres molécules, elle ne parvient pas toujours à estimer correctement le temps de vie, notamment si la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est faiblement permise. Il faut préciser également que l'expression (2.29) ne prend en compte ni l'interaction des molécules avec le solvant, ni le changement d'indice de réfraction entre la longueur d'onde d'absorption et celle d'émission, ni de changement de géométrie dans l'état excité. Strickler & Berg ont estimé le temps de vie théorique pour plusieurs molécules dans leur étude [51]. À partir des spectres présentés figure 2.3, le calcul effectué pour la fluorescéine donne une durée de vie de 4.1 ns, ce qui est attendu. Le tableau 2.1 donne les détails du calcul et les compare à ceux de Strickler & Berg.

	Solvant	ϵ_{\max}	$\int \epsilon(\nu) d \ln \nu$	$\langle \nu^{-3} \rangle^{-1}$	n^2	RQ	τ (ns)
Strickler & B.	H ₂ O NaOH	7.55×10^4	6183	6.7×10^{12}	1.782	0.93	4.37
S. Maillot	PBS	7.69×10^4	7028	6.2×10^{12}	1.782	0.93	4.12

TABLE 2.1 – Calcul du temps de vie de fluorescence théorique pour la fluorescéine à partir de l'équation établie par Strickler & Berg [51]. Les valeurs d'extinction molaire et de rendement quantique (RQ) proviennent de la référence [50]. Pour ce calcul, j'ai utilisé le même indice de réfraction au carré que Strickler & Berg.

2.1.3 Durée de vie de fluorescence

L'état excité S_1 peut être peuplé un certain temps avant que le système retourne dans l'état fondamental. Si on note $[M^*]$ la concentration de molécules dans l'état excité, on peut décrire la cinétique de décroissance vers l'état fondamental en fonction des taux de radiation k_r et k_{nr} :

$$-\frac{d[M^*]}{dt} = (k_r + k_{nr})[M^*] \quad (2.30)$$

En posant $[M^*]_0$ le nombre de molécules excitées initialement, et en intégrant, on obtient :

$$[M^*](t) = [M^*]_0 \exp(-t/\tau) \quad (2.31)$$

où $\tau = 1/(k_r + k_{nr})$ est la durée de vie de l'état excité, appelée également durée de vie de fluorescence ou constante de temps. Cette dépendance exponentielle traduit le fait que l'émission des photons est plus *probable* au temps inférieurs à τ qu'aux temps supérieurs.

Toutefois, les déclin de fluorescence sont rarement mono-exponentiels. Les molécules en solution peuvent coexister dans diverses conformations, et chaque conformation peut avoir une dynamique d'état excité légèrement différente. Chaque sous-population conformationnelle contribue au signal total. On peut donc modéliser la fluorescence résolue en temps par une fonction multi-exponentielle $s(t)$:

$$s(t) = \sum_i A_i \exp[-t/\tau_i] \quad (2.32)$$

où les A_i et τ_i sont les amplitudes et les constantes de temps associées à chaque déclin.

Cependant, en raison de son éventuelle complexité, il n'est pas toujours possible de modéliser un déclin de fluorescence en le décomposant en une somme multi-exponentielle. La cinétique peut aussi ne pas être exponentielle du tout. Des modèles de distributions continues de temps de vie ont été proposés pour prendre en compte les déclin de fluorescence non exponentiels pour des biomolécules [19, 52].

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la précision de l'analyse exponentielle est limitée par le rapport signal à bruit de la mesure [53]. Il est possible d'utiliser d'autres modèles, notamment dans une étude de J. Beechem [54], où une théorie est développée pour calculer des distributions de distances intermoléculaires grâce à une analyse globale lors d'expériences de FRET, processus décrit paragraphe 2.2. Dans ce modèle, la diffusion des espèces fluorescentes dans l'état excité est prise en compte. Concrètement, dans l'équation différentielle (2.30), les taux k_r et k_{nr} dépendent du temps et la solution n'est plus aussi triviale.

La durée de vie moyenne de fluorescence $\langle t \rangle$ peut être définie de deux façons. La durée de vie moyenne dans l'état excité pour un déclin $s(t)$ défini dans l'équation (2.32) est

donnée par la formule statistique :

$$\langle t \rangle = \frac{\int t s(t) dt}{\int s(t) dt} = \frac{\sum_i A_i \tau_i^2}{\sum_i A_i \tau_i} \quad (2.33)$$

On utilise parfois une autre définition du temps de vie moyen, que je note $\langle \tau \rangle$:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i A_i \tau_i}{\sum_i A_i} \quad (2.34)$$

Ce temps moyen n'est pas le temps moyen de durée de vie de l'état excité. $\langle \tau \rangle$ est proportionnel à l'intensité de fluorescence intégrée et donc au rendement quantique de fluorescence, voir équation (2.37), partie 2.1.4 suivante. Cette définition de temps moyen est utilisée dans les chapitres suivants 3 (partie 3.5) et 4.

2.1.4 Rendement quantique de fluorescence

La quantité de photons émis par fluorescence par rapport au nombre de photons absorbés est appelé rendement quantique, ϕ :

$$\phi = \frac{\text{Nombre de photons émis}}{\text{Nombre de photons absorbés}} \quad (2.35)$$

Il peut arriver que certains mécanismes à l'échelle moléculaire induisent des voies de relaxations non radiatives possibles déjà citées dans la section 2.1.2 ; si tel est le cas, le rendement quantique est inférieur à 1. On peut définir un taux d'émission spontanée k_r et un taux de désexcitation non radiative k_{nr} , tels que :

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2.36)$$

On remarque que plus le taux de désexcitation non radiative k_{nr} est important, plus le rendement quantique est faible. En l'absence de processus non radiatif, le temps de vie d'un fluorophore est qualifié de naturel et vaut $\tau_0 = 1/k_r$. Le temps de vie de fluorescence effectivement mesuré vaut lui $\tau = \phi \cdot \tau_0$.

Le rendement quantique de fluorescence d'un fluorophore est proportionnel à l'intégrale I d'un spectre statique $F(\lambda)$, comme présenté figure 2.3, elle-même égale à l'intégrale du signal de fluorescence résolu en temps $s(t)$ de 0 à l'infini de la même molécule :

$$\phi \propto I = \int_0^\infty F(\lambda) d\lambda = \int_0^\infty s(t) dt = \sum_i A_i \tau_i \quad (2.37)$$

On a donc d'après (2.34) : $\phi \propto \langle \tau \rangle$.

2.1.5 Inhibition (ou *quenching*) de fluorescence

Certains fluorophores peuvent être sensibles à leur environnement. Leur fluorescence peut dépendre du solvant, de son pH, de sa viscosité, ou des autres molécules présentes. Les molécules capables d'inhiber la fluorescence de fluorophores sont appelées "quencher". Lorsque la fluorescence est inhibée, le taux de désexcitation non radiative augmente et le rendement quantique de fluorescence diminue. De cette propriété, on peut donc tirer des informations sur l'environnement d'un fluorophore. Il peut exister plusieurs types d'inhibition : inhibition par collisions, par transfert d'électrons ou d'énergie. Dans le cas d'une inhibition de la fluorescence par transfert d'énergie, on parle de "Förster Resonance Energy Transfer" (FRET). On distingue en général deux processus différents : le *quenching* dit "statique" et le *quenching* dit "dynamique".

Le quenching statique intervient lorsque la molécule fluorescente et le quencher forment un complexe à l'état fondamental. Lorsque le quencher doit diffuser vers la molécule fluorescente dans son état excité, on parle de quenching dynamique. Ce phénomène intervient en particulier lors de collisions physiques entre le fluorophore et le quencher, entraînant la désexcitation de la molécule fluorescente. Il est important de noter que les molécules ne sont pas chimiquement modifiées au cours de ce processus. Le quenching dynamique peut être modélisé par l'équation de Stern-Volmer :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K[Q] \quad (2.38)$$

où I_0 est l'intensité de fluorescence du fluorophore, I est l'intensité de fluorescence en présence du quencher, $[Q]$ est la concentration en quencher et K est la constante de Stern-Volmer, égale à $k_q \cdot \tau_0$ où k_q est la constante de quenching bi-moléculaire et τ_0 le temps de vie du fluorophore en l'absence de quencher. La constante K représente la sensibilité du fluorophore au quencher [55]. Cette constante peut être déterminée expérimentalement, comme nous l'avons fait pour le couple fluorescéine - I^- , utilisé dans une expérience décrite au chapitre 3. On mesure les spectres de fluorescence, puis on trace I_0/I en fonction de la concentration $[I^-]$, voir figure 2.4. En effectuant une régression linéaire passant par $I_0/I = 1$ pour $[I^-] = 0$, on obtient la constante de Stern-Volmer $K \approx 12.9 \text{ M}^{-1}$.

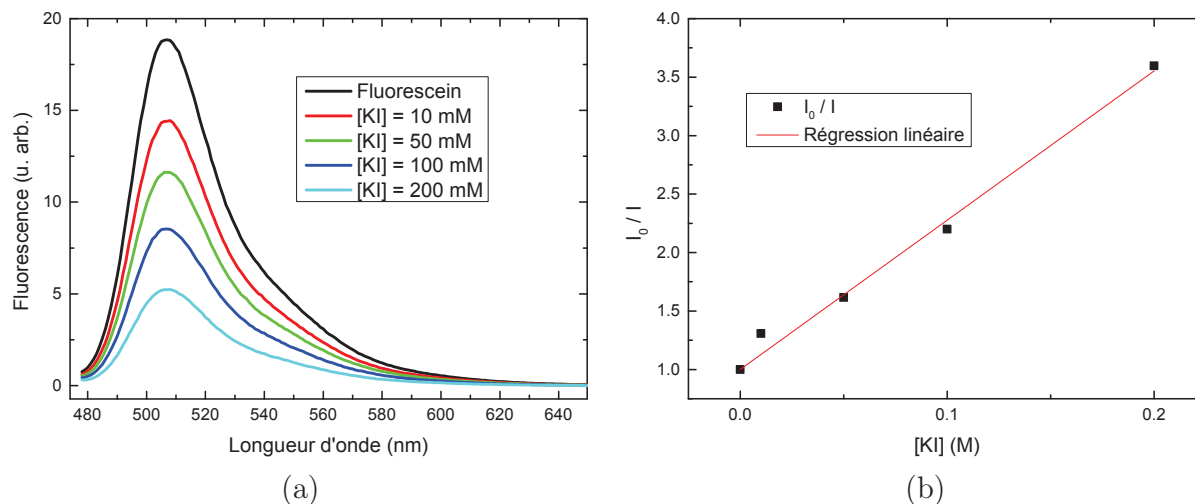


FIGURE 2.4 – Expérience d’inhibition de fluorescence pour le couple fluorescéine – I^- . Plusieurs concentrations d’iodure de potassium sont utilisées et les spectres de fluorescence sont mesurés (a). L’intégrale sous la courbe de ces spectres est calculée pour tracer I_0/I en fonction de $[I^-]$ (b). En fixant l’ordonnée à l’origine égale à 1, la pente obtenue est la constante de Stern-Volmer K . Elle est d’environ 12.9 M^{-1} .

2.2 FRET : transfert d’énergie par résonance de type Förster

Deux molécules peuvent interagir lorsqu’elles sont suffisamment proches par un transfert d’électrons : cas du stacking pour la 2-Aminopurine dans la séquence PBS du virus de l’immotilité [23]), soit par transfert d’énergie, résultant en une diminution de la fluorescence de l’une des deux. Dans le cas du transfert d’énergie, le processus le plus courant est appelé FRET, Förster Resonance Energy Transfer décrit rigoureusement par Theodor Förster en 1948 [56]. Le transfert d’énergie par FRET est un phénomène dû à l’interaction entre les moments dipolaires de transition de deux molécules, dont l’efficacité dépend de la distance entre elles et de l’orientation des moments dipolaires.

2.2.1 Principe

Les deux molécules impliquées dans un processus de FRET forment un couple Donneur (D) - Accepteur (A). En termes de niveaux d’énergie, le mécanisme de FRET peut se décrire en fonction des états fondamentaux S_0 et excités S_1 du donneur et de l’accepteur. En pratique, D est porté dans son premier état excité par un photon d’énergie E_0 , état

2.2. FRET : transfert d'énergie par résonance de type Förster

dénoté S_1S_0 . La molécule relaxe vers un état vibrationnel inférieur d'énergie $E_1 < E_0$. Puis D transfère son énergie à A, qui est porté dans son premier état excité, état S_1S_0 . L'accepteur relaxe à son tour vers un état vibrationnel inférieur et émet un photon d'énergie $E_2 < E_1$. La figure 2.5 résume le mécanisme en un schéma de niveaux énergétiques de type Franck-Condon.

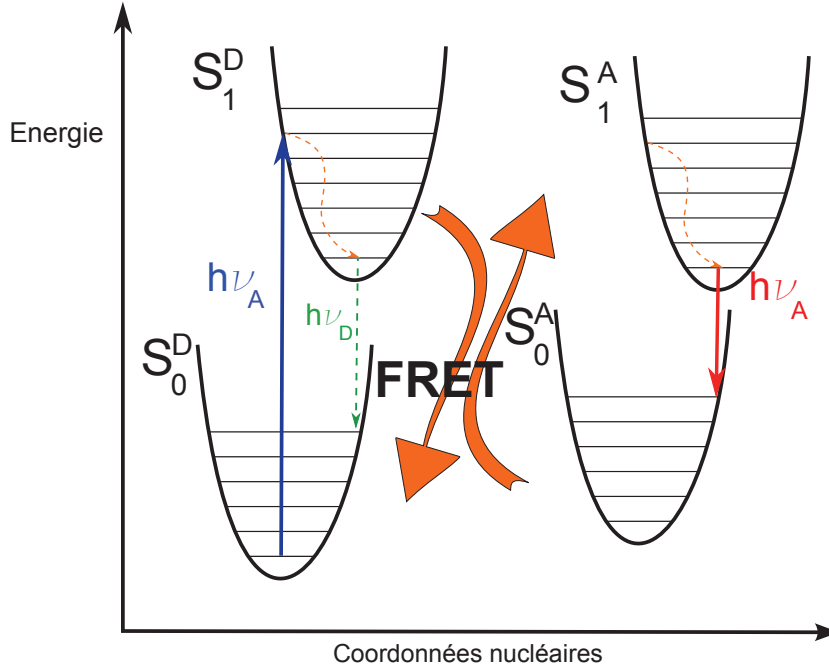


FIGURE 2.5 – Schéma de niveaux énergétiques décrivant le FRET. Le donneur est excité par un photon d'énergie $h\nu_{exc.}$. Selon la distance entre D et A, une part plus ou moins importante de molécules de D fluorescent, photon $h\nu_D$. Une autre part transfère de manière non radiative à l'accepteur une quantité d'énergie, processus représenté par les flèches orange. Dans l'état excité, A peut à son tour fluorescer, photon $h\nu_A$.

La probabilité du transfert d'énergie peut être calculée par la règle d'or de Fermi, issue de la théorie des perturbations. Le calcul suivant est tiré d'un article de D.L. Dexter [57]. On s'intéresse à la probabilité p_{DA} de transition entre les états D^*A ou S_1S_0 , fonction d'onde ψ_I , et DA^* ou S_1S_0 , fonction d'onde ψ_F :

$$p_{DA} = \frac{2\pi}{\hbar} \rho_E |\langle \psi_I | H_1 | \psi_F \rangle|^2 \quad (2.39)$$

où ρ_E est la densité d'états finals et H_1 est l'hamiltonien perturbatif. Ce dernier représente

l'interaction coulombienne entre D et A :

$$H_1(\mathbf{R}) = \frac{1}{\kappa R^3} \left[e_{\mathbf{r}_D} \cdot e_{\mathbf{r}_A} - 3 \frac{(e_{\mathbf{r}_D} \cdot \mathbf{R})(e_{\mathbf{r}_A} \cdot \mathbf{R})}{R^2} \right] \quad (2.40)$$

$$+ \text{interaction dipôle-quadrupôle} + \dots \quad (2.41)$$

où κ^2 est le facteur d'orientation entre les moments dipolaires, \mathbf{R} est la distance séparant D et A, et $e_{\mathbf{r}_{D/A}}$ est l'opérateur moment dipolaire. En injectant l'hamiltonien perturbatif H_1 limité à l'interaction dipôle-dipôle dans l'équation (2.39) estimant la probabilité p_{DA} , il vient :

$$p_{DA}^{\text{dip-dip}} = \frac{2\pi}{\hbar \kappa^2 R^6} \cdot \rho_E \left| \langle \psi_I | [e_{\mathbf{r}_D} \cdot e_{\mathbf{r}_A} - 3 \frac{(e_{\mathbf{r}_D} \cdot \mathbf{R})(e_{\mathbf{r}_A} \cdot \mathbf{R})}{R^2}] | \psi_F \rangle \right|^2 \quad (2.42)$$

On peut remarquer que la probabilité dépend uniquement de $1/R^6$, propriété bien connue, et des éléments de matrice du moment dipolaire entre les états $\langle \psi_I |$ et $\langle \psi_F |$. En effet, on peut exprimer les fonctions d'ondes de la façon suivante :

$$\langle \psi_I | = \langle 1, 0 | = \langle 1 |_D \langle 0 |_A \quad (2.43)$$

$$| \psi_F \rangle = | 0, 1 \rangle = | 0 \rangle_D | 1 \rangle_A \quad (2.44)$$

en séparant les fonctions d'onde du donneur et de l'accepteur. Ainsi, dans la probabilité de transfert d'énergie, équation (2.42), apparaissent les éléments de matrice du moment dipolaire de transition $1 \rightarrow 0$ et $0 \rightarrow 1$:

$$\langle \psi_I | e_{\mathbf{r}_D} \cdot e_{\mathbf{r}_A} | \psi_F \rangle = \langle 1 |_D e_{\mathbf{r}_D} | 0 \rangle_D \cdot \langle 0 |_A e_{\mathbf{r}_A} | 1 \rangle_A \quad (2.45)$$

$$= \mathbf{M}_{1 \rightarrow 0}^D \cdot \mathbf{M}_{0 \rightarrow 1}^A \quad (2.46)$$

2.2.2 Sonde structurale

L'efficacité de FRET, notée E , peut se calculer à partir de la probabilité de transfert d'énergie mentionnée dans la section précédente. Elle représente le rendement quantique du processus de transfert d'énergie.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2.47)$$

où R_0 est le rayon de Förster et r est la distance entre les fluorophores. Le rayon de Förster est caractéristique du couple donneur – accepteur et est défini comme étant la distance à laquelle l'efficacité de transfert est de 50 % :

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln(10) \kappa^2 \phi_D^0}{128 \pi^5 \mathcal{N}_A n^4} \int_0^\infty I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.48)$$

où ϕ_D^0 est le rendement quantique de fluorescence du donneur seul, \mathcal{N}_A est le nombre d'Avogadro et n est l'indice de réfraction du milieu [49]. L'intégrale représente quantitativement le recouvrement spectral entre $I_D(\lambda)$ et $\epsilon_A(\lambda)$, respectivement le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur en fonction de la longueur d'onde.

La connaissance de la distance entre les deux partenaires FRET permet d'obtenir des informations structurales d'une molécule unique ou bien sur l'hétérogénéité structurale d'un ensemble de molécules. Le processus de FRET permet d'estimer des distances entre le donneur et l'accepteur de l'ordre de 10 à 100 Å et agit ainsi comme une "règle¹ à l'échelle moléculaire" (*molecular ruler* [58]). Cependant, pour des expériences de fluorescence statique, des distances moyennes sur toutes les distributions de conformations moléculaires sont mesurées. En effet, des conformations différentes d'une molécule peuvent présenter la même distance entre le donneur et l'accepteur.

Par la suite sont présentés des exemples d'études utilisant le processus de FRET pour sonder des interactions biomoléculaires.

Les interactions entre une protéine chaperonne nommée NCp7 et une séquence d'ADN ou d'ARN du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sont étudiées par FRET, dans le cadre de la recherche sur de nouvelles thérapies [59, 60, 61]. La protéine intervient dans le mécanisme de rétrotranscription du virus et agit spécifiquement sur l'ADN : elle affecte sa conformation. Si NCp7 est inactivée ou absente, le virus n'est plus infectieux. L'équipe d'Yves Mély de la faculté de pharmacie d'Illkirch étudie l'action spécifique de la protéine chaperonne sur les oligonucléotides et l'évolution de la structure du complexe en fonction du temps (cinétiques).

Lors de la synthèse d'Adénosine Tri-Phosphate (ATP), les enzymes ATP-synthase catalysent la réaction par des changements de conformation. Des études consistant à marquer ces enzymes avec des paires de FRET et les intégrer à des liposomes ont permis d'étudier leur dynamique à l'échelle des molécules uniques. Ils ont démontré que lors de la synthèse de l'ATP, le sens de rotation des ATP-synthase est inverse à celui effectué lors de son hydrolyse [62].

L'équipe de Ben Schuler de l'université de Zürich utilise la technique de FRET pour étudier la transition *coil-globule* (dépliée-repliée) dynamique de protéines uniques [14, 63], marquées avec un couple de molécules dont le spectre est présenté figure 2.6.

Lors d'une expérience de FRET, la longueur d'onde d'excitation pour porter D dans son état excité peut également, dans une moindre mesure, être absorbée par A. Dans ce cas particulier, les deux partenaires peuvent être alors dans leurs états excités : S_1S_1 . De ce fait, deux voies de désexcitation par transfert d'énergie peuvent coexister : le système peut repasser soit dans l'état S_0S_1 soit dans l'état S_1S_0 . Ceci peut potentiellement fausser le calcul d'efficacité FRET car bien que les deux chromophores absorbent, seul un des deux

1. dans le sens de « règle graduée »

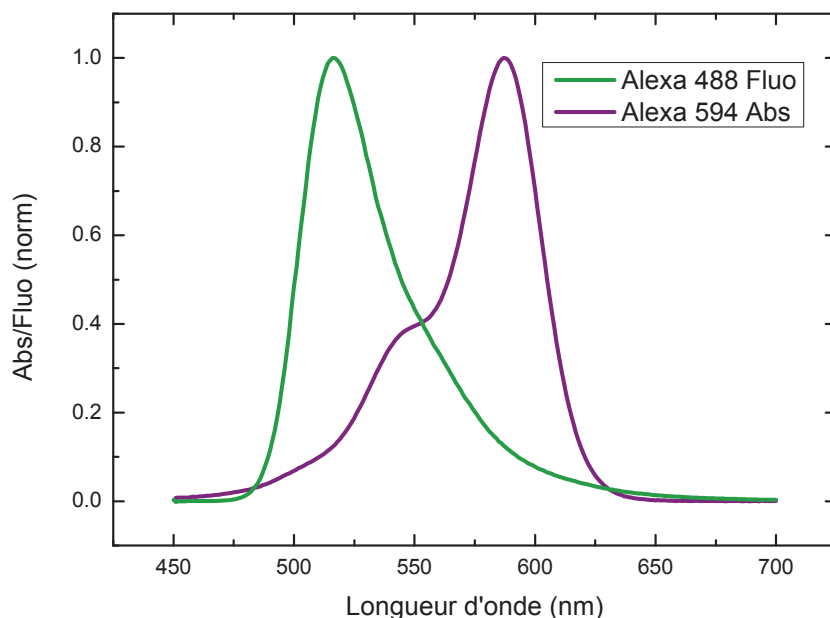


FIGURE 2.6 – Spectres de fluorescence de la molécule d’Alexa 488 (Invitrogen) et d’absorption de la molécule d’Alexa 594. La zone du recouvrement des deux spectres est située entre 470 et 620 nm.

émet de la fluorescence. Ce phénomène est appelé “annihilation singulet-singulet” [64].

Pour tenter de lever cette possible indétermination, il s’avère utile de connaître le recouvrement des spectres d’absorption des premiers états excités de D et A avec les spectres de fluorescence. Ces spectres peuvent être déterminés grâce à la mesure d’absorption transitoire. L’annexe A présente l’étude des molécules d’Alexa par technique pompe-sonde, en collaboration avec l’équipe de Ben Schuler.

2.3 Mesure de fluorescence résolue en temps

Les phénomènes microscopiques liés à l’étude de bio-molécules peuvent être étudiés, grâce à l’utilisation de sources lasers à impulsions ultra-courtes, par des techniques de spectroscopie telles que la mesure d’absorption transitoire (voir par exemple les études sur la photoisomérisation ultra-rapide du rétinol, mécanisme à l’origine de la vision [65, 66] et l’étude sur les molécules d’Alexa en annexe A) ou la mesure de fluorescence résolue en

temps (FRT). Cette dernière permet d'étudier des phénomènes ultra-rapides intervenant pendant la durée de vie du premier état excité singulet, durant laquelle des mouvements (rotations, réarrangements) de la structure moléculaire ont lieu. On peut ainsi sonder les inhomogénéités structurales de biomolécules ou de complexes biomoléculaires [18, 19, 22]. Le mécanisme de FRET résolu en temps permet, en plus de connaître la distance moyenne entre un donneur et un accepteur, d'obtenir des informations sur la distribution des différents isomères ou conformères d'une molécule marquée, dans un mélange hétérogène, voir par exemple les travaux de l'équipe de D. Millar [47, 67, 68] et la dynamique de repliement de protéines mesurée par caméra à balayage de fente par l'équipe de J.R. Winkler [42, 43, 52].

La mesure de FRT peut être réalisée par plusieurs techniques, telles que le comptage de photons uniques corrélés en temps (*Time Correlated Single Photon Counting*) (TCSPC), dont la résolution est de ~ 10 à ~ 100 ps, ou la conversion de fréquence, résolution ~ 100 fs. Afin de mesurer des décroissances exponentielles, nous avons eu recours à une caméra à balayage de fente (CBF), pour la possibilité d'imager plusieurs points de fluorescence simultanément sur une photocathode linéaire.

Le comptage de photons uniques corrélés en temps est une technique permettant d'échantillonner un déclin de fluorescence dans le temps, à l'aide d'un photomultiplicateur synchronisé grâce à une photodiode rapide. La synchronisation permet de connaître le délai entre l'impulsion d'excitation de l'échantillon étudié et l'arrivée du photon (*unique*) de fluorescence. Une reconstruction statistique est ensuite effectuée pour obtenir la forme du déclin. Expérimentalement, on fait en sorte d'obtenir statistiquement beaucoup moins d'un photon par impulsion d'excitation, en général un pour cent (loi de Poisson). Il faut donc accumuler les photons un temps suffisant pour obtenir la reconstitution du signal résolu en temps. La détection est monochromatique.

La nature exponentielle d'un déclin de fluorescence traduit l'aspect probabiliste d'émission d'un photon dans le temps suivant l'excitation. Cet aspect est mis en évidence par le principe-même de la mesure de TCSPC.

La résolution et la sensibilité de la mesure dépendent du type de photomultiplicateur (PM) utilisé. La résolution du signal est de l'ordre de quelques dizaines de picosecondes. En effet, certains PM à *Multi Channel Plate*, galette à multi canaux (MCP) présentent des dispersions de ~ 100 picosecondes. La résolution pour les photodiodes à avalanche détectant des photons uniques peut aller de quelques dizaines à quelques centaines de picosecondes. Le rapport signal à bruit pour les détecteurs de TCSPC est principalement limitée par le taux d'obscurité (*dark count rate*) causé par le bruit thermique.

Des exemples d'études par TCSPC sur des biomolécules existent dans la littérature, en particulier des travaux sur la fluorescence résolue en temps du tryptophane, acide aminé intrinsèquement fluorescent présent dans certaines protéines [69, 70]. Plus récemment, J.

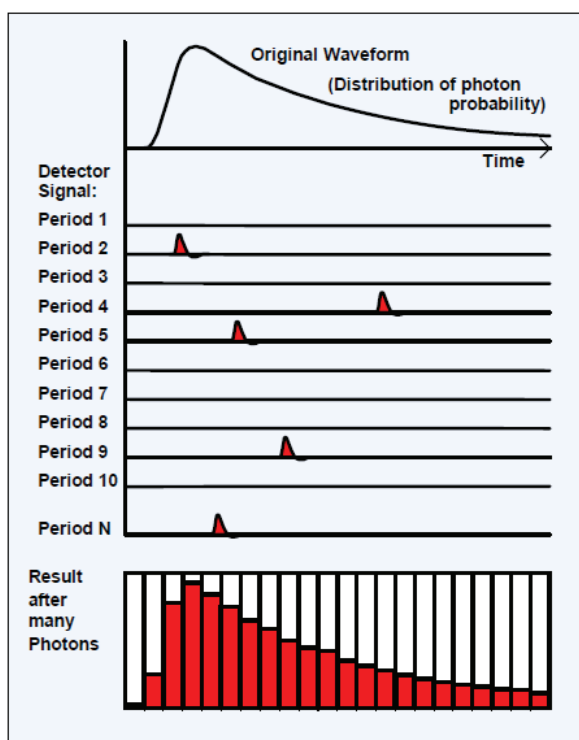


FIGURE 2.7 – Principe de la mesure par TCSPC. La forme du signal de fluorescence à mesurer est représentée en haut, le résultat de la mesure est présentée en bas. La reconstruction est la somme de tous les photons uniques enregistrés à chaque période. Figure issue de *The bh TCSPC Handbook*, Wolfgang Becker.

Brazard *et al.* ont utilisé la technique de TCSPC pour étudier et comparer la fluorescence UV de séquences d'ADN simple brin et double brin [71].

La technique de conversion de fréquence permet de mesurer des cinétiques de fluorescence à une résolution femtoseconde. Le principe de l'expérience est d'effectuer un mélange d'ondes au sein d'un cristal non linéaire (Béta Baryum Borate, BBO). La fluorescence de l'échantillon mesuré est excitée par une pompe. Les photons de fluorescence, ainsi qu'un faisceau dit "porte", sont focalisés dans le BBO. Si les deux faisceaux sont temporellement et spatialement superposés et que les conditions d'accord de phase sont respectées, un troisième faisceau est créé et constitue le signal mesuré. La fréquence de ce faisceau résultant est égale à la somme (*upconversion*) ou à la différence (*downconversion*) de fréquence des deux faisceaux incidents. Un délai sur le faisceau porte permet d'échantillonner la cinétique de fluorescence. La résolution temporelle est meilleure que pour les

2.3. Mesure de fluorescence résolue en temps

caméras à balayage de fente ou que pour le TCSPC : une centaine de femtosecondes contre quelques dizaines de picosecondes. Cependant, la sensibilité de cette technique est bien inférieure : le processus de conversion de fréquence a une efficacité très faible.

Des études de conversion de fréquence ont révélé la dynamique ultra-rapide des électrons au sein d'oligonucléotides : un transfert d'énergie au sein d'une molécule d'ADN double brin est mis en évidence dans la référence [72] et un transfert d'électron au sein d'une molécule courte d'ADN simple brin (structure tige-boucle) est étudié dans l'article [23].

Caméra à balayage de fente La CBF utilisée pour les études présentées dans cette thèse est un modèle commercial (Hamamatsu Photonics) composée d'un spectrophotomètre, un "streak tube" et une caméra CCD. Une photodiode est utilisée pour synchroniser le signal avec l'excitation. Le signal de fluorescence étudié est focalisé dans le spectrophotomètre, où il peut être dispersé pour une étude de spectroscopie résolue spectralement. Les photons collectés sont imagés sur une photocathode linéaire et sont convertis en électrons par effet photoélectrique, voir figure 2.8.

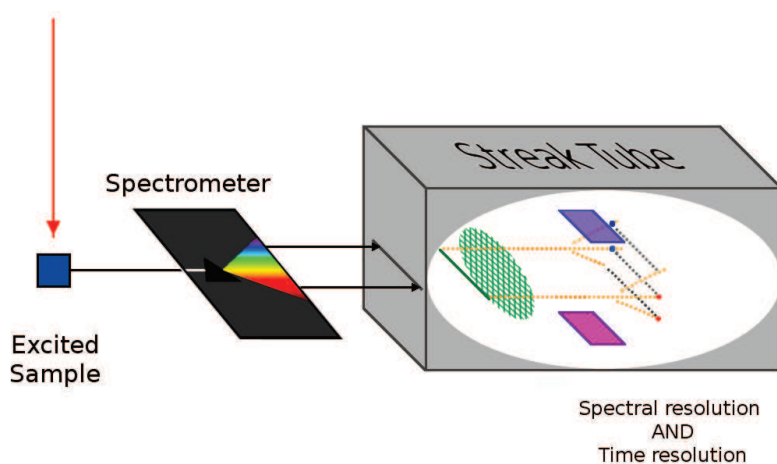


FIGURE 2.8 – Schéma illustrant le principe de la CBF. Un faisceau laser incident (en rouge) excite la fluorescence de l'échantillon (en bleu). Celle-ci est collectée dans un spectrophotomètre, puis dans le "streak tube". La photocathode est représentée par une ligne verte. Les électrodes sont représentées par les rectangles violet et rose.

Dans le *streak tube*, les photoélectrons créés sont accélérés et déviés entre deux électrodes, auxquelles est appliquée une tension sinusoïdale. La fréquence de cette dernière détermine la rampe de tension dépendant du temps avec laquelle les électrons sont déviés : des rampes de 1 nanoseconde à 1 milliseconde sont utilisables. La résolution temporelle des mesures varie en fonction de la rampe de tension utilisée. On a en général une résolution environ égale à 1 % de la durée de la rampe. Par exemple, pour une rampe d'1 nanoseconde, on a une résolution d'environ 10 picosecondes. Les photoélectrons sont amplifiés grâce à une galette de microcanaux (MCP, *multi-channel plate*) et sont envoyés sur un écran de phosphore. Ce dernier est imagé sur la caméra CCD, donnant des fichiers matriciels dont les dimensions sont d'une part le spectre et d'autre part le temps. La détection peut donc être polychromatique, contrairement à la mesure par TCSPC. La référence [73] présente l'étude spectrale et temporelle (picoseconde), de la fluorescence UV d'oligomères synthétiques de l'ADN. Si le spectrophotomètre est réglé à l'ordre 0, la dimension spectrale est remplacée par une dimension spatiale, configuration principalement utilisée lors des expériences décrites par la suite, mais également pour des expériences de FLIM, par exemple voir [74]. Comme montré dans la partie 2.4.2, on peut mesurer un même signal avec des résolutions différentes afin de couvrir toute la cinétique tout en résolvant les éventuels temps courts. La référence [75] présente une étude du photosystème I, ensemble de protéines et de pigments (dont la chlorophylle) intervenant dans la photosynthèse. Dans cette étude, la mesure de fluorescence résolue en temps est réalisée par CBF ainsi que par conversion de fréquence. Par ailleurs, l'utilisation simultanée du TCSPC et d'une CBF a permis à Biskup *et al.* d'obtenir une mesure de FRET et de FLIM pour sonder des interactions protéine – protéine [76].

2.4 Analyse des données

Les signaux de fluorescence résolue en temps peuvent être modélisés par une fonction somme d'exponentielles, équation (2.32) mentionnée section 2.1.3. Cependant, lorsqu'on utilise un montage d'optique tel que la caméra à balayage de fente, le signal observé est affecté par l'*Instrument Response Function*, fonction de réponse instrumentale (IRF). Dans le cadre de mesures de durées de vie de fluorescence, l'IRF limite la résolution temporelle et dépend de l'instrument utilisé. Pour tenir compte de ce fait expérimental, une convolution est effectuée entre la somme d'exponentielles et une gaussienne d'écart-type σ , où σ dépend de la résolution de l'instrument.

2.4.1 Convolution : effet de la résolution temporelle sur la mesure

La convolution d'une somme d'exponentielles – équation (2.32) – avec une gaussienne normalisée $G(t)$ d'écart-type σ

$$G(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma^2}\right) \quad (2.49)$$

donne

$$S(t) = \sum_i \frac{A_i}{2} \cdot \exp\left(\frac{\sigma^2}{2\tau_i^2}\right) \cdot \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau_i}\right) \cdot \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t-t_0-\sigma^2/\tau_i}{\sigma \cdot \sqrt{2}}\right)\right] \quad (2.50)$$

où les τ_i et A_i sont les constantes de temps et les amplitudes associées, t_0 est le temps de début du signal et $\operatorname{erf}(x)$ est la fonction d'erreur définie comme :

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-t^2) dt \quad (2.51)$$

La démonstration de ce résultat est donnée en annexe B.

La convolution d'un déclin multi-exponentiel déforme celui-ci selon la valeur de σ utilisée, comme illustré figure 2.9. L'aire totale sous la courbe reste la même pour toute valeur de σ .

Dans le cas où une constante de temps de la décroissance multi-exponentielle est trop courte pour être résolue, on a $\tau_0 \ll \sigma$, d'amplitude A_0 . Dans le calcul de la convolution, on peut en tenir compte pour effectuer un développement de Taylor (voir annexe B). Il faut en conséquence ajouter à la fonction d'ajustement (2.50) le terme $A_0 \tau_0$ multiplié par la fonction de réponse instrumentale :

$$\tilde{S}(t) = A_0 \tau_0 \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}\right) + S(t) \quad (2.52)$$

2.4.2 Ajustement des déclins de fluorescence

Le logiciel Origin permet d'utiliser les équations (2.50) ou (2.52) pour effectuer l'ajustement des traces de fluorescence obtenues avec la CBF. Un exemple est donné figure 2.10. Les ajustements (ou *fits*) peuvent être améliorés en enregistrant les mêmes signaux de fluorescence sur plusieurs fenêtres temporelles. La CBF peut être utilisée avec différents balayages temporels : 1 ns, 2 ns, 5 ns, etc. L'ajustement d'une cinétique mesurée sur une fenêtre de temps où le signal est redescendu à zéro à la fin permet d'estimer les plus longues composantes mais peut empêcher de mesurer correctement les plus courtes.

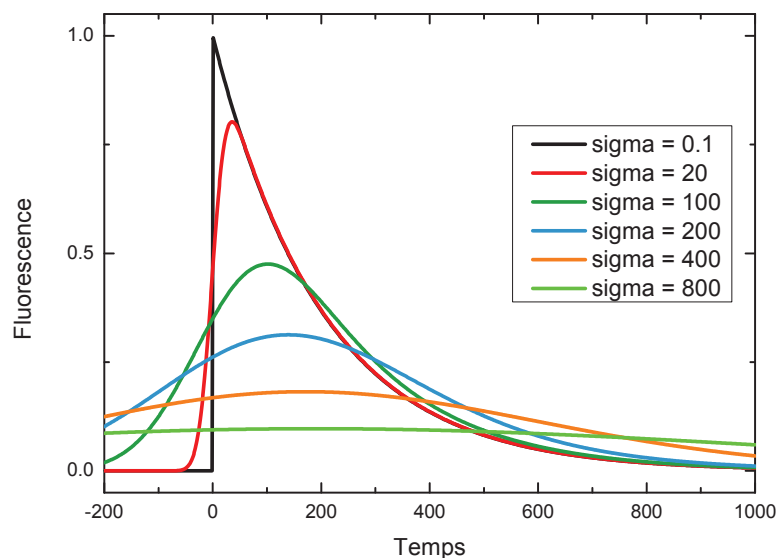


FIGURE 2.9 – Simulation de l'équation (2.50) pour un déclin de $\tau = 200$ (unité arbitraire) convolué par un σ négligeable (courbe noire), par un $\sigma = \tau/10$ (courbe rouge), par un $\sigma = \tau/2$ (courbe verte), par un $\sigma = \tau$ (courbe bleue), par un $\sigma = 2\tau$ (courbe orange) et par un $\sigma = 4\tau$. On remarque que plus σ est comparable à τ , plus l'aspect du déclin de fluorescence est symétrique et non centré sur le temps zéro. Le signal tend vers une gaussienne.

Paramètre	Résultat
sigma	0.14 ns
t0	1.83 ns
A1	1.05
tau1 (ps)	4.13 ns

TABLE 2.2 – Résultats de l'ajustement représenté sur la figure 2.10. La constante trouvée (4.13 ns) est égale au temps prédit par la formule de Strickler & Berg (2.29), voir section 2.1.2.

Pour résoudre toutes les composantes, on peut mesurer le même déclin de fluorescence sur plusieurs fenêtres temporelles. La cinétique totale peut alors être obtenue en utilisant les traces enregistrées sur les fenêtres les plus courtes pour le début et les plus longues pour

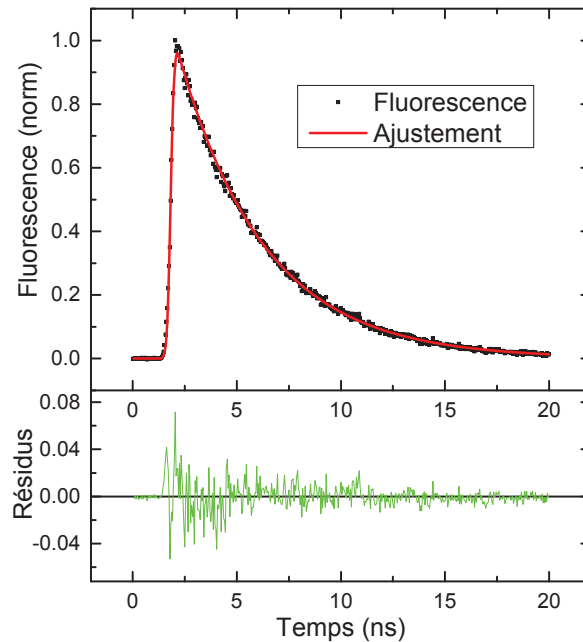


FIGURE 2.10 – Haut : mesure de fluorescence résolue en temps de la fluorescéine en solution tampon ($\text{pH} = 7.4$), ajustée par l'équation (2.50). La mesure est représentée en points noirs, l'ajustement en rouge. Bas : résidus, représentant l'écart entre la trace et l'ajustement. Le résultat de l'ajustement est donné dans le tableau 2.2.

la fin.

La figure 2.11 présente un exemple de reconstruction. Deux mesures d'un même signal sont effectuées à deux calibres différents, 1 et 5 ns. Les deux traces sont alignées au même *temps zéro*, défini comme le temps auquel la moitié de la valeur maximale du signal est atteinte. La mesure sur 1 ns est multipliée par un facteur tel que les temps longs de cette dernière recouvrent le mieux possible les mêmes temps de la mesure sur 5 ns. L'étape suivante consiste à couper les deux traces de façon à utiliser la trace 1 ns pour les temps courts et la trace 5 ns pour les temps longs. L'ajustement est effectué avec l'équation (2.52), où le produit $A_0 \tau_0$ est ajusté par le paramètre appelé "Atau" : on ajuste le produit et non A_0 ou τ_0 , non résolus. L'ajustement séparé des mesures à 1 ns et 5 ns et de la trace reconstruite sont en accord, comme le montre le tableau 2.3.

Paramètre	Résultat 1 ns	Résultat 5 ns	Résultat reconstruction
sigma (ps)	5.5	40.5	5.5
A _{tau}	2.01	5.25	2
A1	143	Non ajustée	144
tau1 (ps)	12.4	(Inférieure à sigma)	12.1
A2	93	48.7	91.2
tau2 (ps)	63.6	65.6	61.2
A3	54	43.6	49.3
tau3 (ps)	301.1	252.1	247.4
A4	Non ajustée	7,13	8,53
tau4 (ps)	Non ajustée	766.7	698.8

TABLE 2.3 – Résultats de l’ajustement des traces mesurées sur 1 ns et 5 ns, et de la reconstruction, représentés figure 2.11. Les traces n’ont pas été normalisées, contrairement à l’exemple précédent (tableau 2.2). On observe bien que les composantes longues (tau3 et tau4) sont mieux ajustées sur l’intervalle 5 ns et que les composantes courtes sont mieux ajustées (A_{tau} et tau1) sur l’intervalle 1 ns. La composante tau2 est correctement évaluée par les trois ajustements.

2.5 Conclusion

Ce chapitre a décrit les processus d’absorption et de fluorescence pour les molécules, notamment d’après le travail de Strickler & Berg [51]. Il a été montré la spectroscopie de fluorescence résolue en temps (FRT) permet de sonder les hétérogénéités structurales, par exemple par l’étude de transfert d’énergie résonante (FRET). La FRT a été mesurée par caméra à balayage de fente dans les expériences décrites aux chapitres 3 et 4. Des mesures de comptage de photons uniques de type TCSPC ont été effectuées dans les expériences décrites au chapitre 5. Les déclin de fluorescence ont été ajustés par les fonctions (2.50) ou (2.52).

Le chapitre suivant présente la technique de microfluidique, permettant de sonder la dynamique des structures biomoléculaires, notamment grâce à l’établissement de conditions hors d’équilibre dans des micro-réacteurs.

2.5. Conclusion

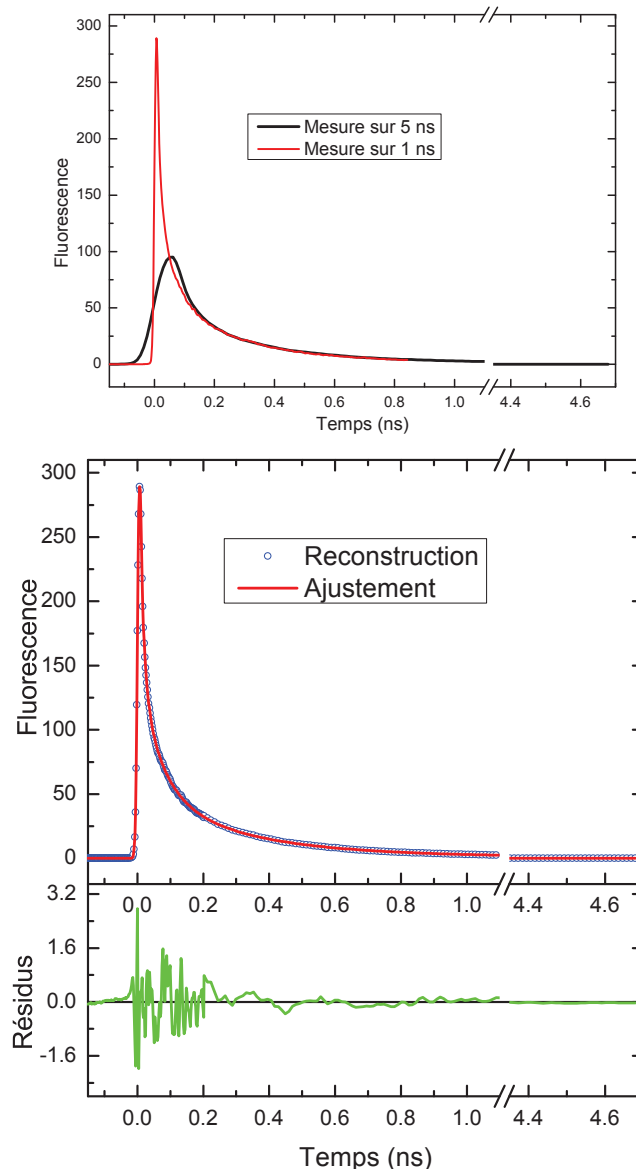


FIGURE 2.11 – Exemple de reconstruction à partir de deux traces issues d’un même signal mesurées sur les intervalles 1 et 5 ns. La fluorescence est celle d’un complexe colorant – protéine (PBV-BSA), utilisé dans l’expérience décrite au chapitre 4. La figure du haut montre l’étape où la trace à 1 ns est mise à la bonne échelle. On peut remarquer le même comportement que dans la figure 2.9 : la mesure ayant une résolution moins grande et donc un sigma plus important a un maximum moins élevé et décalé par rapport au temps zéro. Le graphe du bas montre le résultat final ajusté et les résidus, voir tableau 2.3.

Chapitre 3

Dispositifs microfluidiques

La microfluidique permet de manipuler de faibles quantités de fluides dans des canaux dont les dimensions caractéristiques sont micrométriques. En 1998, George Whitesides a publié une technique de lithographie dite “soft lithography” [77] (lithographie molle), regroupant diverses approches dont le moulage de répliques en Poly-(Diméthylsiloxane) (PDMS). Dans cette thèse, nous utilisons la microfluidique pour produire des gouttes d’eau dans une huile perfluorée. Elles servent de microréacteurs, afin d’y réaliser un mélange rapide de deux réactifs. Les dispositifs microfluidiques que nous avons fabriqués ont été réalisés d’après les expériences menées par Rustem Ismagilov [78]. Le but de ces microréacteurs est de reproduire les conditions hors-équilibre qu’on obtient typiquement dans un appareil de *stopped-flow* standard, avec les avantages suivants :

- les volumes employés sont faibles (typiquement 100 picolitres), ainsi la consommation en réactifs est faible et le mélange est rapide
- un canal de forme sinusoïdale permet d’accélérer le mélange par convection chaotique
- un grand nombre de gouttes identiques, de moins d’un nanolitre, peuvent être produites : de quelques centaines à quelques milliers de gouttes par seconde. À titre de comparaison, pour un appareil de *stopped-flow* (SF) on dispose d’environ 20 tirs pour 1 millilitre de chaque milieu réactionnel.

Cependant, un inconvénient pour notre dispositif expérimental est qu’en cas de pollution photonique (fond, excitation résiduelle, luminescence du PDMS), une limite inférieure dans les concentrations de molécules étudiées peut s’imposer.

Dans ce chapitre, les bases théoriques d’hydrodynamique dans une conduite seront introduites : modèle de Poiseuille. La création de gouttes d’eau dans l’huile et le mélange de réactifs en leur sein seront exposés. Enfin, la procédure de fabrication des dispositifs microfluidiques ainsi que la mise en œuvre expérimentale seront présentées. La technologie de microfluidique de goutte est une technologie que j’ai contribué à développer à l’IPCMS. De nombreuses déconvenues au début des expérimentations ont été rencontrées et ne

sont pas détaillées dans ce chapitre. Il a fallu notamment optimiser la photolithographie, la préparation du PDMS et garantir l'étanchéité des raccords et les protocoles pour la production de gouttes *stables*.

3.1 Modélisation de l'écoulement

La caractérisation de l'écoulement au sein des canaux microfluidiques est essentielle pour s'assurer de sa stabilité et de la reproductibilité de la production des gouttes. Le modèle de Poiseuille peut nous aider à déterminer l'ordre de grandeur des pressions mises en jeu.

3.1.1 Modèle de Poiseuille

Pour modéliser l'écoulement du fluide dans un microcanal, nous avons recours au modèle de Poiseuille. Le modèle de Poiseuille met en jeu un fluide soumis à une différence de pression Δp de part et d'autre d'un canal, dans des géométries pouvant être : entre deux plaques, dans un cylindre, dans un tube de section rectangulaire, *etc*.

On considère un écoulement unidirectionnel, stationnaire, par exemple selon la direction x , d'un fluide incompressible, dans un tube où l'on suppose que la gravité est négligeable et qu'aucun champ extérieur n'est appliqué. Le tube a une section $S = \pi R^2$ et une longueur L . On introduit le coefficient de perte de charge $K = -\frac{\partial p}{\partial x} = \frac{\Delta p}{L}$ et on peut écrire l'équation de Navier-Stokes de la façon suivante (voir détails dans annexe C.2) :

$$\mu \left(\frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} \right) + K = 0. \quad (3.1)$$

En géométrie cylindrique (section circulaire), la résolution de cette équation est particulièrement simple. Il faut pour cela exprimer l'équation de Navier-Stokes dans le système de coordonnées cylindriques. On considère un cylindre de rayon R et une vitesse selon l'axe x (fig. 3.1). La vitesse dépend alors du rayon (variable r) et $v_x = v_x(r)$. On a :

$$\boxed{v_x(r) = V_0 \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right)} \quad (3.2)$$

On trouve par ailleurs que $v_x(r=0) = V_0 = \frac{KR^2}{4\mu}$. Selon l'équation (3.2), la vitesse a un profil parabolique et est donc non uniforme dans une section du cylindre, comme illustré figure 3.1. Ceci est incompatible avec le fait que l'on veuille une relation univoque entre le temps écoulé et la distance de parcours car le fluide a une vitesse maximum au centre et nulle aux bords. Nous avons adopté un dispositif microfluidique qui remédie à ce problème (voir section 3.2.1). Si l'on intègre la vitesse sur une section S droite du tube, on trouve

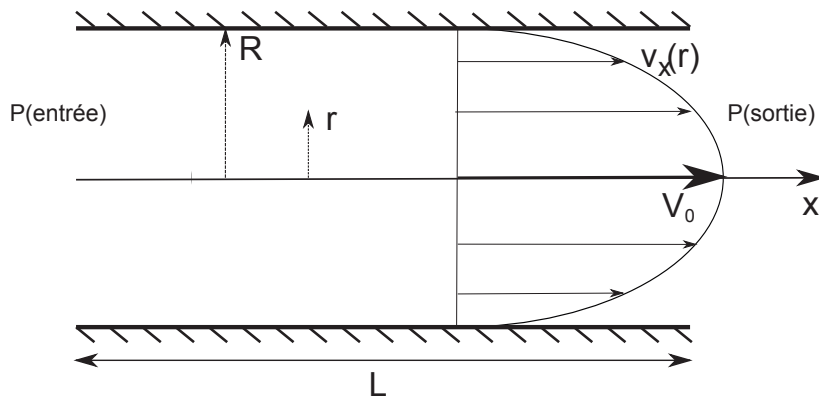


FIGURE 3.1 – Modèle d'écoulement de Poiseuille. Un fluide à l'intérieur d'un canal est soumis à une différence de pression entre l'entrée et la sortie. La viscosité du fluide impose une vitesse nulle aux bords et une vitesse maximale au centre : le profil des vitesses est parabolique.

le débit volumique Q :

$$Q = \frac{\Delta p S^2}{8\pi\mu L} \quad (3.3)$$

Le débit varie donc comme le carré de la section du cylindre.

Il est possible d'obtenir une expression, plus complexe, pour une section rectangulaire.

3.1.2 Géométrie rectangulaire

Soit un fluide incompressible, en écoulement stationnaire selon z dans une conduite de section rectangulaire, voir figure 3.2. On peut reprendre l'équation de Navier-Stokes (3.1)

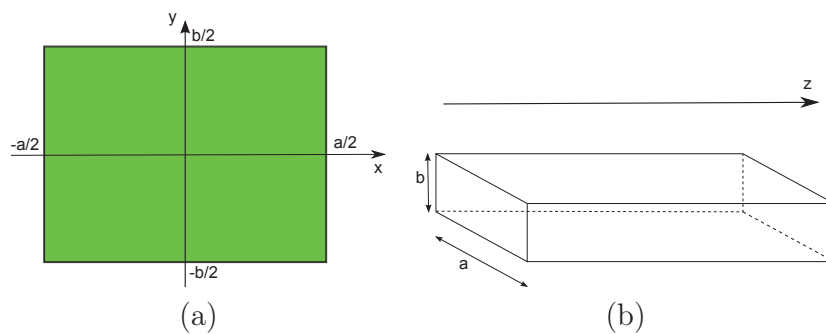


FIGURE 3.2 – (a) Schéma du canal de section rectangulaire, de dimension $a \times b$. (b) Schéma du canal dans la direction z .

de la partie précédente :

$$\mu \left(\frac{\partial^2 u_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u_z}{\partial y^2} \right) + K = 0.$$

et les conditions aux limites suivantes (vitesse nulle aux bords) :

$$u_z(x = \pm a/2, y) = 0 \quad \forall y \quad (3.4)$$

$$u_z(x, y = \pm b/2) = 0 \quad \forall x \quad (3.5)$$

On note $\frac{-K}{\mu} = \alpha$. L'équation (3.1) est une équation de Poisson ($\Delta u_z = \alpha$) dont la résolution, standard, reportée dans l'annexe C.2, donne l'équation suivante pour l'expression de la vitesse :

$$u_z(x, y) = \frac{\alpha}{2} \left(x^2 - \left(\frac{a}{2} \right)^2 \right) + \frac{4\alpha a^2}{\pi^3} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{(-1)^n \cos \left((2n+1) \frac{\pi x}{a} \right) \cosh \left((2n+1) \frac{\pi y}{a} \right)}{(2n+1)^3 \cosh \left((2n+1) \frac{\pi b}{2a} \right)}$$

Ceci nous permet de calculer le débit Q , intégrale sur la section de la vitesse :

$$Q = \frac{\Delta p b a^3}{\mu L} \frac{1}{12} \left[1 - \frac{192a}{\pi^5 b} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{\tanh \left((2n+1) \frac{\pi b}{2a} \right)}{(2n+1)^5} \right] \quad (3.6)$$

Cette équation peut s'écrire en fonction du rapport d'aspect $A = a/b$ et de la section $S = ab$:

$$Q = \frac{\Delta p S^2}{\mu L} \frac{A}{12} \left[1 - \frac{192A}{\pi^5} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{\tanh \left((2n+1) \frac{\pi}{2A} \right)}{(2n+1)^5} \right] \quad (3.7)$$

Dans l'équation (3.6), on peut intervertir a et b pour des raisons de symétrie du problème. En effet, les choix de la solution particulière et de la solution homogène sont arbitraires, voir annexe C.2. Remplacer a par b et b par a correspond à effectuer une rotation de 90° du canal, ce qui ne doit pas changer les propriétés physiques de l'écoulement car on néglige la gravité. Dans plusieurs publications, dont [79, 80] entre autres, une formule identique à l'équation (3.6) est obtenue.

3.1.3 Discussion

On peut remarquer que pour les deux géométries, on peut écrire le débit Q en fonction d'un facteur de forme φ

$$Q = \frac{\Delta p S^2}{\mu L} \times \varphi \quad (3.8)$$

où le facteur de forme vaut $1/8\pi$ pour la section circulaire et a une expression plus complexe, fonction du rapport d'aspect, pour la section rectangulaire, voir équation (3.7).

3.1. Modélisation de l'écoulement

Le graphe présenté figure 3.3 montre l'évolution du terme $\sum_{n=0}^{+\infty} \frac{\tanh\left(\frac{(2n+1)\frac{\pi a}{2b}}{2}\right)}{(2n+1)^5}$ pour un rapport d'aspect $a/b = 1$, en fonction de n . On remarque qu'on peut négliger les termes

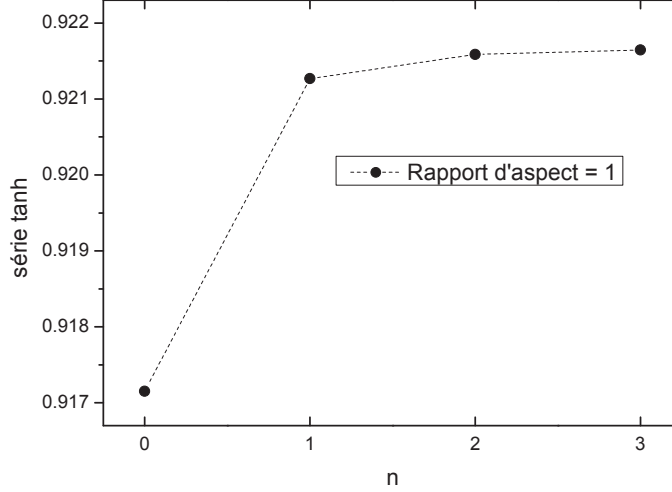


FIGURE 3.3 – Étude de la série en tangente hyperbolique de l'équation (3.6) pour un rapport d'aspect égal à 1.

pour $n > 2$: en effet, la série converge rapidement du fait du terme à la puissance 5 au dénominateur.

Par analogie avec la loi d'Ohm pour un circuit électrique, on peut voir le débit Q comme un courant et la différence de pression Δp comme une différence de potentiel. Le rapport $\Delta p/Q$ représente donc une résistance hydrodynamique, R_h :

$$R_h = \frac{\Delta p}{Q} = \frac{\mu L}{S^2} \times \varphi^{-1} \quad (3.9)$$

$$R_h^{\text{cyl}} = \frac{\mu L}{S^2} 8\pi \quad (3.10)$$

$$R_h^{\text{rec}} \simeq \frac{\mu L}{S^2} \frac{12}{A} \left[1 - \frac{192A}{\pi^5} \sum_{n=0}^2 \frac{\tanh\left(\frac{(2n+1)\frac{\pi}{2A}}{2}\right)}{(2n+1)^5} \right]^{-1} \quad (3.11)$$

Ces équations montrent que la résistance hydrodynamique croît comme la longueur des canaux et décroît comme le carré de la section. La figure 3.4 montre la dépendance du facteur de forme de la résistance hydrodynamique pour une section rectangulaire en fonction du rapport d'aspect.

Afin de minimiser R_h^{rec} , il faut donc minimiser la longueur des canaux, en augmenter la section et avoir un rapport d'aspect le plus proche possible de 1.

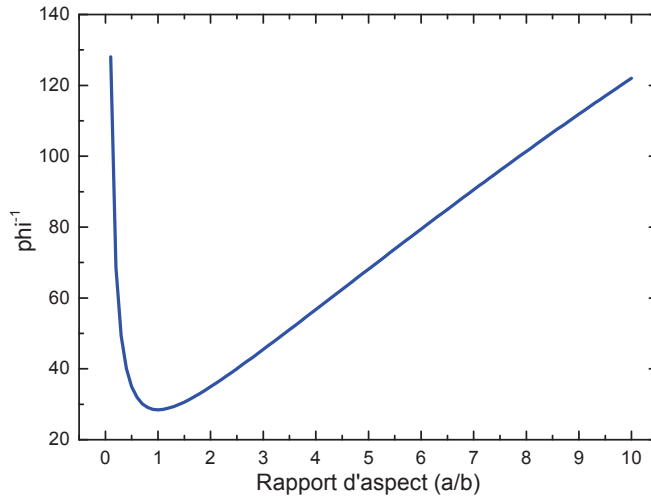


FIGURE 3.4 – Dépendance du facteur de forme de la résistance hydrodynamique pour une section rectangulaire en fonction du rapport d'aspect, selon équation (3.11). Le minimum est atteint pour un rapport 1.

Le modèle de Poiseuille nous enseigne donc qu'un fluide circulant dans une conduite a un profil des vitesses parabolique : figures 3.1 et 3.5. Certains dispositifs microfluidiques dits « à flux continu » (voir par exemple [38]) font se rencontrer deux réactifs au sein d'un canal, voir figure 3.5. Le mélange y est uniquement diffusif parce que l'écoulement s'effectue à faible nombre de Reynolds, *id est* sans turbulence, voir partie 3.2. De plus, le temps initial de mélange n'est pas défini de façon précise. C'est pour remédier à ce problème que la

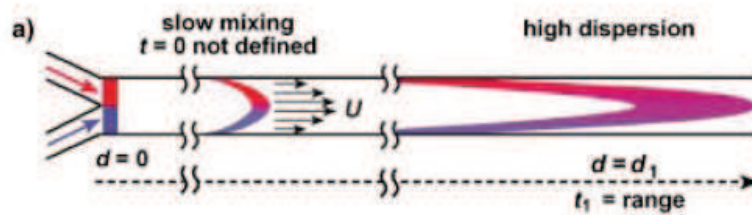


FIGURE 3.5 – Effet de la dispersion dans un dispositif microfluidique à flux continu. Le mélange de deux réactifs (représentés en bleu et rouge) est effectué à la vitesse d'écoulement U . Le nombre de Reynolds est toujours tel que le flux est laminaire : le mélange est donc lent car diffusif. Par ailleurs, le temps initial de la réaction est mal défini. Figure issue de [35].

production d'émulsions a été proposée par Ismagilov *et al.* [35] pour effectuer un mélange sans dispersion et avec un temps initial de rencontre des réactifs bien défini.

3.2 Production de micro-gouttes

Pour produire des micro-réacteurs aqueux individuels, nous produisons des gouttes d'eau dans une huile perfluorée à l'aide de dispositifs fabriqués en Poly-(Diméthylsiloxane) (PDMS), voir section 3.3. Pour bien comprendre les mécanismes entrant en jeu dans ce processus, nous nous intéressons à deux nombres adimensionnés : le nombre de Reynolds Re , renseignant sur la stabilité des flux, et le nombre capillaire Ca , renseignant sur la stabilité des gouttes produites. En hydrodynamique, on définit le nombre de Reynolds comme le rapport des flux convectifs de la quantité de mouvement sur les flux diffusifs :

$$Re = \frac{\rho U^2}{\frac{\mu U}{L}} = \frac{\rho U L}{\mu} \quad (3.12)$$

où U et L sont respectivement une vitesse et une dimension caractéristiques de l'écoulement, μ est la viscosité cinématique et ρ est la densité. Ainsi à vitesse et dimensionnalité faibles, ce qui est généralement le cas pour les expériences de microfluidique, $Re \ll 1$: l'écoulement est laminaire. On définit par ailleurs le nombre capillaire Ca comme le rapport des forces de cisaillement sur les forces de tension de surface :

$$Ca = \frac{\mu U}{\gamma}, \quad (3.13)$$

où γ est la tension de surface entre l'eau et l'huile. Pour des valeurs de Ca supérieures à 1, des gouttes de taille inférieure à la dimension des canaux peuvent se former [81].

Si la tension de surface est supérieure à la force de cisaillement visqueuse ($Ca < 1$), la goutte est stable. Dans les expériences réalisées dans ces travaux, Ca est faible. L'ajout d'un surfactant à l'huile abaisse certes la tension de surface entre l'eau et l'huile, mais ne fait pas augmenter Ca de façon significative. L'action du surfactant ajouté à l'huile est double : il permet de stabiliser les gouttes et de garantir le mouillage préférentiel sur le PDMS de l'huile par rapport à l'eau. Afin que l'huile mouille préférentiellement les canaux, la tension de surface entre l'eau et l'huile doit être inférieure à la tension de surface entre l'eau et le PDMS. L'addition de surfactant à l'huile permet donc d'éviter le mouillage des gouttes sur le PDMS, pouvant entraîner leur déformation et une adsorption du contenu sur les parois des canaux. Dans nos expériences, la viscosité de l'huile perfluorée vaut $5.1 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$, et la tension de surface entre le mélange huile-surfactant et l'eau égale $14 \cdot 10^{-3} \text{ N/m}$ [81]. Pour des vitesses typiques utilisées de 5 à 150 mm/s, on trouve un nombre capillaire d'environ 0.002 à 0.05.

Le mécanisme de production de gouttes à l’aide d’une “jonction en T”, voir section 3.2.1, et une loi d’échelle prédisant leur taille sont détaillés dans les références [82, 83]. En particulier, le lien avec l’équation de Laplace indique que le rayon r d’une goutte est proportionnel à la tension de surface γ :

$$r \sim \frac{\gamma}{2\eta U} y_0 \quad (3.14)$$

où η est la viscosité de l’huile, U est la vitesse de l’écoulement et y_0 est la dimension du canal [82]. Cette propriété est vérifiée dans une expérience décrite dans le chapitre 4 : nous avons remarqué que l’ajout d’albumine sérique bovine (BSA) dans les gouttes réduisait leur taille. En effet, il est connu qu’une telle protéine peut s’adsorber à l’interface eau/huile [84] et agir comme surfactant, abaissant de ce fait la tension de surface et donc le rayon des gouttes [85].

3.2.1 Conception des dispositifs

La fabrication d’une “jonction en T” microfluidique, voir schéma figure 3.6 (a), concept développé en 2001 par Thorsen *et al.* [82] ainsi que Nisisako *et al.* [86], permet de faire se rencontrer deux canaux de dimensions micrométriques contenant respectivement une phase aqueuse et une phase appelée huile. À la jonction, une certaine quantité d’eau bloque le canal d’huile, puis les forces de cisaillement provoquées par les flux déforment le volume créé, créant une goutte qui se détache et laisse la place pour la suivante. La géométrie utilisée dans ces travaux de thèse utilise un conduit destiné aux solutions aqueuses, divisé en trois canaux, convergeant vers la jonction, voir figure 3.6 (b). Cette géométrie a été inventée par R. F. Ismagilov *et al.* [35] et permet de réaliser un mélange de deux réactifs au sein des gouttes. De telles émulsions peuvent également être réalisées par une géométrie dite “flow-focusing” [87], utilisée notamment par l’équipe d’Andrew Griffiths [88, 89]. La géométrie flow-focusing permet la formation stable de gouttes à un nombre capillaire plus élevé ($Ca > 0.04$ et plus) que pour la géométrie jonction en T ($Ca < 0.1$) [90].

Comme mentionné plus haut, la vitesse des flux au sein des dispositifs et le nombre de Reynolds sont relativement faibles, l’écoulement est donc laminaire. Les expériences de microfluidique ne reposant pas sur la création de gouttes, consistant à mélanger deux réactifs se trouvent ainsi pénalisées par un temps de mélange très grand, ce dernier ne reposant que sur la diffusion. En revanche, grâce à la microfluidique de goutte, on peut induire des phénomènes de convection au sein des microréacteurs, accélérant le mélange. Afin d’accentuer ce processus, un canal sinusoïdal permet de réduire considérablement le temps de mélange, par un phénomène dit d’advection chaotique, démontré dans la référence [35], voir section 3.2.2. Ce canal est représenté sur la figure 3.6 (c).

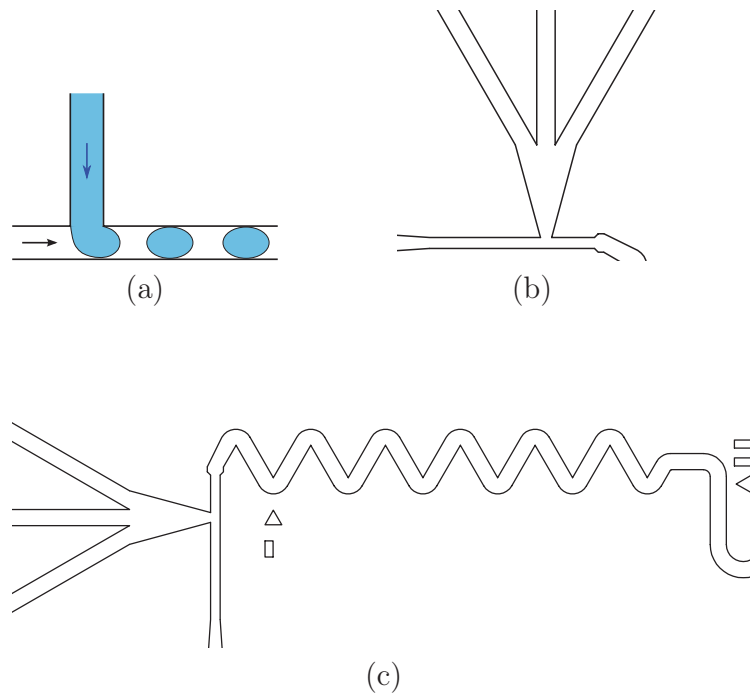


FIGURE 3.6 – (a) Schéma de principe de la jonction en T. Le fluide porteur arrive par la gauche (flux représenté par la flèche noire) et l’eau arrive par le haut (flèche bleue). Des gouttes se forment en aval du flux total après la jonction. (b) et (c) dessins AutoCAD : jonction en T à trois entrées, suivie d’un canal sinusoïdal destiné à accélérer le mélange par advection chaotique.

3.2.2 Mécanisme du mélange au sein des gouttes

Un des principaux avantages de la microfluidique de gouttes est de pouvoir mélanger rapidement les réactifs injectés. À l’échelle microscopique, l’agitation thermique provoque le mouvement brownien des molécules. À l’échelle de la goutte, la convection permet de redistribuer son contenu de manière à diminuer les distances sur lesquelles deux molécules doivent diffuser pour se rencontrer. Ce concept est illustré par la figure 3.7 [91]. La propagation d’une goutte dans un micro-canal induit la convection des fluides en son sein. Cette recirculation interne redistribue les deux réactifs en lames de fluides entrelacées, phénomène appelé “striation”. La distance moyenne entre deux lames de fluide s’appelle longueur de striation s : c’est la distance sur laquelle une molécule de réactif 1 doit diffuser pour rencontrer une molécule de réactif 2. Elle diminue au fur et à mesure que la goutte se propage, permettant d’accélérer le mélange, c’est-à-dire la rencontre effective (interaction) des réactifs. La référence [92] montre expérimentalement que ce modèle est

vérifié.

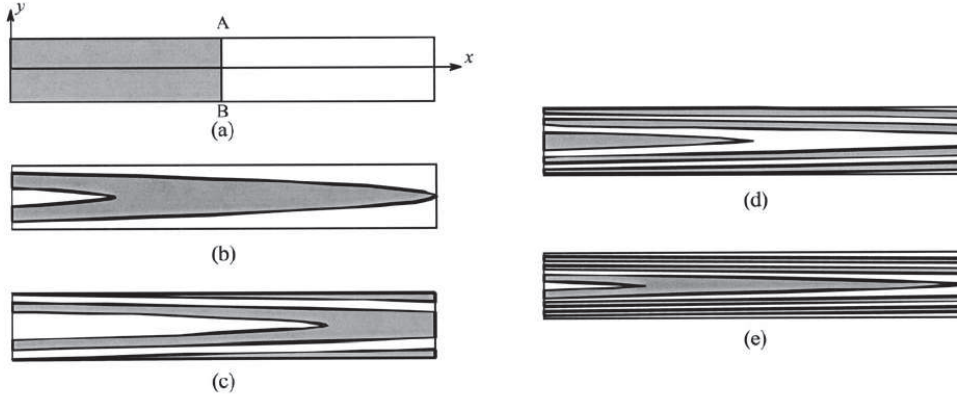


FIGURE 3.7 – Effet de la recirculation, dit *stretch and fold* (étirement et repliement), sur le mélange (a) au temps 0, et après déplacement de (b) une fois sa longueur, (c) deux fois sa longueur, (d) trois fois sa longueur et (e) quatre fois sa longueur. D’après Handique *et al.* [91].

K. Handique *et al.* ont modélisé le mélange au sein d’une goutte de longueur L dans un microcanal de section rectangulaire de largeur w et hauteur d . Ils montrent que le temps de mélange dépend de la taille et de la vitesse de la goutte, ainsi que du coefficient de diffusion D [91]. Dans la géométrie considérée, un canal dont la largeur w est très grande de devant la hauteur d . Ils démontrent que le temps de mélange t_{mix} dans la goutte après qu’elle a parcouru trois fois sa longueur (convection) puis après diffusion des molécules vaut

$$t_{\text{mix}} \approx 0.01 \frac{d^2}{D} \quad (3.15)$$

Un ordre de grandeur pour le coefficient de diffusion D est donné par la formule de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu R} \quad (3.16)$$

où $k_B T$ est l’énergie d’agitation thermique, μ la viscosité et R le rayon typique des molécules.

Application numérique : $k_B = 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$, $T = 293 \text{ K}$, $\mu_{\text{H}_2\text{O}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ et $R = 5 \text{ nm}$ (petites biomolécules). $\Rightarrow D \approx 4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Le temps de mélange dans une conduite droite, obtenu par la convection provoquée par le déplacement de la goutte, puis par diffusion subséquente dans un canal de hauteur $d = 50 \mu\text{m}$

vaut environ 750 millisecondes. Comme démontré dans le paragraphe suivant, on peut obtenir un temps de mélange nettement plus faible grâce à l'utilisation du canal sinusoïdal présenté figure 3.6 (c).

H. Song et R. Ismagilov ont proposé une loi d'échelle pour prédire le temps de mélange obtenu grâce à l'advection chaotique dans un canal sinusoïdal [78]. Ils montrent que le temps de mélange est dominé par la convection et vaut

$$t_{\text{mix}} \sim \frac{aw}{U} \log(Pe) \quad (3.17)$$

où w est la dimension transverse du canal, a est la taille de la goutte relative à w (sans dimension), U est la vitesse de l'écoulement et $Pe = wU/D$ est le nombre de Péclet, représentant le rapport du temps caractéristique de convection et de celui du transport par diffusion. Dans les dispositifs microfluidiques ayant pour but de mélanger rapidement deux réactifs, les processus de convection sont généralement plus importants que la diffusion et Pe est grand (>100) [93].

Application numérique : en prenant les mêmes paramètres que pour l'application numérique précédente, une taille de gouttes comparable à la largeur des canaux ($a = 1$) et une vitesse typique de 50 mm/s, on obtient un temps de mélange de l'ordre de 5 millisecondes. Il y a donc un mélange 150 fois plus rapide par rapport au temps calculé pour une goutte circulant dans une conduite rectiligne !

Contrairement à l'équation (3.15), l'équation (3.17) prévoit une dépendance du temps de mélange en fonction de la vitesse. Pour une taille de gouttes constante, le temps de mélange diminue quand la vitesse de l'écoulement croît. Cette équation est utilisée dans la section 3.5 pour confronter la théorie aux mesures de temps de mélange.

L'équation (3.17) est valable également dans l'expérience réalisée par Liao *et al.* [92], dans laquelle le mélange de solutions très concentrées en biomolécules (centaines de mg/mL d'albumine sérique bovine et d'hémoglobine), reproduisant les concentrations physiologiques typiques, est effectué à l'intérieur de dispositifs microfluidiques légèrement différents de ceux que nous avons utilisés. Le mélange est accéléré par une structure particulière des bords du canal de mélange.

3.3 Fabrication des dispositifs

Cette section résume la procédure détaillée donnée en annexe C.1. Les dispositifs microfluidiques (DMF) sont fabriqués par prototypage rapide : les installations onéreuses nécessaires sont disponibles à l'IPCMS (salles de chimie, salle blanche), le temps et le coût

de production de dispositifs fonctionnels sont relativement faibles. Le procédé est nommé “photolithographie souple”, inventé par G. Whitesides *et al.* [77].

La première étape est la conception des microcanaux. Pour les dessiner, nous avons utilisé les logiciels de conception assistée par ordinateur Elphy Plus (Raith) ou AutoCAD (Autodesk). Le dessin final est envoyé au format numérique pour impression sur masque souple, à une société spécialisée (Selba S.A.).

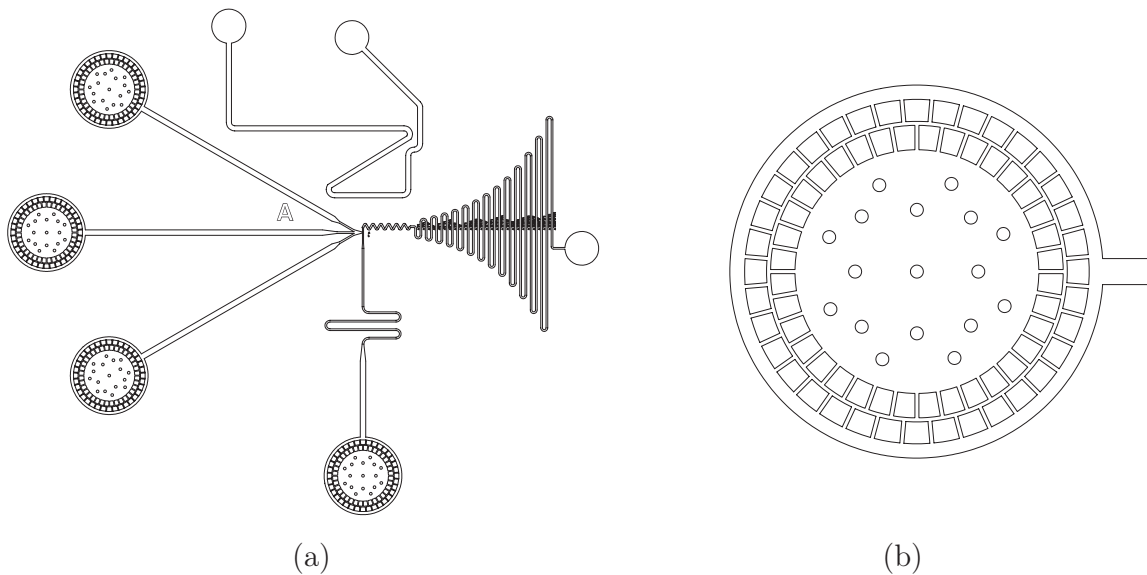


FIGURE 3.8 – Dessins AutoCAD : (a) Vue d’ensemble d’un dessin de dispositif. Les trois entrées destinées aux solutions aqueuses se situent à gauche. L’entrée d’huile se trouve en bas. La sortie est située à droite. (b) Zoom sur une entrée : un filtre composé de plots, espacés d’une distance inférieure à la largeur des canaux, permet d’éviter le bouchage de ces derniers.

Le dispositif, représenté figure 3.8, comporte une entrée d’huile, trois entrées aqueuses et une sortie [35]. Des filtres dessinés après chaque entrée permettent d’éviter que les canaux ne se bouchent en cas de particules de PDMS non évacuées ou autre impureté, voir figure 3.8 (b). Les trois entrées aqueuses sont utilisées pour injecter un réactif A et un réactif B de part et d’autre de l’entrée centrale, destinée au solvant. Elle sert à séparer les réactifs avant la formation des gouttes, afin d’obtenir un *temps zéro* de réaction bien défini. Après le canal de mélange, un canal oscillant sur une période plus longue permet de suivre la relaxation du mélange réactionnel au cours du temps.

Une fois les dessins imprimés sur un film plastique transparent (masque souple), l’étape de photolithographie, voir figure 3.9, est réalisée en salle blanche. Sur un substrat de sili-



FIGURE 3.9 – Schéma illustrant l'étape de photolithographie. La résine déposée sur substrat de silicium est insolée à travers un masque souple. Elle réticule et devient insensible au révélateur.

cium, une résine photosensible (SU8, MicroChem) est déposée puis étalée par force centrifuge (*spin-coating*) pour obtenir une couche plane et homogène. La hauteur de résine fixe la profondeur des microcanaux. Quant à la largeur des canaux, elle est définie directement par le dessin du masque. Après chauffage de la résine, elle est exposée aux ultra-violet à travers le masque. Sur le masque, le motif des canaux est dessiné en négatif, car la résine est dite négative : l'insolation déclenche sa polymérisation et elle devient ainsi insensible au révélateur, donc reste sur le substrat. Puis, la plaque est plongée dans le révélateur. Après révélation, la plaque est chauffée à plus de 150 °C pendant quelques heures pour consolider la liaison résine-substrat.

Après avoir réalisé le patron, ce dernier est disposé au fond d'une boîte de Petri. Du PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) liquide est coulé sur le patron. Le PDMS se solidifie par réticulation mais conserve néanmoins son élasticité. Le PDMS solide réplique le patron avec une fidélité excellente : jusqu'à l'échelle nanométrique [94].

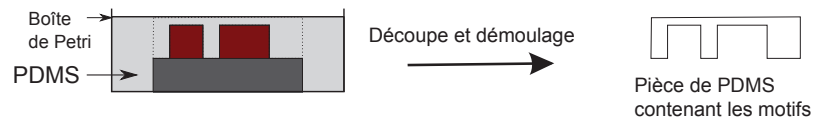


FIGURE 3.10 – Schéma illustrant l'étape de moulage du PDMS : ce dernier est moulé sur le patron réalisé au préalable. La fidélité de la reproduction est connue pour être excellente : jusqu'à l'échelle nanométrique [94].

Un fois le PDMS préparé, il est découpé autour de la région d'intérêt, comme représenté sur la figure 3.10. Les entrées et sortie sont ensuite percées. Le morceau de PDMS est scellé à une lamelle en verre par activation plasma (Plasma cleaner Femto, diener electronic). L'activation plasma a pour effet d'arracher des électrons aux deux surfaces. Ainsi, lorsqu'elles sont jointes, des liaisons covalentes sont formées et le processus est irréversible, dans le sens où l'une des deux parties doit être détruite pour effectuer une séparation.

Lors d'une expérience de production de gouttes d'eau dans l'huile, il est indispensable que les microcanaux soient hydrophobes. Ainsi, l'huile perfluorée mouille préférentielle-

ment les parois et entoure les compartiments aqueux. L'activation plasma a pour effet de rendre les surfaces hydrophiles. Il faut donc traiter les microcanaux pour les rendre à nouveau hydrophobes. Pour ce faire, un mélange à base de silane est injecté dans les canaux (voir annexe C.1), puis expulsé.

3.4 Mise en œuvre expérimentale

Dans cette section seront présentés le matériel et les méthodes employés afin de produire de gouttes d'eau dans l'huile. Différentes expériences visant à caractériser le fonctionnement des dispositifs microfluidiques, la vitesse des gouttes et le mélange qui s'y effectue seront exposées.

3.4.1 Montage

Les débits dans les canaux sont contrôlés par trois pousse-seringue, comme présenté sur la figure 3.11 : un pour l'huile, un pour les deux réactifs et un pour le flux central (solvant).

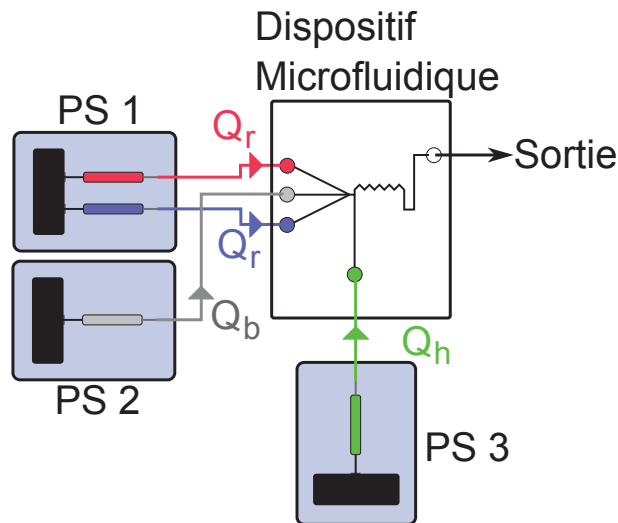


FIGURE 3.11 – Schéma illustrant une expérience de microfluidique : un pousse-seringue (PS 1) est utilisé pour les deux réactifs, délivrant chacun un débit Q_r . Un deuxième pousse-seringue (PS 2) est utilisé pour le flux du milieu contenant la solution tampon, imposant un débit Q_b . Enfin, le pousse-seringue PS 3 est utilisé pour l'huile et injecte un débit Q_h . Les fluides sont récoltés dans un tube à la sortie.

3.4.2 Production des gouttes d'eau dans l'huile

Les pousse-seringue sont pilotés par ordinateur à l'aide d'un programme LabVIEW. Ce dernier calcule le débit total Q à imposer à l'entrée du DMF à partir de la section des microcanaux S et de la vitesse souhaitée U , selon la relation $Q = U \times S$. En outre, lorsque l'on produit des gouttes d'eau dans l'huile, la proportion d'eau par rapport à l'huile que nous appellerons WF (*Water Fraction*, "fraction d'eau" [35]) est définie comme

$$WF = \frac{Q_e}{Q} = \frac{V_e}{V} \quad (3.18)$$

où $Q = Q_e + Q_h$ est le débit total, Q_e et Q_h les débits respectifs d'eau et d'huile ; V_e et V sont le volume d'eau et le volume total.

Lors des expériences de microfluidique, il peut également être intéressant de définir un autre paramètre : la quantité de flux séparateur dans l'entrée du milieu ("buffer" ou tampon, voir section 3.2.1), que nous appellerons BF (*Buffer Fraction*, fraction de tampon). Ceci peut permettre de faire varier la concentration en réactifs au sein des gouttes. BF est défini comme

$$BF = \frac{Q_b}{Q_e} = \frac{V_b}{V_e} \quad (3.19)$$

où $Q_e = Q_b + 2Q_r$: nous utilisons un pousse-seringue pour le buffer, un autre pour les deux seringues de réactifs ; Q_b et Q_r sont respectivement le débit de buffer et celui des réactifs. On a donc

$$Q = Q_e + Q_h = Q_b + 2Q_r + Q_h \quad (3.20)$$

pour l'expression du débit total. Si l'on souhaite utiliser un pousse-seringue pour l'huile, un pour les réactifs et un pour le buffer, on souhaite obtenir le débit à envoyer à chacun, soit Q_h , Q_r et Q_b . On résout un système d'équations dont le résultat est le suivant :

$$\begin{cases} Q_h = (1 - WF) \times U \times S \\ Q_b = WF \times BF \times U \times S \\ Q_r = WF \times \frac{1-BF}{2} \times U \times S \end{cases}$$

Nous avons intégré le calcul au programme LabVIEW afin de n'avoir besoin que de lui renseigner WF , BF , U et S . Comme nous utilisons un pousse-seringue pour les deux seringues de réactifs, on a $Q_e = 2Q_r + Q_b$.

Si l'on souhaite produire des gouttes à $WF = 0.5$, $BF = 1/3$ et de vitesse 50 mm/s dans un DMF de $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$, on doit avoir un débit de réactifs de $1.875 \mu\text{L}/\text{min}$. Pour une expérience telle que celle présentée au chapitre 4 durant environ deux heures, on consomme donc $225 \mu\text{L}$.

Nous avons adopté une procédure afin de démarrer la production des gouttes dans de bonnes conditions. Il peut arriver que l'huile s'infilte dans les entrées destinées aux solutions aqueuses, ce qui peut provoquer des instabilités au niveau de la jonction. C'est pourquoi le tuyau contenant l'huile est toujours branché avant celui des solutions aqueuses. De plus, le paramètre WF est réglé au maximum (1) en début d'expérience, puis augmenté progressivement à la valeur souhaitée.

3.4.3 Imagerie

Un montage optique d'imagerie en champ large, de type microscope, permet d'imager les dispositifs montés sur une platine de translation. Un panneau de diodes générant de la lumière blanche et uniforme (diodes électroluminescentes (LED), Phlox SA) éclaire le DMF placé sur une platine de translation. Un objectif de microscope $10\times$, de focale 20 mm (Mitutoyo) est placé en regard d'un objectif photographique de focale 50 mm (Senko), fixé à une caméra CCD (C8484, Hamamatsu). La mise au point est effectuée en ajustant la position longitudinale du DMF grâce à la platine de translation.

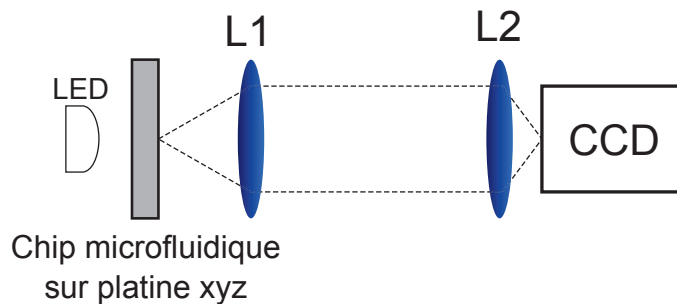


FIGURE 3.12 – Schéma du dispositif optique d'imagerie. Un panneau de diodes électroluminescentes produit un éclairage de lumière blanche homogène. Un objectif de microscope, représenté par la lentille L1, et un objectif représenté par la lentille L2, fixé à une caméra CCD, permettent d'imager les canaux microfluidiques. Un exemple de photographie est représenté sur la figure 3.13.

Une expérience consistant à diluer une solution de permanganate de potassium (KMnO_4), un colorant absorbant, a été réalisée afin d'observer le mélange au sein des gouttes. Comme la profondeur des canaux est de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, la solution de KMnO_4 doit être très concentrée pour obtenir une épaisseur optique suffisante pour l'observation d'une forte absorption. Ainsi la concentration de la solution de KMnO_4 est de 400 mmole/L. La figure 3.13 représente une photographie d'un dispositif dans lequel une entrée de KMnO_4 est mélangée à deux entrées d'eau. Les gouttelettes se forment et le mélange peut être qualitativement observé.

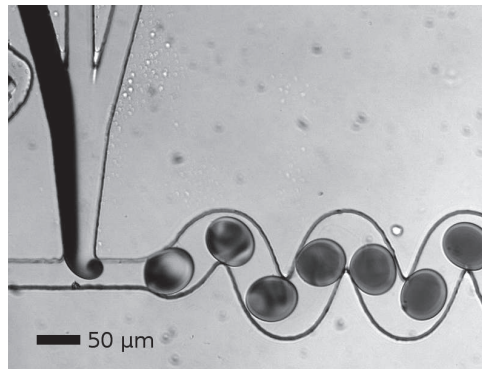


FIGURE 3.13 – Expérience de microfluidique : dilution d’une solution de KMnO_4 à 400 mM. On observe qu’après cinq virages, la solution à l’intérieur de la goutte semble homogène. Temps d’exposition : 10 microsecondes.

Il est important de mesurer quantitativement le temps de mélange : c’est ce que permet l’expérience décrite dans la section 3.5.

3.4.4 Mesure de la vitesse

Afin de relier la distance de parcours des gouttes au temps de réaction, il est important de connaître la vitesse de l’écoulement. Elle peut être obtenue en divisant le débit total des fluides injectés par la section des canaux. Cependant, la hauteur des canaux, fixée par la hauteur de résine déposée pendant l’étape de photolithographie, n’est pas toujours connue précisément. En effet, lors du dépôt, du *spin-coat* et du recuit de la résine (voir section 3.3), son épaisseur peut fluctuer de quelques micromètres.

Une méthode de mesure de la vitesse consiste à mesurer la distance parcourue par les gouttes en un espace de temps connu. Pour ce faire, on associe au panneau de LED, connecté à un contrôleur (Gardasoft Vision), un générateur de fonctions (DS340, Stanford Research Systems) et la caméra CCD. Le générateur de fonctions délivre au panneau de LED deux signaux TTL séparés d’un temps bien connu Δt . Ces deux impulsions de 10 μs sont contenues dans un autre signal plus long, déclenchant la caméra CCD (voir schéma de la figure 3.14). Le générateur de fonctions et le panneau de LED peuvent être pilotés par LabVIEW pour pouvoir contrôler l’intervalle Δt .

Ainsi, il est possible d’effectuer des acquisitions où on observe des images de gouttes doubles, voir figure 3.14b, chacune étant séparée d’une certaine distance, que l’on mesure. La vitesse est obtenue en divisant ensuite Δl par Δt .

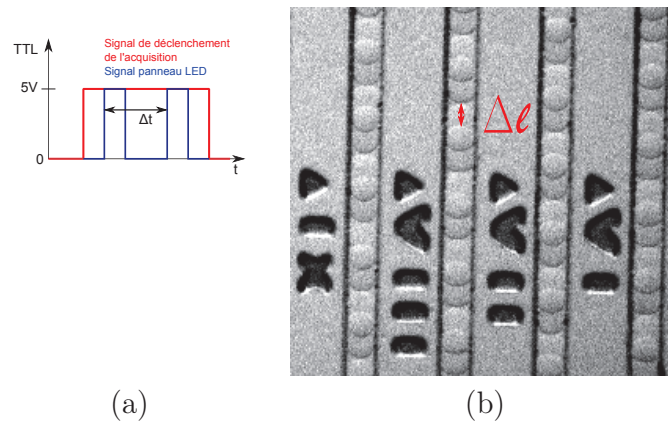


FIGURE 3.14 – (a) Signaux TTL envoyés par le générateur de fonctions : le signal bleu est généré par LabVIEW, le signal rouge est la synchronisation envoyée à la caméra. (b) Exemple de photographie enregistrée pour mesurer la vitesse d'écoulement. Les gouttes se sont déplacées de Δl pendant Δt .

3.4.5 Mesure de fluorescence résolue en temps

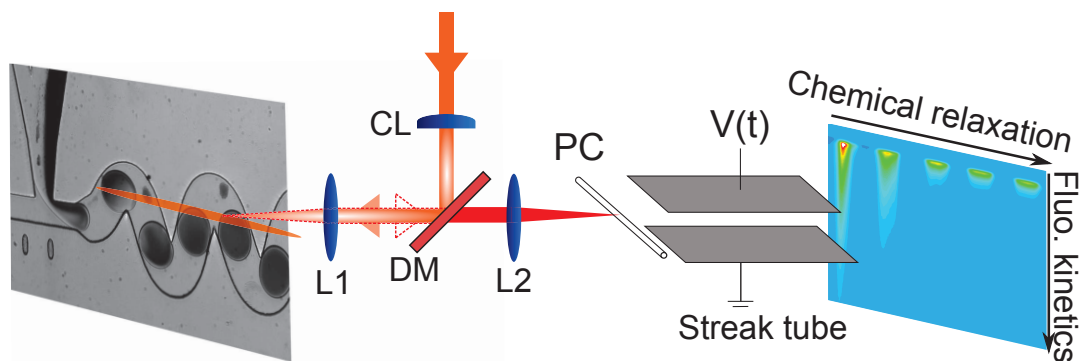


FIGURE 3.15 – Schéma du dispositif expérimental : un faisceau d'excitation laser (représenté en couleur orange) passe à travers une lentille cylindrique (CL) et est envoyé sur un miroir dichroïque (DM), réfléchissant les photons vers le dispositif microfluidique. L'image des intersections entre la lumière et les canaux est assurée par le couple de lentilles L1 et L2. La photographie des canaux contenant du KMnO_4 (voir partie 3.4.3) est obtenue par caméra CCD, temps d'exposition $10 \mu\text{s}$. Une mesure par CBF est représentée à droite : les canaux sont imagés sur la photocathode.

La mesure de fluorescence résolue en temps au sein des canaux microfluidiques a été

3.4. Mise en œuvre expérimentale

implémentée de la façon suivante. Une lentille cylindrique produit un faisceau laser horizontal, qui excite la fluorescence des micro-réacteurs. Un miroir dichroïque permet de séparer la longueur d'onde d'excitation de la longueur d'onde de fluorescence. Chaque intersection des canaux avec le laser résulte en un point fluorescent imagé sur la photocathode linéaire d'une caméra à la balayage de fente (CBF). Le schéma expérimental est représenté sur la figure 3.15. L'excitation lumineuse est réalisée par des impulsions sub-picosecondes générées grâce un laser Tangerine (Amplitude) opérant à 50 kHz. La puissance est réglée en fonction du besoin jusqu'à 5 mW maximum.

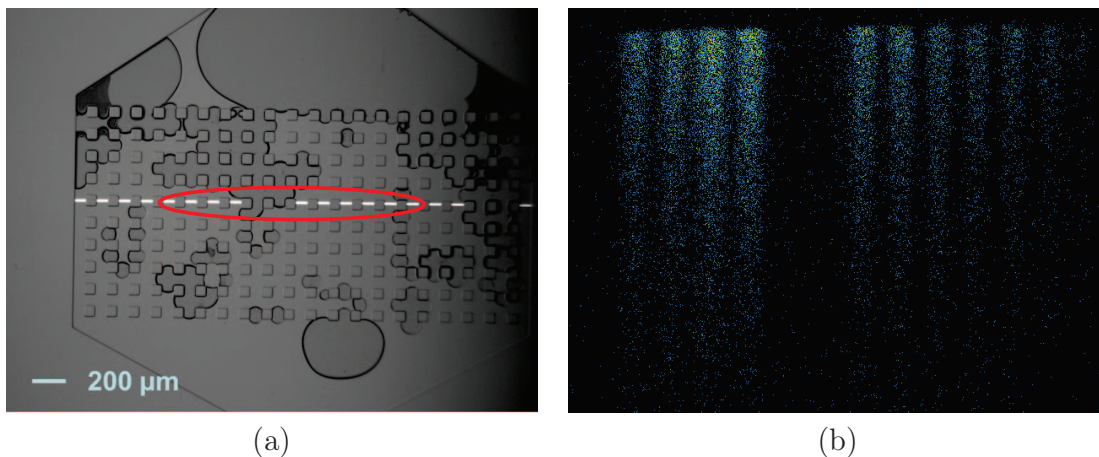


FIGURE 3.16 – (a) Photographie d'un filtre microfluidique contenant une solution de 290 μM de calcéine, analogue à la fluorescéine. On observe la fluorescence créée par la ligne laser, temps d'exposition : 100 ms. Il est possible d'imager 12 à 13 interstices entre les plots du filtre sur la photocathode de la caméra à balayage de fente (b). La dimension verticale est l'axe du temps, calibre 20 ns. L'image est obtenue en mode comptage de photons, exposition 60 secondes. On observe une région sans signal, que l'on voit également sur la photographie (a), entre les points correspondant à la partie du filtre où la solution n'a pas circulé. Ceci permet d'identifier qu'il s'agit de la région entourée en rouge sur la photo qu'on image sur la photocathode de la caméra à balayage de fente.

La figure 3.16a représente la photographie de la ligne laser excitant un fluorophore situé dans un filtre microfluidique. La mesure de fluorescence résolue en temps par CBF est présentée fig. 3.16b. On observe la zone entourée en rouge de la fig. 3.16a sur la fig. 3.16b.

3.5 Mesure du temps de mélange par quenching dynamique de fluorescence

L'observation qualitative permet d'estimer approximativement de quelle longueur de propagation la goutte a besoin pour avoir ses constituants mélangés, mais ne permet pas de déterminer précisément une valeur de temps de mélange. Afin de mesurer le temps de mélange, il est intéressant d'utiliser la caractéristique du quenching dynamique de la fluorescéine par les ions I^- . La vitesse à laquelle ce dernier s'effectue dépend uniquement de la diffusion de l'espèce inhibant la fluorescence du fluorophore. Elle ne dépend pas d'une éventuelle cinétique chimique. Ainsi, le temps de quenching dynamique détermine le temps de mélange.

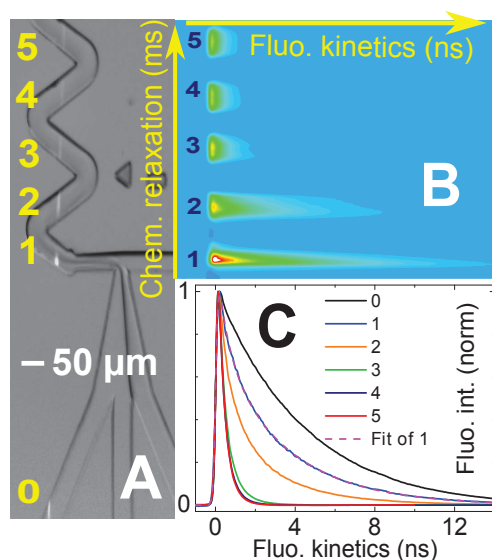


FIGURE 3.17 – Mesure du temps de mélange : la fluorescéine ($100 \mu\text{M}$ dans PBS) est mélangée à une solution d'iodure de potassium (1 M dans eau distillée). **A** : photographie du dispositif et du canal de mélange. La solution concentrée d'iodure de potassium présente un indice de réfraction différent de celui de l'eau, expliquant son apparence particulière (canal de droite). Le temps d'exposition de 20 ms permet d'observer la fluorescence mais pas de distinguer des gouttes individuelles. **B** : Mesure par CBF : la dimension horizontale de l'image représente l'axe temporel de la mesure de fluorescence résolue en temps (20 ns) alors que la dimension verticale rend compte de la position dans les canaux et donc du temps de parcours des gouttes. **C** : Cinétiques de fluorescence des traces 0 (fluorescéine) à 5 (fluorescence minimale). La trace 1 est ajustée par une fonction bi-exponentielle (trait pointillé rose).

3.5. Mesure du temps de mélange par quenching dynamique de fluorescence

Nous avons réalisé le mélange de la fluorescéine ($300 \mu\text{M}$, solvant PBS, $\text{pH} = 7.4$) avec les ions I^- (3 M d'iodure de potassium dans l'eau) dans différents dispositifs microfluidiques et mesuré la fluorescence résolue en temps le long du canal de mélange. La concentration finale dans les gouttes est de $100 \mu\text{M}$ de fluorescéine et 1 M en ions I^- . Cette association fluorophore/quencher a été utilisée dans la référence [95] afin de caractériser des temps de mélanges de quelques dizaines de microsecondes dans des dispositifs différents.

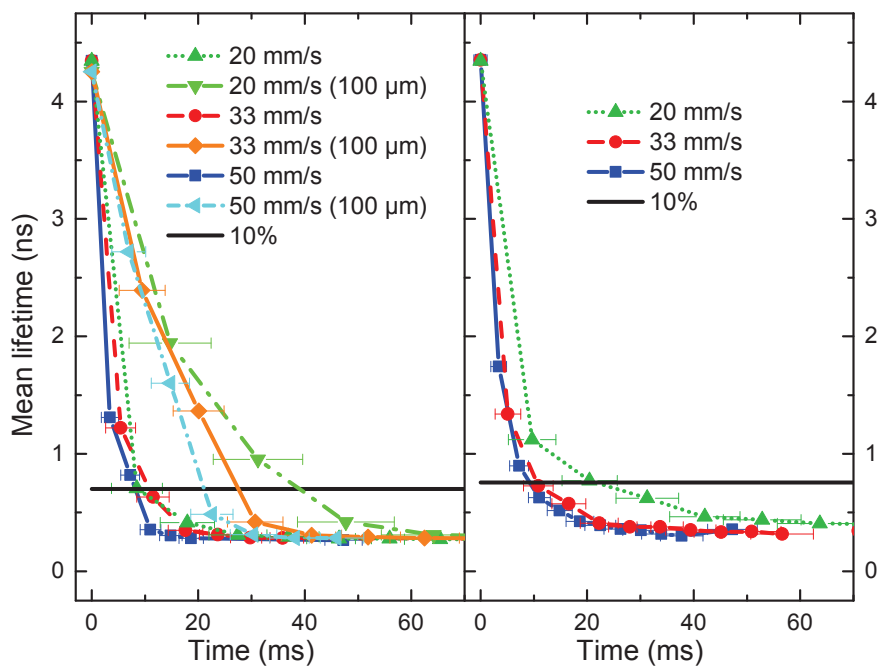


FIGURE 3.18 – Temps de vie moyen $\langle \tau \rangle$ en fonction du temps de parcours des gouttes dans le canal de mélange. La ligne noire représente 10 % de la valeur finale de $\langle \tau \rangle$ (équation (3.21)). Gauche : expérience dans des dispositifs de section $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ (points bleus, rouges et verts) et $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ (points bleu clair, orange et vert clair). Droite : expérience dans des dispositifs de section $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ où la fluorescéine est préalablement mélangée à $300 \mu\text{M}$ d'albumine sérique bovine (BSA). On remarque que les 10 % en présence de BSA sont légèrement plus élevés en raison de la durée de vie plus élevée du mélange final.

Dans cette expérience, la fluorescence est excitée dans le canal de mélange, voir figure 3.15. La longueur d'onde du laser est réglée à 515 nm , seconde harmonique du laser

Tangerine. La figure 3.15 présente à droite un exemple de mesure obtenue par CBF.

La durée de vie de fluorescence (DVF) de la fluorescéine à $\text{pH} = 7.4$ est de $\tau_0 = 4.1$ ns, comme montré dans le chapitre précédent (figure 2.10). La DVF du mélange fluorescéine- I^- est de $\tau_f = 276 \pm 14$ ps. L'équation de Stern-Volmer (2.38) prévoit un temps de 295 ± 6 ps pour une constante de Stern-Volmer estimée expérimentalement à $12.9 \pm 0.7 \text{ M}^{-1}$ au chapitre 2 (fig. 2.4). Dans une partie de l'expérience, la fluorescéine est mélangée à une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) concentrée à $300 \mu\text{M}$. En présence de BSA, ce temps est plus élevé, 350 ps en moyenne, dû à la viscosité plus importante et donc une diffusion des ions moins efficace [96]. La figure 3.17 montre un exemple de mesure avec un ajustement bi-exponentiel. Le temps de mélange est défini comme le temps nécessaire à réduire la DVF initiale à 10% de la DVF finale, soit

$$\langle \tau \rangle(t_{\text{mix}}) = \tau_f + 10\%(\tau_0 - \tau_f). \quad (3.21)$$

La figure 3.18 présente l'évolution de la durée de vie moyenne $\langle \tau \rangle$ de fluorescence défini au chapitre 2 : $\langle \tau \rangle = \sum_i A_i \tau_i / \sum_i A_i$. L'incertitude sur le temps de parcours Δt est donnée par l'incertitude relative sur la mesure de vitesse ΔU et par la longueur de la goutte l :

$$\Delta t = t \frac{\Delta U}{U} + \frac{l}{U} \quad (3.22)$$

Cette incertitude sur le temps de parcours des gouttes sert ensuite à déterminer l'incertitude sur le temps de mélange, représentée sur la figure 3.19.

La figure 3.19 compare le temps de mélange mesuré T_{mix} à la loi d'échelle proposée par l'équipe de R. F. Ismagilov [78] et mentionnée dans la partie 3.2.2, équation (3.17) : $t \sim aw/U \log(wU/D)$ où aw est la longueur de la goutte, U sa vitesse et D le coefficient de diffusion. Le coefficient de diffusion est calculé grâce à la formule de Stokes-Einstein et vaut environ $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ pour les ions I^- . On constate qu'à vitesses égales, le temps de mélange est plus important lorsque l'albumine est présente en solution, probablement à cause d'une viscosité plus importante. Une régression linéaire passant par zéro est représentée. Cette dernière peut être extrapolée afin de prédire le temps de mélange pour des vitesses plus élevées. Dans le chapitre suivant, la figure 2 de l'article présenté montre qu'à 165 mm/s , on s'attend à un temps de mélange d'environ 3 ms. L'abscisse des points (cercles rouges) rendant compte du temps de mélange en présence de BSA a été calculée en prenant le même coefficient de diffusion. Dans ce cas, les temps de mélange mesurés sont plus élevés, or la loi d'échelle semble prédire correctement le temps de mélange. Ceci peut être expliqué par le fait que la taille des gouttes est plus faible lorsque la protéine s'y trouve (voir section 3.2).

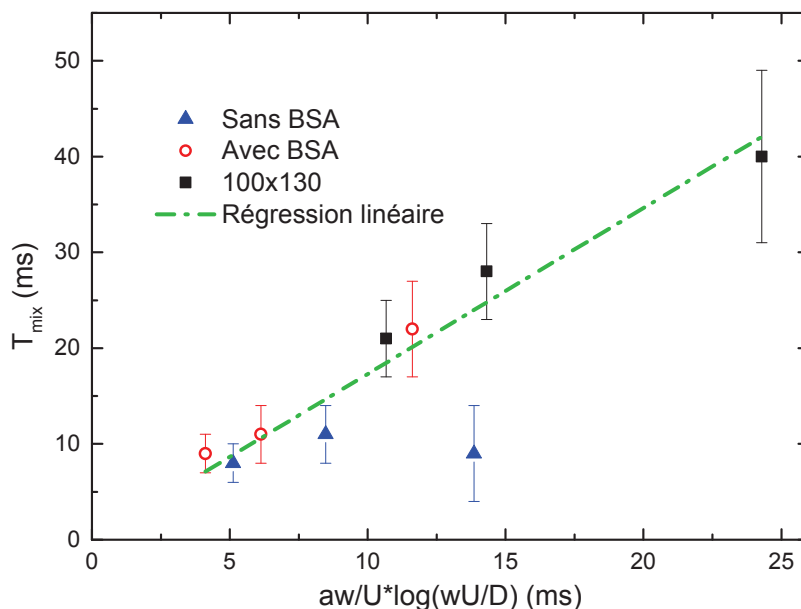


FIGURE 3.19 – Temps de mélange pour différentes sections : $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ sans albumine (BSA), triangles bleus, et avec BSA, cercles rouges ; $100 \mu\text{m} \times \sim 130 \mu\text{m}$ sans BSA, carrés noirs. Plusieurs vitesses d'écoulement ont été utilisées. Les résultats sont comparés à la loi d'échelle $t \sim aw/U \log(wU/D)$ [78] mentionnée partie 3.2.2. Une droite de régression linéaire passant par 0 est représentée en trait mixte, en vert. Le coefficient directeur est de 2.5 environ.

3.6 Conclusion

L'outil microfluidique permet de réaliser un mélange rapide de réactifs hors d'équilibre dans des gouttes d'une centaine de picolitres. Nous avons fabriqué des dispositifs microfluidiques fonctionnels et y avons caractérisé les écoulements en imageant la production de gouttes et le mélange, ainsi qu'en mesurant la vitesse des gouttes et le temps de mélange s'y effectuant grâce à des approches expérimentales originales. Selon les conditions, des temps de mélange inférieurs à 10 millisecondes ont été mesurés.

Par ailleurs, nous avons remarqué que l'utilisation de pousse-seringue afin de faire circuler les fluides pouvaient entraîner des instabilités (passagères) dans les écoulements, comme mentionné dans l'article [81]. Ceci est dû au moteur pas-à-pas entraînant la vis

sans fin et faisant bouger par à-coups le chariot poussant les pistons des seringues. Nous avons expérimenté l'utilisation de dispositifs contrôlant la pression (société Elveflow) : il est possible qu'ils permettent d'obtenir des écoulement bien plus stables. Nous avons observé que grâce à cet appareil, l'écoulement démarrait et s'arrêtait instantanément, ce qui n'est pas le cas lorsque nous utilisons des pousse-seringue. Les expériences le montrant ont été réalisées pendant la rédaction de ce manuscrit et ne seront donc pas montrées ici.

L'association de la technique de microfluidique avec la mesure de fluorescence résolue en temps grâce à l'utilisation d'une ligne laser et d'une caméra à balayage de fente a permis de mesurer le temps de mélange au sein de gouttes. Le chapitre suivant décrit l'utilisation de cette technologie pour mesurer une cinétique bi-moléculaire le long du canal de relaxation, situé après le canal de mélange.

Chapitre 4

Mesure d'une cinétique bi-moléculaire

Afin de mesurer une cinétique bio-moléculaire d'intérêt, comme par exemple la réaction suivie par FRET de complexation d'une protéine avec un brin d'ADN [97] (voir chapitre 5), il était nécessaire de valider la preuve de concept consistant en l'association de la microfluidique avec la mesure de fluorescence résolue en temps. L'utilisation d'un complexe colorant-protéine, composé du Patent Blue Violet (PBV) et de la protéine d'albumine sérique bovine (BSA), a permis d'y parvenir. Cette expérience a donné lieu à un article venant d'être soumis [45], inclus à la fin de ce chapitre. Je présenterai succinctement le choix du système bi-moléculaire utilisé et les résultats préliminaires de spectroscopie statique et d'étude cinétique par *stopped-flow*. Je détaillerai également le traitement et la correction des données consistant en la soustraction du fond et le redressement de l'intensité par la mesure de la fonction de transfert optique. Cette expérience montre que des informations sur la structure et la dynamique du système modèle PBV-BSA hors équilibre peuvent être obtenues grâce à une analyse globale des mesures de fluorescence résolue en temps.

4.1 Choix du système utilisé

Les molécules d'intérêt biologique étant généralement disponibles en faible quantité car difficile à extraire ou à produire (donc à coût en général assez élevé), la réaction test devait inclure des molécules :

- dont la fluorescence une fois le complexe formé change de façon significative ;
- dont la cinétique de complexation est plus lente que les temps de mélange typiques facilement réalisables dans les dispositifs microfluidiques (5 à 20 ms) et plus rapide que le temps de vie d'une goutte (1 à 10 s) ;
- dont l'absorption et l'émission sont compatibles avec les contraintes expérimentales (longueurs d'onde dans le domaine visible) ;

- solubles dans l'eau ;
- peu chères, de façon à avoir un stock conséquent pour multiplier les expérimentations.

La recherche d'un système remplissant ces conditions a pris un temps non négligeable de mon travail de thèse. Plusieurs systèmes ont été envisagés, puis abandonnés car ne remplissant pas les conditions citées ci-dessus. Nous avons assez tôt trouvé que les systèmes albumine sérique – colorant pouvaient être de bons candidats car la complexation augmente en général le rendement de fluorescence du colorant. Cependant, l'utilisation de la bilirubine [98] ou de la curcumine [99] se sont révélées difficiles car ces deux dernières molécules sont peu solubles dans l'eau et on des affinités avec les polymères. Finalement, nous avons choisi l'association du colorant appelé Patent Blue Violet (PBV) avec la *Bovine Serum Albumine*, albumine de sérum bovin (BSA). La molécule de PBV est un colorant de type triarylméthane, utilisé notamment pour localiser les ganglions sentinelles, en particulier pour le diagnostic du cancer du sein [100, 101].

4.2 Résultats préliminaires

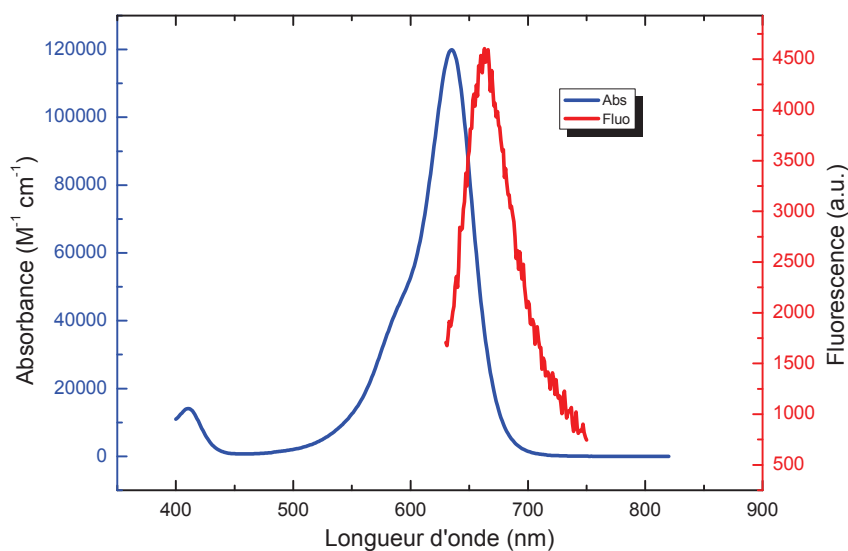


FIGURE 4.1 – Spectres d'absorbance et de fluorescence statiques de la molécule de PBV.

4.2. Résultats préliminaires

Les spectres d'absorption et de fluorescence de la molécule de PBV dissoute dans la solution tampon PBS sont présentés figure 4.1. Le coefficient d'extinction molaire est de $1.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et le rendement quantique de fluorescence, très faible, est de $5 \cdot 10^{-4}$ [101].

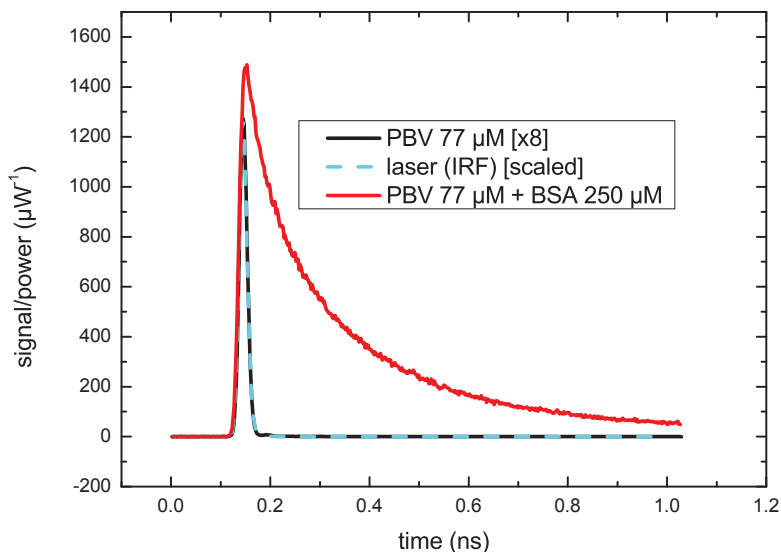


FIGURE 4.2 – Mesures de fluorescence résolue en temps par CBF. Les solutions sont situées dans une cuvette à recirculation. La trace noire est la fluorescence non résolue du PBV ; elle se superpose à la mesure d'IRF réalisée en mesurant le signal provenant du laser (trace bleu clair en pointillés, mise à l'échelle du signal de PBV). Le complexe PBV-BSA, en rouge, présente une durée de vie de fluorescence supérieure à celle de PBV seul, et dont la plupart des composantes sont résolues.

La fluorescence résolue en temps a été mesurée en cuvette avec la caméra à balayage de fente (CBF), figure 4.2. Le signal du colorant seul, concentré à $77 \mu\text{M}$, est représenté en noir. On constate que son signal se superpose avec celui du laser, représentant la mesure de la fonction de réponse instrumentale (IRF) car l'impulsion laser sub-picoseconde est de durée très inférieure à la résolution de la CBF ($\sim 10 \text{ ps}$). La fluorescence du PBV n'est donc pas résolue par la CBF. En présence de la BSA à une concentration de $250 \mu\text{M}$, la durée de vie de fluorescence augmente : trace rouge.

Afin de connaître la cinétique de relaxation du complexe PBV-BSA, nous avons effectué des mesures dans un appareil de *stopped-flow* (SF) grâce à Christian Boudier, chercheur à la faculté de pharmacie d'Illkirch [30, 102]. L'appareil de SF mesure l'évolution de

l'intensité de fluorescence du complexe, après un mélange rapide : temps mort d'environ 2 ms. La figure 4.3 présente des cinétiques de relaxation pour différentes concentrations en PBV et BSA. Ces cinétiques sont normalisées : la moyenne aux temps longs est ramenée à 1. On constate que plus le rapport des concentrations $[BSA]/[PBV]$ est important, plus la cinétique est rapide. Par ailleurs, plus ce rapport est important, plus le début de la cinétique est rapide et par conséquent non observable par l'appareil de *stopped-flow*.

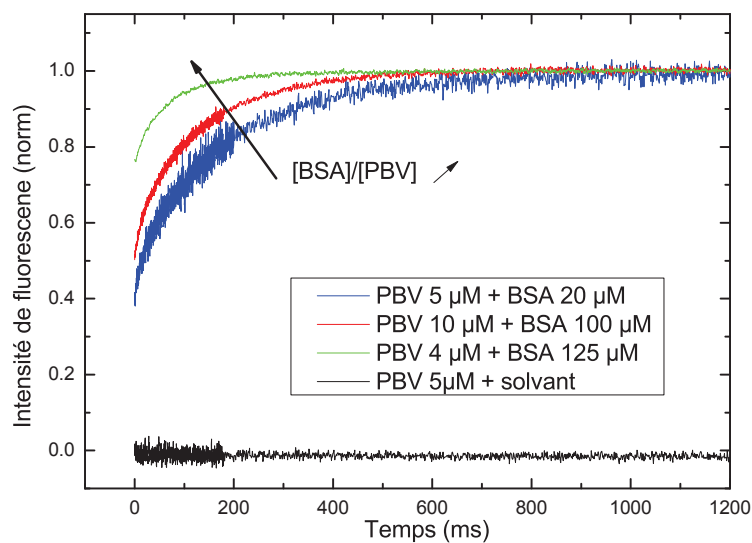


FIGURE 4.3 – Expériences de *stopped-flow* (SF) : les cinétiques sont normalisées. La solution de PBV seule est représentée en noir. On constate que l'appareil de SF ne permet pas de mesurer sa fluorescence. Le rapport des concentrations $[BSA]/[PBV]$ augmente de la courbe bleue (4) à la courbe verte (31), en passant par la rouge (10). On remarque que plus la cinétique est rapide, moins on résout son départ correctement. Pour la courbe rouge, l'intensité est de moitié celle du maximum dès le début de la cinétique.

Ces résultats préliminaires confirment que le système PBV-BSA est un bon candidat pour mesurer une cinétique de relaxation bio-moléculaire dans les dispositifs microfluidiques. L'inconvénient majeur est que la fluorescence du colorant PBV a une fluorescence ultra-courte, comme présenté sur la figure 4.2. Nous verrons dans la partie 4.3 que cette propriété implique de devoir mesurer l'évolution de l'intensité de fluorescence en plus de sa dynamique résolue en temps.

4.3 Cinétique bi-moléculaire mesurée par fluorescence résolue en temps

Cette partie a fait l'objet d'un article [45], présenté en fin de chapitre. Le principe ainsi que des précisions sur la façon de traiter les données, non mentionnées dans l'article, sont décrits ci-dessous.

Le dispositif expérimental utilisé est exactement le même que celui décrit à la fin du chapitre 3.5. La différence est que le système laser est associé à un amplificateur paramétrique optique, permettant de régler la longueur d'onde à 600 nm. Nous produisons des gouttes dont la concentration finale en Patent Blue (PBV) est égale à 10 μM et celle de BSA égale à 100 μM . Le solvant est le PBS. La figure 1 de l'article décrit le schéma expérimental. La ligne laser intersecte les micro-canaux en divers endroits et le contenu des micro-gouttes émet une fluorescence, imagée sur la photocathode de la caméra à balayage de fente (CBF). La CBF est utilisée en mode "analog integration" et nous effectuons des acquisitions de 300 secondes. Nous avons enregistré le signal sur les calibres temporels 1 ns et 5 ns afin de résoudre la partie la plus courte des déclinés et également obtenir leur comportement asymptotique. Pour échantillonner efficacement la cinétique de relaxation, nous avons utilisé trois vitesses différentes : 55, 110 and 165 mm/s. Le dispositif est décalé dans le champ de vue de la CBF afin d'obtenir la cinétique de relaxation du complexe PBV-BSA sur l'intégralité du parcours des gouttes. Nous avons obtenu 40 mesures de fluorescence résolue en temps, sur lesquelles nous avons effectué une analyse globale.

4.3.1 Traitement des données

La figure 4.4 présente le profil d'intensité obtenu pour une solution fluorescente composée du complexe PBV – BSA à l'équilibre, recueilli à la sortie du dispositif microfluidique et ré-injecté dans les canaux. On observe que l'intensité du signal est plus importante au centre de l'image que sur les bords. Il faut donc corriger les données en prenant en compte la fonction de transfert optique, qui n'est donc pas plate. Préalablement, une étape de soustraction du fond est effectuée. En effet, les photons rétro-diffusés provenant de l'excitation laser et de la fluorescence résiduelle du PDMS contribuent au signal de fond. L'intensité du signal de fond et sa forme temporelle ont été mesurées entre les images des canaux, puis soustraits au signal brut. Pour ce faire, j'ai créé un programme Scilab effectuant le traitement des données. La figure 4.4 illustre la correction du fond.

Le procédé est le suivant : la matrice des données brutes est lue, puis sommée suivant les colonnes. Le profil d'intensité est alors obtenu. La limite entre le signal de fluorescence et de fond est définie *à la main* : chaque clic détermine un point du profil dont on enregistre l'abscisse. Ces points sont ensuite interpolés sur la longueur totale du profil, puis un ajustement polynomial de cette interpolation est effectué. Le signal temporel moyen entre

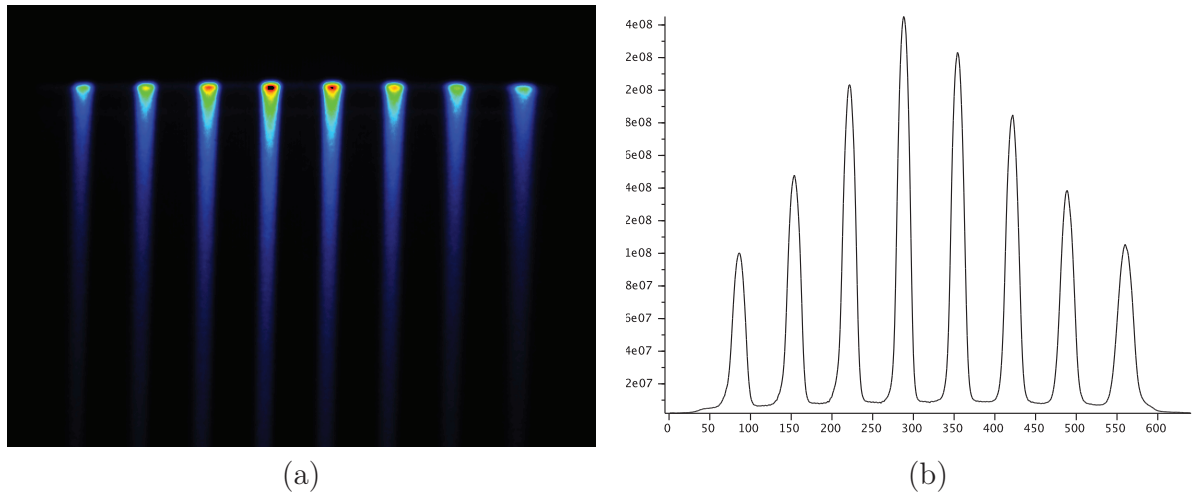


FIGURE 4.4 – (a) Mesure par caméra à balayage de fente d'un signal provenant d'une solution de complexe PBV-BSA à l'équilibre, calibre 1 ns. (b) Profil de l'intensité en fonction de la position : on constate que l'intensité est plus forte au centre que sur les bords de l'image, or le signal est censé provenir d'une solution émettant de la même façon quelle que soit sa position. On observe ici l'effet de la fonction de transfert optique du dispositif expérimental.

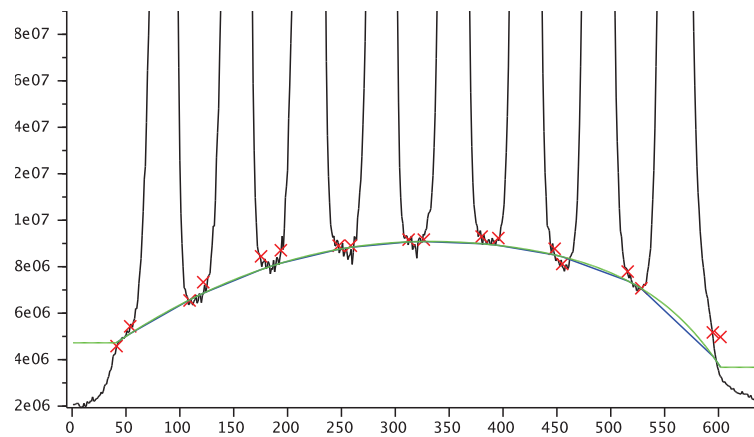


FIGURE 4.5 – Figure 4.4 zoomée pour illustrer la correction du fond par Scilab. La séparation du signal par rapport au fond est déterminée à la main (croix rouges). L'interpolation des données situées strictement entre les croix rouges est représenté en bleu. L'ajustement polynomial de l'interpolation entre les points est tracé en vert.

4.3. Cinétique bi-moléculaire mesurée par fluorescence résolue en temps

les mesures est également enregistré. La multiplication du vecteur issu de l'interpolation représentant la ligne de base par le signal temporel moyen constitue une matrice de fond, qui est soustraite à la matrice des données brutes.

Afin de comparer non seulement la cinétique des mesures de fluorescence entre elles mais également leur intensité, il est nécessaire de corriger la fonction de transfert optique. Le complexe à l'équilibre émet le même signal de fluorescence dans tous les canaux, nous permettant de mesurer le profil d'intensité de la fonction de transfert optique afin de corriger les données, voir figures 4.4 et 4.6.

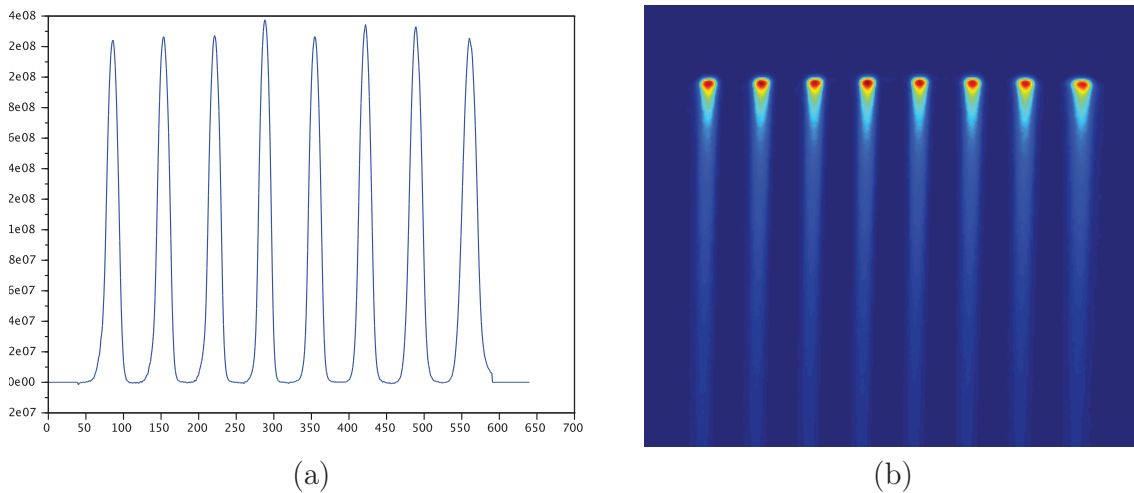


FIGURE 4.6 – (a) Profil d'intensité corrigé correspondant à la figure 4.4 : on constate un bon redressement des données, avec des variations traduisant la difficulté de cette analyse et déterminant une barre d'erreur de quelques %. (b) Image 4.4a corrigée.

Ensuite, nous avons utilisé les traces mesurées sur les calibres 1 ns et 5 ns pour en obtenir une seule pour chaque point de mesure, reconstruite comme dans l'exemple présenté chapitre 2 figure 2.11. Enfin, nous avons effectué l'ajustement gaussien des pics afin de renormaliser l'intensité en prenant en compte la largeur variable des canaux, voir figure 4.7. En effet, la largeur apparente du canal de mélange est différente de la largeur du canal de relaxation, voir figure 3 de l'article. L'aire sous la courbe est utilisée pour renormaliser les intensités des cinétiques de fluorescence.

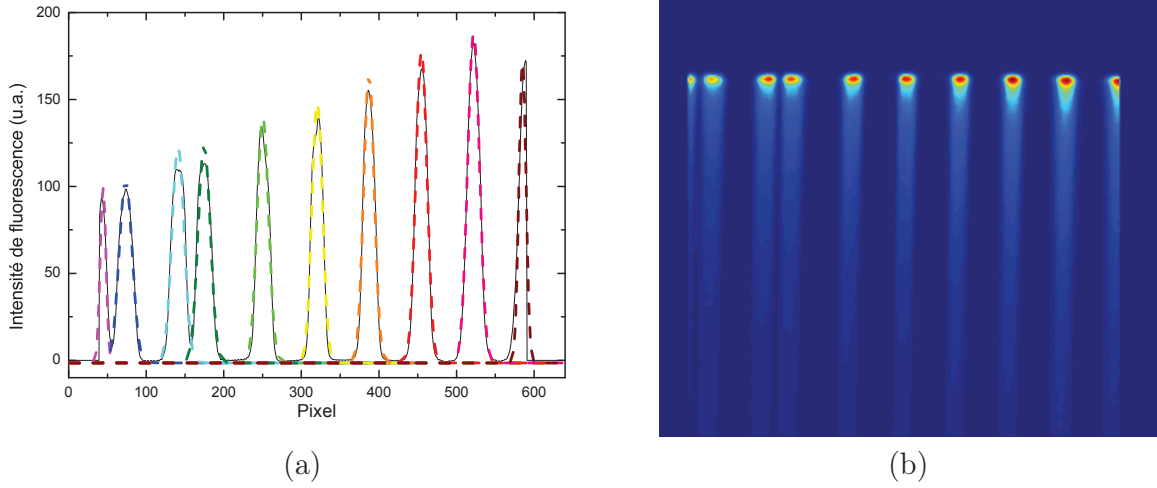


FIGURE 4.7 – (a) Profil d'intensité corrigé provenant de canaux de largeurs différentes : à gauche, les quatre premiers pics proviennent du canal de mélange ; les suivants proviennent du canal de relaxation. Le dernier pic à droite n'est pas imagé complètement par la photocathode de la caméra à balayage de fente. La renormalisation par l'ajustement gaussien permet néanmoins de le prendre en compte. (b) Image correspondante.

4.3.2 Analyse globale

Les 40 cinétiques de fluorescence mesurées ont été regroupées dans une matrice, dont la dimension verticale représente les déclin (t , en ns) et la dimension horizontale représente le temps de relaxation chimique (t' en ms). L'analyse globale est réalisée en appliquant un algorithme de *Singular Value Decomposition*, décomposition en valeurs singulières (SVD) [103]. La SVD est une opération algébrique effectuée sur une matrice de données M_{ij} (i et j étant respectivement les lignes et les colonnes), la décomposant dans notre cas en cinétiques de fluorescence $F(t)$ et en cinétiques chimiques $\chi(t')$ selon l'équation :

$$M_{ij} = \sum_n \chi_n(t'_i) s_n F(t_j) \quad (4.1)$$

où les s_n sont les valeurs singulières. La SVD permet, à partir des valeurs singulières calculées, de réduire les données aux valeurs singulières dominantes et de filtrer le bruit par élimination des valeurs singulières d'amplitude négligeable. La fonction SVD du logiciel Scilab nous a permis d'effectuer cette opération, figure 4.8 : nous avons retenu les trois premières, et négligé les suivantes. Ce choix est justifié par la suite (fig. 4.10).

L'algorithme de SVD permet d'obtenir les cinétiques associées ($F(t_j)$ de l'équation (4.1)) aux valeurs singulières s_n . Les produits des valeurs singulières par les $F(t_j)$ sont

4.3. Cinétique bi-moléculaire mesurée par fluorescence résolue en temps

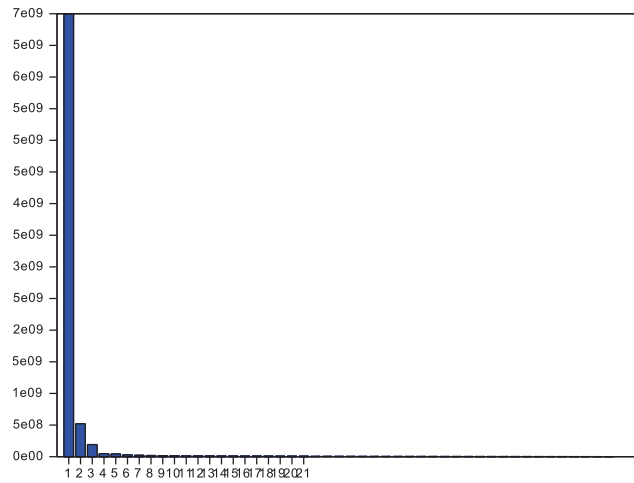


FIGURE 4.8 – Valeurs singulières obtenues pour la matrice de données. Les trois premières ont été retenues, les suivantes négligées.

présentées figure 4.9.

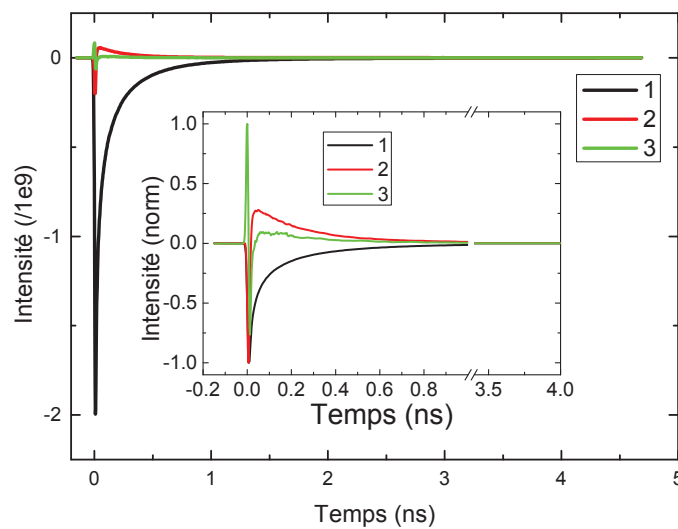


FIGURE 4.9 – Cinétiques singulières. Il s'agit du produit $s_n \cdot F(t_j)$ de l'équation (4.1). Le graphe principal représente les intensités non normalisées. On constate que la première cinétique singulière a une amplitude très supérieure aux deux suivantes. En insert, le même graphe avec les intensités normalisées et agrandi sur la première nanoseconde est montré afin de voir plus clairement les cinétiques.

L'ajustement global par la fonction (2.52) des trois cinétiques singulières obtenues a été effectué. À titre d'exemple, l'ajustement d'une cinétique typique telle que celles qui ont été incluses dans la matrice M_{ij} a été représenté en figure 2.11 : quatre composantes de temps en plus de la composante non résolue (paramètre "Atau", voir sous-section 2.4.1) sont ajustées. L'ajustement global est d'abord effectué pour les temps supérieurs à 0.35 ns, afin d'ajuster correctement les composantes longues. L'ajustement global est ensuite réalisé pour les cinétiques complètes, en fixant la composante la plus longue trouvée (1528 ps). On obtient 14 ps, 72 ps, 302 ps et 1528 ps. L'observation des résidus permet de conclure que le choix de ce nombre de composantes est justifié : pour un ajustement à trois composantes + Atau, les résidus sont mauvais ; ils ne sont pas meilleurs pour un ajustement à cinq composantes + Atau. L'analyse des résidus permet également de justifier le choix de ne garder que les trois premières valeurs singulières. On compare donc les résidus de l'ajustement global aux cinétiques singulières 3 et 4 : figure 4.10. Les cinétiques singulières ont une amplitude similaire voire inférieure à celle de 4 (non montrées).

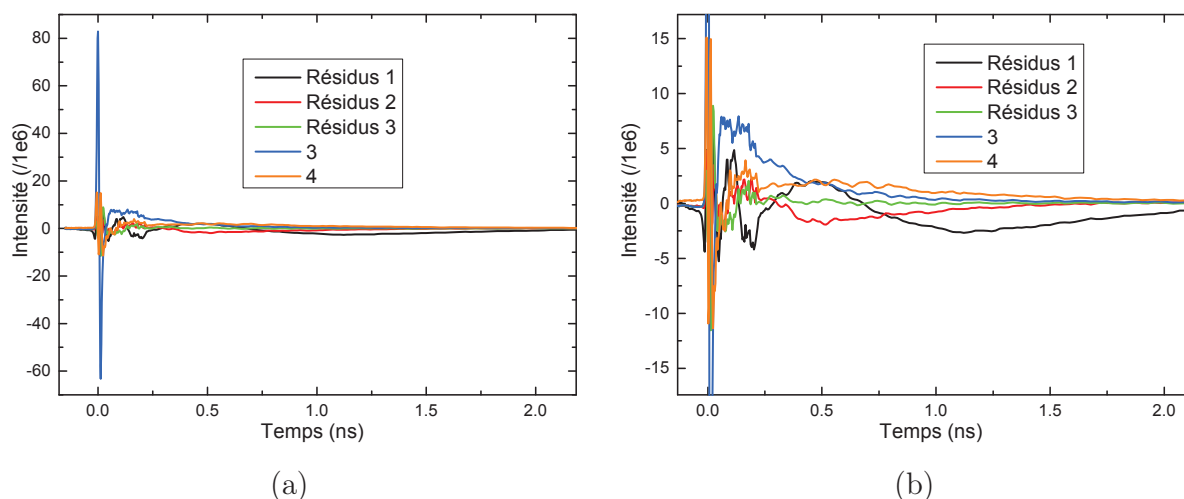


FIGURE 4.10 – (a) Résidus comparés aux cinétiques singulières 3 et 4. (b) Figure (a) agrandie afin de mieux comparer les différences. On observe que l'amplitude des résidus est comparable à celle de la cinétique singulière 4 : cela nous conforte dans notre choix de ne conserver que 3 valeurs singulières et d'éliminer les suivantes, d'amplitude comparable à inférieure à celle de 4, non représentées.

Une fois l'ajustement effectué, on obtient des amplitudes A associées aux quatre composantes τ trouvées, ainsi que l'amplitude multipliée par le temps non résolu, paramètre "Atau". Il est possible de tracer l'évolution de ces amplitudes en fonction du temps de relaxation chimique, pour obtenir ce que l'on nomme *Decay Associated Relaxation Kinetics*

4.3. Cinétique bi-moléculaire mesurée par fluorescence résolue en temps

(DARK) dans l'article. Pour ce faire, nous partons du principe que les données la matrice M_{ij} peuvent être ajustées par une somme de N exponentielles :

$$F_n(t_j) = \sum_{\alpha=1,N} A_{n\alpha} e^{-t_j/\tau_\alpha} \quad (4.2)$$

On peut tenir compte de cette équation pour réécrire l'expression pour M_{ij} :

$$M_{ij} = \sum_n \chi_n(t'_i) s_n \sum_{\alpha=1,N} A_{n\alpha} e^{-t_j/\tau_\alpha} \quad (4.3)$$

$$= \sum_{\alpha=1,N} \left[\sum_n \chi_n(t'_i) s_n A_{n\alpha} \right] e^{-t_j/\tau_\alpha} \quad (4.4)$$

Les DARK sont alors définis par

$$\text{DARK}_\alpha(t'_i) = \sum_n \chi_n(t'_i) s_n A_{n\alpha} \quad (4.5)$$

En pratique, on rassemble les amplitudes issues de l'analyse globale dans une matrice de trois lignes ($n = 3$ valeurs singulières) et cinq colonnes ($\alpha = 5$ composantes : 1 non résolue et 4 résolues). Enfin, on a multiplié chaque DARK associé aux composantes résolues ($A_i \times \tau_i$) par sa composante temporelle afin de pouvoir les comparer avec le DARK obtenu pour le produit "Atau".

4.3.3 Article soumis

L'article inclus ci-après présente la preuve de principe que nous avons obtenue au cours de cette thèse : nous avons mesuré l'hétérogénéité structurale d'un complexe biomoléculaire, évoluant hors d'équilibre grâce à l'utilisation du mélange au sein de micro-réacteurs et d'une détection de fluorescence résolue en temps. La procédure de SVD et l'analyse globale effectuées sur les données permet de représenter l'évolution de $I = \sum_{i=0}^4 A_i \times \tau_i$ en fonction du temps de relaxation chimique. I est l'équivalent d'un signal de fluorescence statique, lui-même proportionnel au rendement quantique de fluorescence, et nous le comparons à l'expérience de *stopped-flow* (SF) présentée figure 4.3 : figure 5 de l'article. Nous constatons que les résultats des deux expériences sont en excellent accord.

Nous argumentons que l'intérêt de l'association de la microfluidique avec la mesure de fluorescence résolue en temps réside dans l'obtention des "DARK", permettant la discrimination de l'évolution de plusieurs sous-populations de structures en fonction de la relaxation du mélange. Ici, nous postulons l'existence d'au-moins deux sous-populations contribuant au signal. Ces dernières ont des cinétiques de relaxation différentes : l'une est

de même nature que celle déterminée par l'expérience de SF, et évolue sur une échelle de temps de ~ 120 ms. Il s'agit des trois DARK correspondant aux constantes 72 ps, 302 ps et 1528 ps. Les deux autres DARK, en revanche, n'évoluent pas en fonction de la relaxation du complexe.

Nous interprétons ce résultat en raisonnant sur les degrés de liberté du colorant étudié (PBV) : seul en solution, la molécule se désexcite de façon ultra-rapide grâce à la rotation que les cycles aromatiques de cette molécule peuvent effectuer autour d'un carbone central. Lorsqu'elle est mélangée à la protéine de BSA, la fluorescence de PBV augmente car les mouvements de rotation des cycles sont empêchés. Nous supposons que les DARK n'évoluant pas correspondent à des molécules de PBV non liées mais néanmoins sujettes à la viscosité du milieu (composante de 14 ps non mesurée en solution en absence de BSA) et que les DARK évoluant à la manière des cinétiques de SF correspondent à des molécules de PBV liées à l'intérieur de la BSA. Le temps relativement lent de la cinétique (>100 ms) serait lié à une relaxation structurale de la protéine suite à l'interaction avec PBV.

Des analyses plus poussées permettraient de détailler les mécanismes entrant en jeu dans cette étude. Cependant, l'intérêt de cette expérience réside principalement dans la preuve de principe qu'elle apporte. Le chapitre 5 présente les perspectives de ce travail de thèse et les molécules d'intérêt biologiques que l'on pourrait étudier en lieu et place du système modèle PBV – BSA.

Out-of-Equilibrium Biomolecular Interactions Monitored with Picosecond Fluorescence in Microfluidic Droplets

Sacha Maillot,^a Alain Carvalho,^a Jean-Pierre Vola,^a Christian Boudier,^b Yves Mély,^b Stefan Haacke,^a and Jérémie Léonard^{*a}

Received Xth XXXXXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXXXXX 20XX

First published on the web Xth XXXXXXXXXXXX 20XX

DOI: 10.1039/b000000x

We develop a new experimental approach combining Time-Resolved Fluorescence (TRF) spectroscopy and Droplet Microfluidics (D μ F) to investigate the relaxation dynamics of structurally heterogeneous biomolecular systems. Here D μ F is used to produce with minimal material consumption an out-of-equilibrium, fluorescently labeled, biomolecular complex by rapid mixing within the droplets. TRF detection is implemented with a streak camera to monitor the time evolution of the structural heterogeneity of the complex along its relaxation towards equilibrium, while it propagates inside the microfluidic channel. The approach is validated by investigating the fluorescence decay kinetics of a model interacting system of Bovine Serum Albumin and Patent Blue V. Fluorescence decay kinetics acquired with very good signal-to-noise ratio allow for global, multicomponent fluorescence decay analysis and evidence heterogeneous structural relaxation over ~ 100 ms.

1 Introduction

The investigation of biomolecular interactions is of essential biological relevance, since it enables the emergence of new therapeutic strategies targeting specifically these interactions. Biomolecular interactions are characterized by structural heterogeneity, structural dynamics, and cooperativity^{1–4}. Beyond the long-standing concept of “induced fit”, evidence accumulates showing that biomolecular recognition operates as a conformational selection by the ligand among a large ensemble of pre-existing conformations of the receptor^{5,6}. Hence, a protein function may not only be related to its average structure, but rather to its dynamic scanning of an energy landscape, as exemplified by intrinsically disordered proteins^{7,8}. Several high or very-high spatial resolution techniques such as Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR), mass spectrometry or hydroxyl radical footprinting have been applied to the investigation of biomolecular structural dynamics^{1,9–12}. Besides, although they provide low spatial resolution, time-resolved or single-molecule spectroscopies¹³ remain unique in disentangling structural heterogeneity, structural intermediates, or highly fluctuating conformations^{1,14–16}.

Single-molecule spectroscopy has proven very efficient at unraveling the structural heterogeneity of freely diffusing pro-

teins at equilibrium, as well as in continuous-flow micro-mixers where the fast, diffusion-controlled dilution of denaturant molecules triggers the protein refolding within a few tens of microseconds¹⁷. However, the very low concentration ($< 10^{-10}$ M) usually required for single molecule spectroscopy^{18,19} precludes the investigation of bi- or multimolecular interactions since the partners would most likely never encounter within the detection volume at such low concentrations. Instead, time-resolved fluorescence (TRF) has long been implemented *in vitro* at higher concentrations to investigate fluorescently labeled biomolecular structures^{20–22}, because structural heterogeneity is encoded in a distribution of fluorescence lifetimes^{23–27}, even in ensemble measurements. For instance, quantitative characterization of structural heterogeneity, i.e. distributions of distances, may be revealed by time-resolved Förster Resonant Energy Transfer (TR-FRET) experiments, combined with appropriate fitting methods^{24,28}, or global analysis of multiple experimental data sets²⁹.

We propose a new experimental approach combining time-resolved fluorescence (TRF) spectroscopy and droplet microfluidics to investigate the structural dynamics of heterogeneous biomolecular systems. Here microfluidics is used to produce with minimal material consumption an out-of-equilibrium biomolecular system by rapid mixing, and TRF detection is used as a reporter of the structural heterogeneity along the relaxation of the system during its propagation inside the microfluidic channel.

Investigations of structural relaxation in out-of-equilibrium biomolecules by TRF detection (sometimes referred to as double-kinetic experiments) were initially performed with

^a Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg & Labex NIE, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7504, F-67034 Strasbourg Cedex 2, France; E-mail: jeremie.leonard@ipcms.unistra.fr

^b UMR CNRS 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 Route du Rhin, CS 60024, Illkirch, Cedex F-67401, France

conventional stopped-flow apparatuses^{28,30} requiring large material consumption. TRF was also successfully implemented with continuous-flow microfluidics for biomolecular structural relaxation surveys^{31–34} provided accurate modeling and analysis of the multi-component fluorescence decay is employed to reveal structural heterogeneity and structural intermediates along the course of the reaction^{33,34}. In contrast, single-component analysis such as the determination of an average fluorescence lifetime like in fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) would mask the underlying heterogeneity. As a matter of fact, implementations of TRF for FLIM in microfluidic chips were shown to be efficient at investigating the mixing process itself, rather than the nature of the molecular interactions^{35–37}.

Here, we implement TRF detection with droplet rather than continuous-flow microfluidics. Droplet microfluidics enables fast mixing (~ 1 ms), long propagation times with no reagent dispersion and accurate relation between propagation length and time³⁸. Thus it allows to follow structural relaxation of out-of-equilibrium molecular complexes from ms up to over seconds. Unlike continuous-flow mixers where very fast mixing relies on fast diffusion of one reagent in large excess across a very large concentration jump, droplet microfluidics is also very well suited to the mixing of several reagents with comparable and adjustable concentrations^{39–41}. Interestingly, Benz et al.⁴¹ also recently implemented TRF together with droplet microfluidics. They demonstrate an efficient protein-protein binding assay based on fluorescence lifetime detection. However they implement a single excitation and detection spot in a confocal microscope and do not monitor the structural relaxation of the complex. To reach this goal, we instead implement wide field imaging of the microfluidic chip on the photocathode of a streak camera. As a proof-of-principle experiment, we investigate the fluorescence decay kinetics of a test biomolecular complex of Bovine Serum Albumin (BSA) with Patent Blue V (PBV), used for the visual inspection of sentinel lymph nodes prior to biopsy in early breast cancer patients⁴². As in all triarylmethane dyes, the fluorescence lifetime of PBV is thought to be quenched by the rotational motion of the phenyl rings⁴³, which is strongly hindered when bound to BSA⁴⁴. Here we follow the evolution of the fluorescence decay kinetics of PBV bound to BSA along its propagation in the microfluidic chip after the fast mixing (< 10 ms) of both molecules in droplets. We acquire fluorescence decay kinetics with very good signal-to-noise ratio over the entire relaxation process, which allows global, multi-component fluorescence decay analysis evidencing heterogeneous structural relaxation over a 100-ms time scale.

2 Materials and Methods

Droplet Microfluidics. Microfluidic chips are made of Poly(dimethylsiloxane) (PDMS)⁴⁵. SU8 (MicroChem) molds on silicon wafers are prepared in a clean room. PDMS (Sylgard) replicas are sealed on a microscope slide by O₂ plasma activation (plasma activer Diemer). A 1 % solution of 1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane (Alfa Aesar) in Perfluorodecalin (PFD, Alfa Aesar) is flushed in the channels to render them hydrophobic, then rinsed with N₂⁴⁶. Following the design of Song et al.³⁸, three aqueous inlets merge into one channel intersecting a water-immiscible carrier fluid to produce water-in-oil droplets in a so-called T-junction. The carrier fluid is a 10 : 1 mixture of perfluorodecaline PFD (Alfa Aesar) with 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctanol (Alfa Aesar) as a surfactant³⁸. The channels sections are squares of $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. Syringe pumps (Harvard Apparatus) are used to flow the liquids into the chips, via 1 mL syringes (Braun) and PTFE tubing (Fisher bioblock). 50 to 100 μm -long water-in-oil droplets are produced with a typical water fraction of 0.5. The few-100-pL droplets circulate in the main channel at a controlled speed varied between 20 and 200 mm/s, corresponding to a maximum reagent consumption of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ per aqueous inlet.

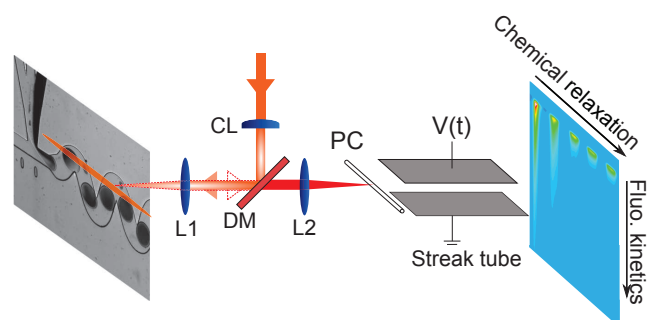


Fig. 1 Scheme of the experimental setup: the excitation light is focused along a line across the microfluidic channel. The fluorescence emitted by the droplets along the excitation line is collected and focused on the photocathode of a streak camera (SC). On the left hand side the photograph of the mixing region of the microfluidic depicts the dilution of a potassium permanganate solution to qualitatively show the mixing inside the droplets. On the right hand side an example of SC data is shown: each intersection of the microfluidic channel with the excitation light line (horizontal axis) yields a time-resolved fluorescence signal (vertical axis), averaged over a large number of successive identical droplets. L1,L2: objectives; CL: cylindrical lens; DM: dichroic mirror; PC: streak camera photocathode.

TRF detection. Figure 1 illustrates the experimental setup. The microfluidic chip is used to mix reagents in droplets (see a picture of the T-junction region in the left-hand side of

Figure 1) and to follow the biochemical reaction which occurs within each individual droplet along propagation in the main channel until the outlet. The mixing is initiated at the T-junction: among the three aqueous inlets, the central one contains a buffer solution to prevent the two reagents in the two other inlets to mix before the droplet formation. The mixing is then accelerated by chaotic advection induced within the droplets by the wiggling shape of the channel after the T-junction³⁸. Time-resolved fluorescence detection is implemented along the main channel by illuminating the microfluidic chip with a sheet of light produced by a cylindrical lens and a $\times 10$ objective (Mitutoyo Plan Apo $f = 20$ mm, N.A. = 0.28). The same objective collects the fluorescence emitted by the droplets content at the intersection of the excitation light sheet with the microfluidic channel. A dichroic mirror is used to reflect the excitation light and transmit the higher wavelength fluorescence photons. A camera objective ($f = 50$ mm, Senko) images the portion of the microfluidic chip illuminated by the sheet of light along the photocathode of a streak camera (C10627 streak tube from Hamamatsu Photonics). The photocathode length being 4.5 mm, we have with the present optical system a ~ 2 -mm-wide field of view. Hence, depending on the design of the microfluidic channel illuminated by the sheet of light, a typical 6 to 12 fluorescence kinetics traces are recorded simultaneously by the SC in its field of view. The SC is operated in the analog integration mode with a typical 5-min acquisition time. Therefore, each of the fluorescence kinetic traces results from the averaging over a large number of successive identical droplets observed in a different location along the microfluidic channel, meaning at different reaction times after the initial droplet formation and reagents mixing. The SC measures time-resolved luminescence on different time ranges which may be increased stepwise from 1 ns up to 10 ms. The instrument response function is nearly a gaussian function with a standard deviation of $\sigma 6ps$ for the smallest 1 ns time range and linearly increasing with the time range. Excitation light is made of sub-picosecond laser pulses generated with a Tangerine (Amplitude systems) amplified fiber laser system operating at 50 kHz an equipped with a Non-Collinear Parametric Amplifier (NOPA). The excitation wavelength is tunable from 460 to 700 nm, the power is set to no more than 2 mW. For the mixing time measurement, fluorescein fluorescence is excited at 515 nm. For the PBV-BSA experiment, PBV fluorescence is excited at 600 nm.

The droplets flow speed is measured as follows. A white LED panel (Phlox SA) driven by a function generator (DS340, Stanford Research Systems), is used to shine the microfluidic chip with two 10- μs -short light pulses separated by a precisely defined time interval. The transmission of this double pulse by the microfluidic chip is recorded by a conventional CCD camera (C8484, Hamamatsu) in a single image acquisition via a removable mirror (not shown in Fig. 1). The result is the

superposition of two pictures separated in time by a known delay. The displacement of individual droplets during that delay time is measured to infer the droplet speed, which is in turn used to calibrate the correspondence between propagation length and relaxation time along the microfluidic channel.

Chemicals. Patent Blue V, Fluorescein (Fl) and Bovine Serum Albumin are used as received (Sigma Aldrich) and dissolved in Phosphate Buffered Saline (10 mM, pH = 7.4). The measurement of the mixing time is made by injecting in the three inlets i) Fl and BSA at 300 μM each in PBS buffer, ii) PBS buffer and iii) KI at 3 M. The same flow speed is applied to the three inlets, such that the solutes are diluted by 3 at the droplet formation. For the PBV-BSA mixing experiment the inlets are flowed with i) 30 μM of PBV in PBS, ii) 300 μM of BSA in PBS, and iii) a PBS buffer solution. The same dilution by 3 occurs at the droplet formation.

Stopped-flow experiment. The time evolution of the fluorescence intensity of the PBV-BSA complex is also investigated in the same conditions of concentration and pH with a stopped-flow instrument (SFM-3, Bio-Logic, Claix, France) with a 2-ms dead time, which allows the rapid mixing of 80 μL of each solution. The fluorescence intensity is monitored above 520 nm through a cutoff filter, with excitation at 405 nm.

3 TRF data acquisition and analysis

Mixing time. The fastest biomolecular reaction or structural relaxation one may resolve is limited by the mixing time in the droplets. Here, we measure it by mixing fluorescein (Fl) to potassium iodide (KI) and monitoring the Fl fluorescence decay kinetics along propagation in the mixing region after the T-junction. Collisional quenching with I^- reduces strongly the Fl fluorescence lifetime τ in a diffusion-controlled process⁴⁷. The mixing time is thus the propagation length over which the average lifetime decreases along the microfluidic chip divided by the flow speed. With the present channel design for chaotic mixing inside the droplets, the mixing time t_{mix} is expected to depend on the channel characteristic transverse dimension w (50 μm here), the droplet size l , the flow speed U and the diffusivity D inside the droplets according to the scaling law⁴⁸: $t_{mix} \propto p = (l/U) \log(wU/D)$, where we introduce the scaling parameter p . With dilute solutions, the mixing time was shown to reach 2 ms at flow speed of 300 mm/s³⁸ with the same channel section, and as low as 0.5 ms in channels of $(10 \mu m)^2$ cross section⁴⁸. In more viscous, crowded biological solutions (with an effective higher diffusivity), Liau et al. showed that the scaling law remains valid by implementing chaotic mixing in droplets of a ~ 5 mM PBS-buffered solution of BSA⁴⁹.

Figure 2 displays the method and results of the mixing time measurement performed in the presence of BSA at the same

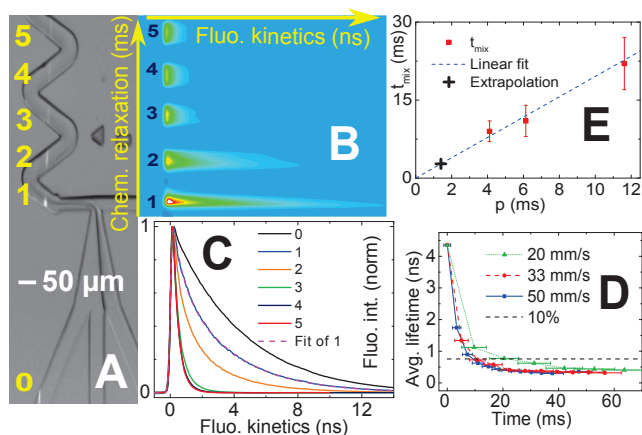


Fig. 2 Mixing time measurement: Fluorescein and KI are mixed in the presence of BSA. A) Picture of the T-junction and mixing region illuminated by the excitation line. Flowing droplets are not resolved due to the large exposure time of 20 ms. The intersection regions of the excitation line with the microfluidic channel are labeled 0 to 5. B) 2D streak camera data: several fluorescence kinetic traces (false colors; horizontal axis) are acquired simultaneously along the propagation in the channel (vertical axis). C) Fluorescence kinetic traces at each of the locations 0 to 5 of the microfluidic chip for a flow speed of 33 mm/s. D) Average fluorescence decay times as a function of the chemical relaxation time for 3 different flow speeds, and mixing time determination (intersection with the 10 % threshold). E) Mixing times determined in fig. D, as a function of the scaling parameter p for chaotic mixing (see text), with a linear fit and the extrapolated mixing time for the fastest flow speed of 165 mm/s used for the PBV-BSA mixing experiment.

concentration as in the BSA-PBV experiment below to reproduce the same viscosity. A fluorescence kinetic trace is recorded simultaneously at several intersections of the excitation light line with the mixing (wiggling) region of the microfluidic channel. By integrating spatially over each of the intersection regions, fluorescence kinetic traces are extracted (Figure 2, C) and fitted by a bi-exponential function. The mixing time t_{mix} is defined as the time at which the average fluorescence lifetime (FLT) has changed by 90 % of $(\tau_0 - \tau_\infty)$, with $\tau_0 = 4.2$ ns the initial FLT of Fl in BSA and PBS as measured in the inlet channel (location 0 in Fig. 2A corresponding to trace 0 in Fig. 2, C) and $\tau_\infty = 280 \pm 20$ ps the FLT of the homogeneous mixture with KI (traces 4 and 5 in Fig. 2, C). As expected, the scaling with parameter p is observed. Although we measure two-fold faster mixing times in the absence of BSA (not shown), we note that sub 10-ms mixing time is achieved in the present conditions (100 μM BSA concentration in the droplets is intermediate between dilute and crowded solution), and a sub 5-ms mixing time is expected for the fastest flow rate used in the following experiments.

Structural relaxation of the PBV-BSA complex. To de-

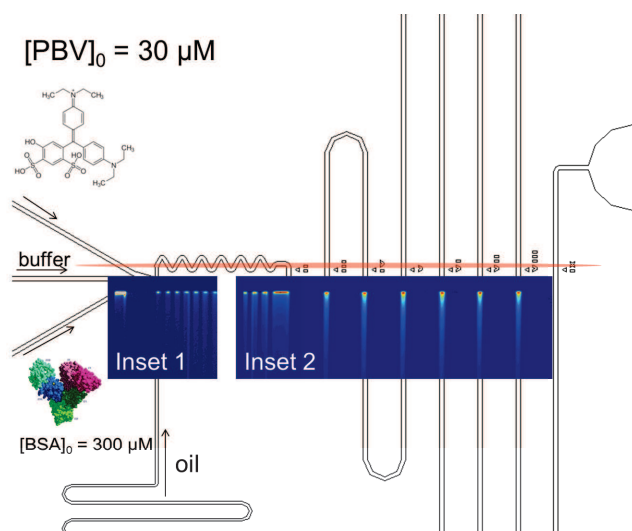


Fig. 3 Principle of the PBV – BSA structural relaxation experiment. The orange line represents the 600 nm laser excitation beam. Each intersection between the channels and the laser results in a fluorescence signal measurable by the SC. Inset 1 displays the SC data obtained when the field of view is centered around the T-junction. The strong intensity drop between the signals detected in the PBV input channel and in the mixing region results from the sudden dilution of PBV within the droplets and further effective dilution of the aqueous phase into the immiscible carrier fluid, from a water fraction of 1 in the input channels to a water fraction of 0.4 after the T-junction. Inset 2 displays 3 appended SC data of partially overlapping regions of the microfluidic chip.

tect structural relaxation by TRF in an heterogeneous system along its propagation over hundreds of ms in droplets, we design microfluidic chips where the mixing region is followed by a long main channel folded in successive rectilinear segments of exponentially increasing length, as depicted in figure 3. We use it to produce out-of-equilibrium PBV-BSA complexes resulting from the fast mixing of two solutions. Free PBV in water is a non-fluorescent dye, meaning that its fluorescence lifetime is very short, and in particular much shorter than the time resolution ($\sigma \sim 6$ ps) of the SC. Upon binding to BSA, PBV shows a large increase in fluorescence quantum yield, hence lifetime. The evolution of the fluorescence decay kinetics will thus reveal the relaxation of the BSA-PBV interaction inside the bi-molecular complex. A 600-nm line of pulsed laser light is shone across the main channel as seen in figure 3 to excite PBV fluorescence. In order to resolve temporally the structural relaxation kinetics, several SC acquisitions are performed at different flow speeds: 55, 110 and 165 mm/s, and after moving successively 3 adjacent portions of the microfluidic channel into the field of view. In total 40 fluorescence kinetic traces are recorded along the microfluidic

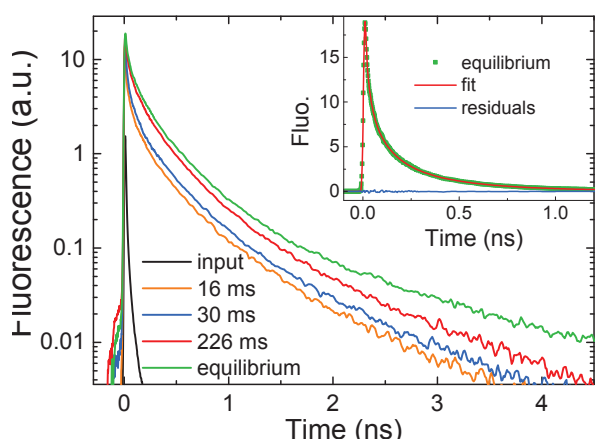


Fig. 4 Selection of fluorescence decay traces recorded along the microfluidic channel. Black line: PBV input channel; orange, blue, red lines after 16 ms, 30 ms, 226 ms chemical relaxation time, respectively; green line: equilibrated complex. Inset: individual fit (red line) of the equilibrated complex trace (green dots) with the function (1) accounting for one non-resolved and 4 time-resolved fluorescence components. The residuals are shown in blue.

channel at 40 different time delays between 15 and 300 ms after droplet formation. Each kinetic trace is actually measured on two time ranges of the SC in order to successively record the early part of the fluorescence decay with the best possible time resolution of 14 ps (1 ns time range), as well as its asymptotic tail (5 ns time range). Overall, the complete data acquisition run takes about 2 hours.

Data post-processing involves several steps. First, background signal results from excitation light scattering or luminescence from the microfluidic chip itself. Its specific decay kinetics is actually measured simultaneously in each SC acquisition in between illuminated portions of the channel. The corresponding time-resolved signal is interpolated and subtracted to the signal detected inside the channel. Next, the spatial inhomogeneity of both excitation light intensity and fluorescence light collection is characterized to determine the spatial Instrument Transfer Function (ITF) along the field of view. To that end, the equilibrated PBV-BSA complex, produced by prior mixing or collected at the outlet of the microfluidic chip, is injected in the 3 aqueous inlets and an additional acquisition run is performed at a single flow speed. The ITF is characterized by determining the spatial dependence of the fluorescence intensity profile along the SC photocathode and used to rescale the signal amplitude of each SC measurement. Finally, the traces recorded on the 1 ns and 5 ns ranges in identical conditions are systematically appended into one fluorescence decay curve.

All the measured fluorescence kinetic traces are assigned to a chemical reaction time deduced from the flow speed mea-

surement. Those obtained with the equilibrated complex are assigned to infinite relaxation time. Figure 4 shows a selection of TRF traces at different reaction times. The entire data set is organized in a matrix containing fluorescence decay curves (vertical dimension in ns) as a function of the chemical reaction time (horizontal dimension in ms). Global analysis⁵⁰ is then performed. First, Singular Value Decomposition (SVD) is used for data reduction and noise filtering. The noise-filtered data is obtained here by reconstructing the data set while including only the dominant 3 singular fluorescence kinetic components and neglecting the others. Simultaneous fitting of the 3 dominant singular traces is performed. The fitting function used here is a sum of exponential functions convolved with a normalized gaussian curve of standard deviation σ accounting for the temporal Instrument Response Function (IRF):

$$S(t) = A_0 \tau_0 \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}} + \sum_i \frac{A_i}{2} e^{\frac{\sigma^2}{2\tau_i^2}} e^{-\frac{t-t_0}{\tau_i}} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{t-t_0 - \sigma^2/\tau_i}{\sigma \cdot \sqrt{2}} \right) \right] \quad (1)$$

The first term explicitly accounts for the existence of an ultrafast, non-resolved fluorescence component of amplitude A_0 and decay time constant $\tau_0 \ll \sigma$, which contributes to the overall signal with the gaussian shape of the IRF and an amplitude $A = A_0 \tau_0$ adjusted as a single fit parameter. t_0 is the time origin, A_i and τ_i are the amplitudes and time constants of the time-resolved components and erf is the error function which appears due to the convolution of an exponential decay-function $A_i \exp(-t/\tau_i)$ with the IRF in the case $\tau_i \geq \sigma$.

In addition to the non-resolved component, as much as 4 time constants are required to perform the global fit of the three dominant singular traces. The amplitude of the corresponding residues is then at the level of the noise rejected by the SVD filtering. The global fit of the entire data set is reconstructed from the simultaneous fits of the three dominant singular kinetic traces. The result can be displayed by plotting the evolution of the amplitudes associated to each resolved or non-resolved fluorescence decay component as a function of the chemical reaction time scale. The corresponding ‘‘Decay-Associated Reaction Kinetics’’ (DARK’s) are presented in figure 5A: they reveal the evolution of the various fluorescence decay components along the biomolecular structural relaxation process. In order to be able to compare the relative weight of the resolved and unresolved components, we actually plot the product $A_i \times \tau_i$ versus the structural relaxation time from $i = 0$ to 4. The interpretation is as follows: each such DARK represents the time-dependent contribution of the corresponding fluorescence component to the overall fluorescence quantum yield QY. Indeed the latter is proportional to $I = \sum_{i=0}^4 A_i \times \tau_i$.

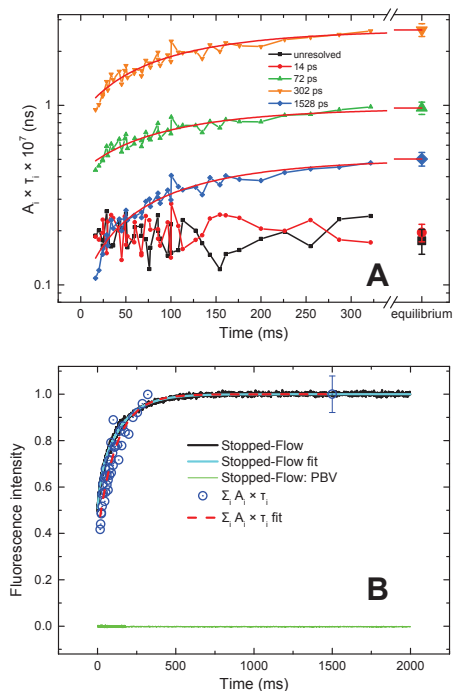


Fig. 5 A) Decay-Associated Reaction Kinetics (DARK's): $A_i \times \tau_i$ as a function of the chemical relaxation time. The vertical axis is in log scale. The horizontal axis has a break: the “equilibrium” points are set at arbitrarily longer times. Global analysis yields one unresolved and four resolved components (14 ps, 72 ps, 302 ps and 1.5 ns). B) Comparison of the reconstructed fluorescence intensity $I = \sum_i A_i \times \tau_i$ (blue dots and the corresponding fit shown as the red dashed line) with the stopped-flow experiment (black line and its fit shown as the blue line). The background stopped-flow signal recorded by mixing PBV with the PBS buffer solution in the absence of BSA in shown in green.

Here we note that the quantity I is nothing but the integrated fluorescence signal as it may be measured in a conventional stopped-flow experiment with fluorescence intensity detection. To confirm this analysis, we compare in figure 5B the intensity I reconstructed after the above global analysis of the time-resolved fluorescence data, to the corresponding stopped-flow experiment (see Material and Methods above). The fluorescence quantum yield is seen to increase instantaneously, i.e. on a time scale shorter than the mixing time, and to further increase over several hundreds of ms. The stopped-flow progress curve is best fitted by a bi-exponential function with time constants $\tau_1 = 143$ ms and $\tau_2 = 18$ ms, and relative weights 80 % and 20 %, respectively, yielding a 118 ± 2 ms average time constant. This value is in excellent agreement with the time constant of 119 ± 9 ms obtained by fitting the reconstructed fluorescence intensities $I = \sum_i A_i \times \tau_i$ with a single exponential function (figure 5B).

4 Discussion

By combining TRF detection and D μ F, we monitor the structural relaxation of the PBV-BSA test molecular system. A typical 1-mL of reagent is used to produce in a 2-hour acquisition time a complete 2-dimensional data set revealing the evolution of the fluorescence decay kinetics of the complex along its structural relaxation over hundreds of ms. Global, multicomponent analysis of the data set yields up to 5 DARK's. The reliability of the measured relaxation kinetics is assayed by comparison with a reference stopped-flow experiment. Both experiments are in excellent agreement.

The most obvious result of this proof-of-principle experiment is that unlike the conventional stopped-flow experiment, the DARK's displayed in fig. 5A immediately reveal the coexistence of at least two sub-populations with different relaxation behaviors. Indeed it appears that the shortest two components (non-resolved and 14-ps, about the shortest resolvable time scale with $\sigma \sim 6$ ps) show no evolution. Instead the longer time constants of 72 ps, 300 ps and 1.5 ns are the signature of a relaxation process which proceeds over several hundreds of ms. Quantitative analysis of the three corresponding DARK's by a mono-exponential function yields a common time constant of 119 ± 9 ms. Because their temporal behavior is identical we assign these three DARK's to the signature of a unique sub population characterized by a multi-exponential (or non-exponential) fluorescence decay kinetics.

The fluorescence decay kinetics of PBV (and of triaryl-methane dyes in general) is controlled by intramolecular rotational motion, itself strongly influenced by the solvent viscosity or presently by the interaction with BSA. It is very fast in the low-viscosity or non-interacting limit and may be significantly slowed down when the internal rotational degrees of freedom are hindered. Here, the existence of two distinctive temporal behaviours of the DARK's provides evidence for the coexistence of (at least) two qualitatively different sub-populations characterized by two different levels of internal rotational freedom for the PBV dye. Each population may actually exhibit a non-exponential fluorescence decay kinetics, which is here tentatively decomposed on a sum of exponentially decaying functions by the data analysis scheme we have implemented. Consequently, the exact values of the time constants and amplitudes extracted from the fit are interdependent and depend in particular on the number of time constants we include: they should be considered as typical time scales involved in the fluorescence quenching process. This is in contrast to TR-FRET experiments, where a given DARK would potentially be assigned to a given distance between donor and acceptor.

Previous investigations of PBV-BSA interaction have concluded that BSA exhibits two different types of binding sites for PBV: one with an affinity constant of 6200 M^{-1} , and five

other equivalent binding sites each with the same, 200-times lower affinity, and no indication of cooperativity⁵¹. Given the BSA concentration (100 μM) in the droplets here, we can conclude that at equilibrium less than 50% of the PBV molecules are bound and that the vast majority of bound dye molecules are bound to the single higher-affinity site. We thus tentatively interpret our results as follows. The two fastest components are the signature of the unbound PBV molecules, observed with a constant DARK at equilibrium but also at the earliest resolvable chemical time scales (~ 10 ms here). This suggests that the high-affinity complex forms within the mixing time, already in proportions similar to the equilibrium conditions. Then the 120-ms time scale chemical relaxation is attributed to structural relaxation of the protein induced by the interaction of the dye, that further adapt the binding pocket and restrict the rotational freedom of PBV, to achieve the equilibrium affinity. The stopped-flow experiment even suggests that this structural relaxation may occur in two steps or along two relaxation paths characterized by the two time constants of 18 ms and 140 ms. We further hypothesize that the initial fast complex formation could result from a conformational selection by the dye of the protein structures which favor the higher-affinity site, and that the following structural relaxation could be recast in the induced-fit model for protein-ligand interaction.

In the absence of BSA, the fluorescence decay kinetics of PBV in a non-viscous PBS-buffer solution is entirely non-resolved with the SC (not shown). Here instead, the unbound dye molecules experience a more viscous environment due to the presence of BSA, which may very well explain a slightly slower fluorescence decay kinetics yielding the 14-ps time scale. We note that the unbound population remains undetectable in the conventional stopped-flow experiment since i) short-lived fluorescence components contribute to a minor fraction of the overall signal and ii) in addition here, they contribute to the instantaneous (unresolved) rise with no further chemical relaxation. In the TRF experiment instead, we do detect this low-fluorescence-intensity population. However, we still cannot infer its relative population because its fluorescence decay kinetics is not fully resolved: only the product $A_0\tau_0$ can be extracted from the fit (this is the general result of the convolution by a too-slow IRF). Only complete resolution of the fluorescence decay kinetics with an improved time-resolution (requiring a different detection technology, see e.g.²⁷) would allow to extract separately A_0 and τ_0 and conclude about the proportions of bound to unbound molecules, encoded in the value of A_0 relative to the other A_i 's.

Finally, BSA is also known to adsorb significantly at the water-oil interface^{49,52} and it is likely that in our experimental conditions, a significant proportion of BSA molecules are adsorbed at the droplets surface. We argue that this might

explain the slightly slower rise of the reconstructed fluorescence intensity as compared to the stopped-flow experiment (figure 5B), and in particular the apparently non-resolved 18-ms chemical time scale, although the mixing time is expected to be less than 5 ms. First, although the overall agreement of both experiments suggest that PBV binds similarly to BSA in both cases, the structural relaxation kinetics may differ for interfacial BSA. Second, if a significant proportion of PBV has to diffuse until the interface to encounter BSA, this may yield a slower effective mixing process, which is not described by the chaotic mixing process and not either characterized by the FI/I⁻ mixing experiment, which essentially occurs in the bulk of the droplets. Further investigation the interfacial versus bulk BSA sub-populations requires dedicated experiments and goes beyond the scope of the present proof-of-principle experiment.

5 Conclusion

We demonstrate the implementation of TRF spectroscopy for the investigation of the relaxation kinetics of an out-of-equilibrium bi-molecular complex produced by fast mixing in microfluidic water-in-oil droplets. Two sub-populations and the structural relaxation on the 100-ms time scale of one of them are evidenced by the global analysis of multiple fluorescence decay traces recorded in parallel along the droplet propagation inside the device. The experimental approach and data analysis scheme described here will be useful at investigating the structural relaxation of heterogeneous, biologically relevant bi- or multi-molecular systems, in particular with FRET labeled oligonucleotides or proteins.

Although side effects related to the adsorption of BSA to the water-in-oil interface brings additional complexity to the investigation of the proposed system, this may not be considered as a general weakness of the approach since BSA more than other bio-molecules is particularly prone to adsorption, and the use of specific surfactants is documented to passivate water-oil interface^{53,54} and allows for the investigation of protein properties in water-in-oil droplets. In addition, further developments can be envisioned towards a more cost-effective implementation of the approach, for instance relying on CMOS integrated single photon counting systems⁵⁵ rather than conventional streak cameras and on cheap pulsed laser diodes⁵⁶ instead of the amplified laser system presently used. Presently, a typical one order of magnitude loss in the fluorescence decay time resolution would however be the price of such an implementation.

6 Acknowledgements

We thank Geneviève Pourroy for fruitful discussions and Christian Rick for precious technical assistance. The work was supported by the CNRS program “Interface Physique-Chimie-Biologie: soutien à la prise de risque”, and the “FEM-TOSTACK” ANR-2010-BLAN-1529-01 grant.

References

- 1 K. Henzler-Wildman and D. Kern, *Nature*, 2007, **450**, 964–972.
- 2 H. Al-Hashimi and N. Walter, *Current opinion in structural biology*, 2008, **18**, 321–329.
- 3 Q. Cui and M. Karplus, *Protein Science*, 2008, **17**, 1295–1307.
- 4 C. A. Hunter and H. L. Anderson, *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, **48**, 7488–7499.
- 5 D. D. Boehr, R. Nussinov and P. E. Wright, *Nature chemical biology*, 2009, **5**, 789–796.
- 6 B. J. Grant, A. A. Gorfe and J. A. McCammon, *Current opinion in structural biology*, 2010, **20**, 142–147.
- 7 P. E. Wright and H. J. Dyson, *Journal of molecular biology*, 1999, **293**, 321–331.
- 8 P. Tompa, *Trends in biochemical sciences*, 2012.
- 9 A. Palmer, *Chemical Reviews*, 2004, **104**, 3623–3640.
- 10 L. Konermann, X. Tong and Y. Pan, *Journal of Mass Spectrometry*, 2008, **43**, 1021–1036.
- 11 B. B. Stocks and L. Konermann, *Journal of molecular biology*, 2010, **398**, 362–373.
- 12 T. Adilakshmi, D. L. Bellur and S. A. Woodson, *Nature*, 2008, **455**, 1268–1272.
- 13 E. Haustein and P. Schwiller, *Current opinion in structural biology*, 2004, **14**, 531–540.
- 14 B. Schuler, E. Lipman and W. Eaton, *Nature*, 2002, **419**, 743–747.
- 15 Z. Xie, N. Srividya, T. R. Sosnick, T. Pan and N. F. Scherer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**, 534–539.
- 16 G. Bokinsky, L. G. Nivón, S. Liu, G. Chai, M. Hong, K. M. Weeks and X. Zhuang, *Journal of molecular biology*, 2006, **361**, 771–784.
- 17 B. Schuler and H. Hofmann, *Current opinion in structural biology*, 2013, **23**, 36–47.
- 18 M. Dahan, A. A. Deniz, T. Ha, D. S. Chemla, P. G. Schultz and S. Weiss, *Chemical Physics*, 1999, **247**, 85–106.
- 19 B. Schuler, E. A. Lipman, P. J. Steinbach, M. Kumke and W. A. Eaton, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**, 2754–2759.
- 20 J. M. Beechem and L. Brand, *Annual review of biochemistry*, 1985, **54**, 43–71.
- 21 J. R. Alcalá, E. Gratton and F. Prendergast, *Biophysical journal*, 1987, **51**, 597–604.
- 22 E. Haas, *ChemPhysChem*, 2005, **6**, 858–870.
- 23 C. Vuilleumier, E. Bombarda, N. Morellet, D. Gerard, B. Roques and Y. Mely, *Biochemistry*, 1999, **38**, 16816–16825.
- 24 G. Lakshmikanth, K. Sridevi, G. Krishnamoorthy and J. B. Udgaonkar, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2001, **8**, 799–804.
- 25 J. G. Lyubovitsky, H. B. Gray and J. R. Winkler, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**, 14840–14841.
- 26 L. Zhao and T. Xia, *Methods*, 2009, **49**, 128–135.
- 27 T. Gelot, P. Tourón-Touceda, O. Crégut, J. Léonard and S. Haacke, *The Journal of Physical Chemistry A*, 2012, **116**, 2819–2825.
- 28 J. G. Lyubovitsky, H. B. Gray and J. R. Winkler, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**, 5481–5485.
- 29 J. Beechem and E. Haas, *Biophysical journal*, 1989, **55**, 1225–1236.
- 30 V. Ratner, M. Sinev and E. Haas, *Journal of molecular biology*, 2000, **299**, 1363–1371.
- 31 O. Bilsel, C. Kayatekin, L. A. Wallace and C. R. Matthews, *Review of scientific instruments*, 2005, **76**, 014302–014302.
- 32 S. Batabyal, S. Rakshit, S. Kar and S. Pal, *Review of Scientific Instruments*, 2012, **83**, 043113–043113.
- 33 T. Kimura, J. C. Lee, H. B. Gray and J. R. Winkler, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, **104**, 117–122.
- 34 S. Yamada, N. D. B. Ford, G. E. Keller, W. C. Ford, H. B. Gray and J. R. Winkler, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, **110**, 1606–1610.
- 35 R. Benninger, O. Hofmann, J. McGinty, J. Requejo-Isidro, I. Munro, M. Neil, A. deMello, P. French *et al.*, *Optics express*, 2005, **13**, 6275–6285.
- 36 R. Benninger, O. Hofmann, B. Önfelt, I. Munro, C. Dunsby, D. Davis, M. Neil, P. French and A. de Mello, *Angewandte Chemie*, 2007, **119**, 2278–2281.
- 37 X. Casadevall i Solvas, M. Srisa-Art, A. deMello and J. Edel, *Analytical chemistry*, 2010, **82**, 3950–3956.
- 38 H. Song, J. Tice and R. Ismagilov, *Angewandte Chemie*, 2003, **115**, 792–796.
- 39 H. Song and R. Ismagilov, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**, 14613–14619.
- 40 M. Srisa-Art, E. Dyson, A. deMello and J. Edel, *Analytical chemistry*, 2008, **80**, 7063–7067.
- 41 C. Benz, H. Retzbach, S. Nagl and D. Belder, *Lab Chip*, 2013.
- 42 C. Tsopelas and R. Sutton, *Journal of Nuclear Medicine*, 2002, **43**, 1377–1382.
- 43 G. Oster and Y. Nishijima, *Journal of the American Chemical Society*, 1956, **78**, 1581–1584.
- 44 M. S. Baptista and G. L. Indig, *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998, **102**, 4678–4688.
- 45 D. Duffy, J. McDonald, O. Schueller and G. Whitesides, *Analytical chemistry*, 1998, **70**, 4974–4984.
- 46 J. Clausell-Tormos, A. D. Griffiths and C. A. Merten, *Lab on a Chip*, 2010, **10**, 1302–1307.
- 47 J. Q. Umberger and V. K. LaMer, *Journal of the American Chemical Society*, 1945, **67**, 1099–1109.
- 48 H. Song, M. Bringer, J. Tice, C. Gerdtts and R. Ismagilov, *Applied Physics Letters*, 2003, **83**, 4664–4666.
- 49 A. Liao, R. Karnik, A. Majumdar and J. H. D. Cate, *Analytical chemistry*, 2005, **77**, 7618–7625.
- 50 I. H. van Stokkum, D. S. Larsen and R. van Grondelle, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2004, **1657**, 82–104.
- 51 D. W. Newton, P. J. Breen, D. E. Brown, J. F. Mackie and R. B. Kluza, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1981, **70**, 122–127.
- 52 D. Graham and M. Phillips, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1979, **70**, 415–426.
- 53 L. S. Roach, H. Song and R. F. Ismagilov, *Analytical chemistry*, 2005, **77**, 785–796.
- 54 J.-C. Baret, *Lab on a Chip*, 2012, **12**, 422–433.
- 55 C. Niclass, M. Sergio and E. Charbon, *Optics East* 2006, 2006, pp. 63720S–63720S.
- 56 W. Uhring, C.-V. Zint, J. Bartringer *et al.*, *Proceedings of SPIE*, 2004, pp. 583–590.

Chapitre 5

Perspectives

Dans ce chapitre seront présentées les perspectives de ce travail de thèse. Elles s'organisent en deux parties : l'une fondamentale, où l'étude des hétérogénéités structurales de molécules d'intérêt biologique et leur dynamique sera réalisée avec la technique présentée dans le chapitre 4, où la relaxation du complexe Patent Blue Violet – Bovine Serum Albumin a été étudiée. Par exemple, la caractérisation de l'action de la protéine NCp7 sur les acides nucléiques du VIH entre dans le cadre de recherches de nouvelles thérapies contre le virus du SIDA (partie 5.1.1). Un autre système d'intérêt concerne la recherche de nouveaux outils de diagnostic contre le cancer : des complexes organo-métalliques peuvent servir de sondes structurales sur l'ADN (partie 5.1.2).

Une autre perspective concerne le développement d'une expérimentation nouvelle, consistant à mesurer des photons uniques corrélés en temps (TCSPC) pour des gouttes uniques. À la fin de ma thèse, un développement nouveau a été réalisé en collaboration avec le laboratoire ICUBE de Cronenbourg, dans le but de fabriquer des prototypes de dispositifs microfluidiques associés à une détection intégrée de photons uniques au sein de gouttes uniques. Ce travail a donné lieu au dépôt d'un brevet [46]. Cette technique est destinée à une application dans le domaine de la recherche de médicaments, section 5.2.

5.1 Étude d'interactions bio-moléculaires

5.1.1 Complexe protéine – ADN du VIH

L'équipe BIODYN où j'ai effectué ma thèse a travaillé sur le projet ANR "FEMTOS-TACK", en collaboration avec l'équipe du Professeur Yves Mély de la faculté de pharmacie d'Illkirch-Graffenstaden, qui a pour sujet d'étude l'interaction des acides nucléiques (AN) du VIH avec la protéine de la nucléocapside NCp7 [20, 104]. Sa structure est hautement

conservée¹ et contient des atomes de zinc, nécessaires à son bon fonctionnement et donc également au bon fonctionnement du virus. Dans cette optique, des molécules appelées « éjecteurs de zinc » ont été étudiées afin de les utiliser pour rendre la protéine inactive [105]. Cependant, les éjecteurs de zinc ont une action non spécifique, et peuvent donc affecter des protéines du corps humain contenant du zinc et ayant des fonctions vitales. C'est pourquoi l'étude des interactions biomoléculaires entre NCp7 et les AN est importante afin de trouver des stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement la protéine [106].

En particulier, les chercheurs de l'équipe d'Y. Mély s'intéressent à la séquence cTAR (*complementary Transactivation Response element*) de l'ADN du VIH. Les expériences qu'ils ont menées étudient l'action de NCp7 sur la déstabilisation de la séquence cTAR (figure 5.1) et sur l'hybridation TAR (ARN) / cTAR (ADN) (figure 5.2), étapes nécessaires intervenant lors de la transcription du virus [60, 107]. Elles sont basées sur la spectroscopie de fluorescence, sondant la structure des biomolécules par un signal de FRET : deux molécules fluorescentes sont greffées à chaque extrémité du brin d'ADN, voir figure 5.1. Lors de la déstabilisation ou l'hybridation des structures induisant un changement de

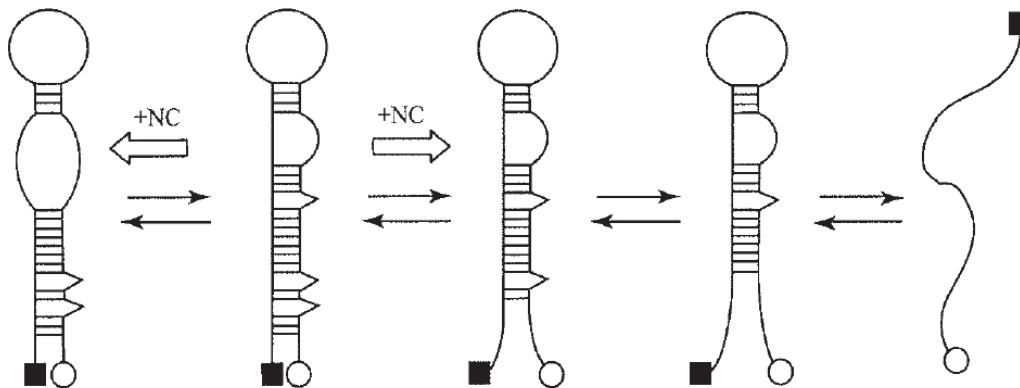


FIGURE 5.1 – Déstabilisation de la séquence d'ADN cTAR (*complementary Trans-Acting Response element*) par la protéine chaperonne NCp7. Deux fluorophores (carré noir et cercle blanc) sont greffés à chaque extrémité de la molécule d'ADN. Un signal de FRET permet alors d'obtenir des informations sur la structure de la biomolécule. Figure issue de [107].

conformation, un signal de FRET résolu en temps permet d'obtenir des informations sur la distribution des structures que présente l'ensemble du mélange réactionnel.

1. de toutes les mutations du HIV, celles où la structure de NCp7 change donnent lieu à un virus non infectieux.

5.1. Étude d'interactions bio-moléculaires

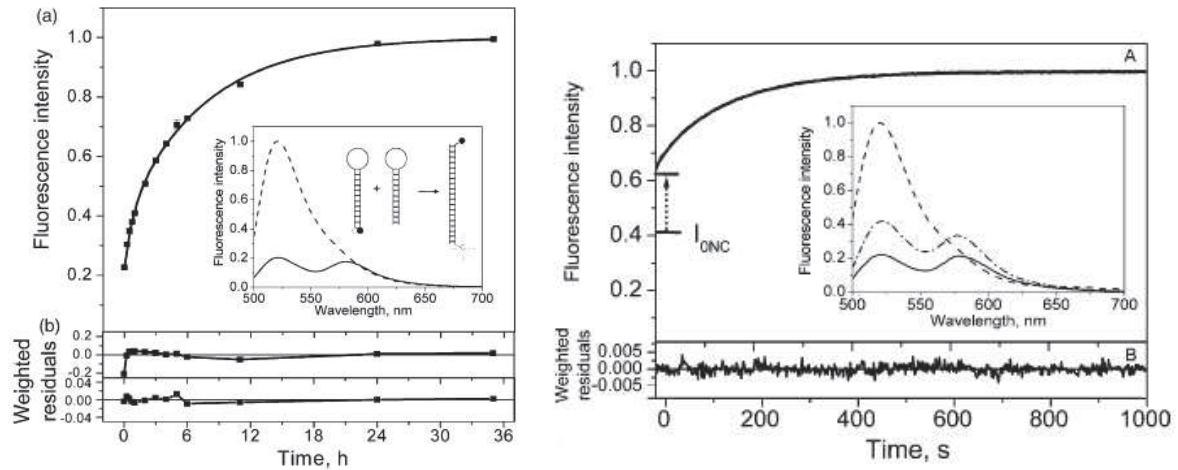


FIGURE 5.2 – Gauche : cinétique d'hybridation TAR-cTAR suivie par FRET, en absence de NCp7. La réaction est complète après 36 heures. En insert, les spectres de fluorescence de cTAR comportant une paire de FRET en absence de TAR (trait continu) et après hybridation avec TAR (trait pointillé) ainsi que la représentation schématique de l'hybridation sont représentés. Les résidus indiquent qu'un ajustement bi-exponentiel (résidus du bas) est meilleur qu'un ajustement mono-exponentiel (résidus du haut) de la cinétique. Droite : **A** Cinétique d'hybridation TAR-cTAR en présence de la protéine NCp7. Une flèche indique que la cinétique est trop rapide au départ pour être résolue. I_{ONC} désigne l'intensité de fluorescence de cTAR en présence de NCp7 et en absence de TAR. **B** Résidus du meilleur ajustement de la cinétique. Insert : spectres de fluorescence de cTAR en absence de TAR et NCp7 (trait continu), en présence de NCp7 (trait mixte) et après hybridation (trait pointillé). On observe que la réaction d'hybridation en présence de NCp7 est effectuée en 10 minutes, contre 36 heures en l'absence de NCp7. Figures issues de [60].

Les cinétiques de déstabilisation de cTAR et/ou d'hybridation TAR-cTAR en présence de la protéine chaperonne NCp7 pourraient être étudiées par fluorescence résolue en temps dans les dispositifs microfluidiques. L'expérience de complexation PBV – BSA indique qu'il serait possible de mesurer l'évolution de sous-populations conformationnelles des complexes cTAR – NCp7 ou TAR – cTAR en fonction du temps. De plus, la figure 5.2 (droite) indique qu'une partie de la cinétique n'est pas résolue. Elle le serait grâce à la microfluidique.

5.1.2 Complexes organo-métalliques à base de Ruthénium liés à l'ADN

Des composés organo-métalliques à base de ruthénium se lient à l'ADN par différents modes de liaison (intercalation, insertion, *groove-binding*) [108] et ont des applications anti-cancer ou diagnostiques [109, 110]. Les études des propriétés spectroscopiques du composé $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (RBD) (bpy = bipyridine, dppz = dipyridophenazine) montrent une augmentation de sa fluorescence une fois intercalé dans la structure de l'ADN [111]. Le composé RBD peut également s'insérer à la place de paires de base de l'ADN, et présente alors également une fluorescence plus importante. Cette propriété peut être utilisée dans le diagnostic de la déficience du *mismatch repair*², car le RBD s'insère préférentiellement à la place des paires de base mal appariées [112]. L'étude par fluorescence résolue en temps permettrait d'obtenir des informations plus spécifiques sur l'insertion en cas d'hétérogénéités structurales (modes de liaison multiples et simultanés) [113]. En effet, les étapes cinétiques entrant en jeu dans le processus d'insertion, impliquant l'extrusion de paires de bases de l'ADN, possèdent probablement une signature très différente que celles de l'intercalation.

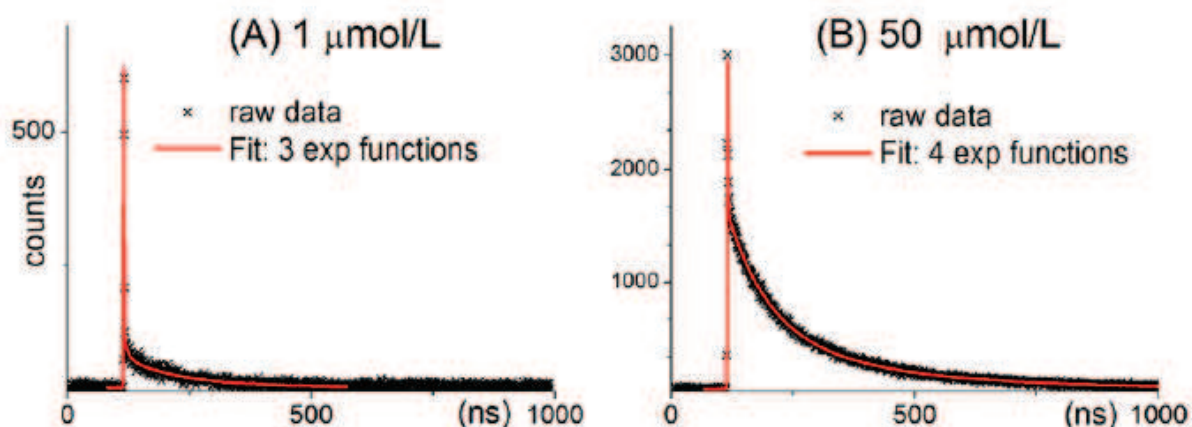


FIGURE 5.3 – Fluorescence résolue en temps du $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ à la concentration de (A) $1 \mu\text{M}$ et (B) $50 \mu\text{M}$, en présence d'une séquence de 15 paires de bases d'ADN à une concentration de $1 \mu\text{M}$. Mesures préliminaires par l'équipe de P. Hébraud, IPCMS.

Le composé $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$, assez similaire au RBD (phen = phenanthroline), présente des hétérogénéités structurales, d'après Biver *et al.* [31]. Ces derniers ont mesuré la

2. Réparation des mésappariements. La déficience du *mismatch repair* est connue pour être à l'origine de certains cancers.

5.2. Mesure de fluorescence de gouttes uniques par comptage de photons corrélés en temps

cinétique d'association du complexe organo-métallique avec l'ADN en utilisant un appareil de *stopped-flow* détectant un changement de l'absorption. La cinétique observée sur une échelle 10 – 100 ms est intéressante pour une étude de fluorescence résolue en temps dans les dispositifs microfluidiques. Ces propriétés sont probablement similaires pour le composé RBD, étudié par l'équipe de Pascal Hébraud à l'IPCMS. Ils ont obtenu des résultats préliminaires sur la fluorescence résolue en temps du RBD lié à l'ADN, voir figure 5.3.

La fluorescence résolue en temps présentée figure 5.3 montre que la fluorescence du composé de RBD augmente lorsqu'il est lié à l'ADN. Elle montre également que le déclin est multi-exponentiel, preuve d'hétérogénéité structurale et que les mesures pourraient être améliorées avec une résolution meilleure, grâce à la caméra à la balayage de fente.

5.2 Mesure de fluorescence de gouttes uniques par comptage de photons corrélés en temps

Les expériences associant microfluidique et mesure de fluorescence résolue en temps présentées dans les chapitres précédents ont été réalisées en enregistrant le signal durant un temps tel qu'un nombre important de gouttes y contribue. Par exemple, pour une acquisition de dix minutes et un débit produisant mille gouttes par secondes, l'intégration du signal de fluorescence provient de six cent mille gouttes. L'information provenant d'une seule goutte n'est donc pas obtenue, au profit d'un signal moyen. La fréquence de production et leur taille (environ cinquante micromètres en moyenne) permettent la détection d'un signal de fluorescence à l'aide d'une photodiode suffisamment rapide et d'un laser suffisamment focalisé, et ce pour une goutte unique. Afin de mesurer une durée de vie de fluorescence, nous avons implémenté la détection de photons uniques par *Time Correlated Single Photon Counting* au sein de gouttes uniques grâce à la collaboration avec Wilfried Uhring, expert en électronique et imagerie ultrarapides [114] et Norbert Dumas, chercheur en micro-électronique, de l'institut ICUBE de Strasbourg. Les expériences préliminaires présentées dans cette section ont conduit au dépôt d'un brevet [46].

5.2.1 Motivation

Cette innovation technologique, faisant l'objet d'un brevet que nous avons déposé en octobre 2013 [46], permet d'envisager une application dans le domaine du criblage à haut débit (CHD). Le criblage est une technique permettant de tester l'interaction d'une biomolécule cible avec un grand nombre de molécules médicament candidates regroupées dans des "chimiothèques". Il s'agit le plus souvent de petites molécules, c'est-à-dire dont la masse molaire est inférieure ou environ égale à 250 g/mol. La biomolécule en question

a préalablement été identifiée comme cible thérapeutique potentielle, comme par exemple une protéine dans une pathologie définie. Le criblage est dit à haut débit car des robots manipulant de façon automatisée un grand nombre de réservoirs de faible volume (quelques microlitres dans des micropuits disposés sur des microplaques) sont utilisés. La microfluidique représente une technologie prometteuse pour le CHD : la manipulation et la mesure de picolitres à l'échelle kHz permet d'envisager le test de 10^8 échantillons par jour [115]. Miller *et al.* ont démontré la possibilité de mesurer une relation dose-réponse dans des gouttes microfluidiques, afin d'étudier une protéine cible pour le diabète, l'obésité, et le cancer [116].

Dans un certain nombre d'applications, la mesure d'intensité de fluorescence permet de déterminer la liaison ou non de la biomolécule avec les molécules candidates [117, 118, 119]. Cependant, les applications actuelles se basent sur la détection d'intensité de fluorescence. Or un changement d'intensité de fluorescence peut venir de fluctuations de l'excitation lumineuse ou de concentrations, alors que la mesure de cinétiques résolues en temps permettent de mesurer les propriétés intrinsèques des molécules étudiées. C'est le principe utilisé pour la microscopie FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) : la mesure d'une durée de vie de fluorescence permet de mesurer les interactions de molécules entre elles et de s'affranchir des paramètres extérieurs [17, 120]. La mesure de fluorescence résolue en temps dans une application de criblage permet donc de réduire les taux de « faux positifs » ou « faux négatifs », causés par des fluctuations extrinsèques aux molécules étudiées [121]. De plus, Cornea *et al.* montrent que le coefficient de variation³ entre les puits de criblage décroît d'un facteur 20 en utilisant la fluorescence résolue en temps plutôt que l'intensité de fluorescence [121].

5.2.2 Montage expérimental et principe de la mesure

Le montage optique réalisé est présenté figure 5.6. Un faisceau laser est focalisé dans les dispositifs microfluidiques grâce à un objectif $\times 40$. Le diamètre du faisceau focalisé est inférieur à celui des gouttes microfluidiques. Les objectifs et le miroir dichroïque sont disposés de la même manière que pour les expériences décrites dans les chapitres précédents. Un miroir dichroïque réfléchit l'excitation et transmet la fluorescence, imagée sur une photodiode appelée SPAD, *Single Photon Avalanche Diode*, une diode à avalanche détectant des photons uniques. L'excitation résiduelle est supprimée par un filtre interférentiel. Un générateur de fonctions délivre un signal carré de 50 MHz à la carte électronique de pilotage d'une diode laser afin qu'elle délivre des impulsions laser à 450 nm [122]. Le signal délivré par la SPAD est traité par un oscilloscope 6 GHz (LeCroy) détectant les fronts montants du signal délivré par le générateur de fonctions. Les mesures ont été réalisées

3. Le coefficient de variation est défini comme le rapport de la déviation standard sur la moyenne. En statistique, il peut servir à déterminer un intervalle de confiance autour de la moyenne.

5.2. *Mesure de fluorescence de gouttes uniques par comptage de photons corrélés en temps*

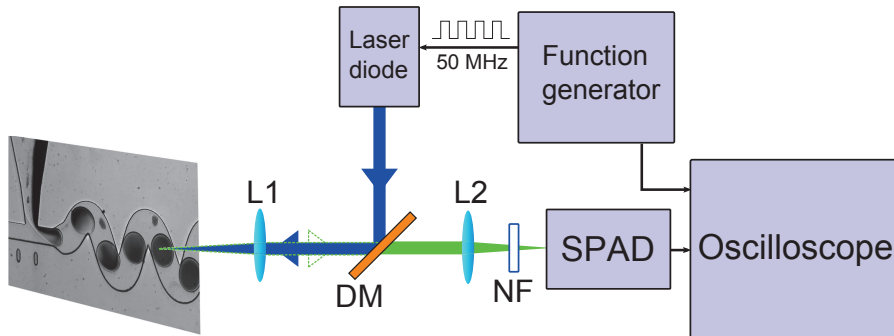


FIGURE 5.4 – Schéma du dispositif expérimental permettant de détecter des photons uniques de fluorescence dans des gouttes uniques. L1 permet de focaliser le faisceau laser et de collecter la fluorescence. L2 focalise la fluorescence sur la SPAD. DM : miroir dichroïque. NF : *Notch Filter*, filtre interférentiel coupant la longueur d'onde 450 nm.

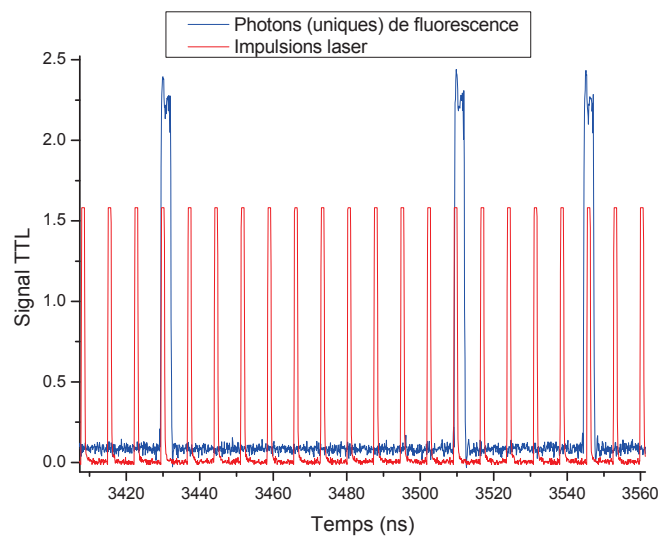


FIGURE 5.5 – Mesure de photons provenant de gouttes uniques (en bleu). L'écart temporel entre les photons de fluorescence et le signal carré du générateur de fonctions (en rouge) sert à reconstruire les déclins de fluorescence résolue en temps sous forme d'histogrammes, voir figure 5.7.

en exploitant la mémoire maximale de l'oscilloscope, 10 MegaSamples (MS = millions d'échantillons). La fréquence d'échantillonnage varie entre 2 et 20 GS/s (GigaSamples

par seconde), c'est-à-dire une période d'échantillonnage de 500 à 50 picosecondes.

Le temps d'arrivée des photons par rapport aux impulsions laser est mesuré. La figure 5.5 représente les deux signaux échantillonnés par l'oscilloscope. Le signal carré du générateur de fonctions est envoyé sur la voie 1 (en rouge sur la fig. 5.5) et en voie 2 le signal carré mis en forme délivré par la SPAD pour chaque photon détecté (en bleu sur la fig.5.5).

L'écart temporel entre le signal d'un photon et l'impulsion laser correspondante sert à construire un histogramme des temps d'arrivée des photons, c'est le principe du comptage de photons uniques corrélés en temps, TCSPC, introduit partie 2.3 (figure 2.7). L'analyse des données permettant la création des histogrammes est effectuée après l'acquisition des données par des programmes Matlab.

5.2.3 Résultats

Afin de caractériser les performances de la technique, nous avons mesuré la fonction de réponse instrumentale (IRF) en analysant le signal obtenu en détectant une réflexion du laser dans la SPAD. Le résultat est une largeur à mi-hauteur de 200 ps, déterminant la limite de la résolution temporelle des mesures. L'IRF est vraisemblablement limitée par la durée d'impulsion produite par la diode laser.

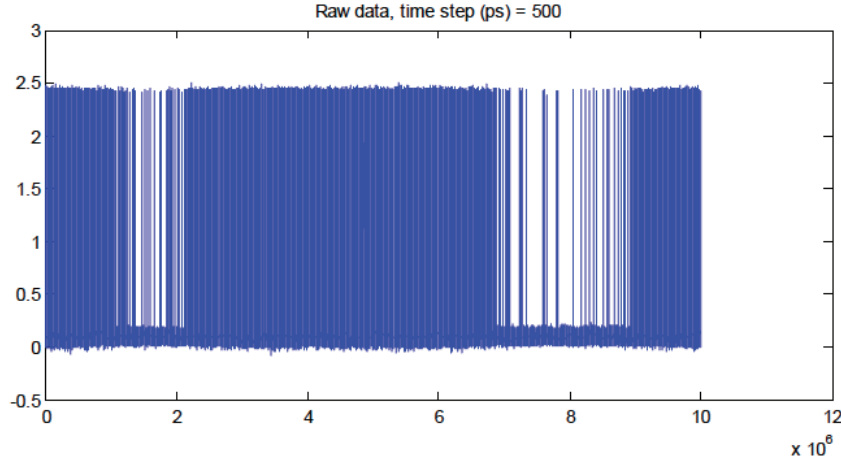


FIGURE 5.6 – Enregistrement d'événements sur une fenêtre de $10^7 \times 500$ ps. En appliquant une moyenne glissante sur 10 microsecondes, on peut détecter le passage des gouttes. Ici, on voit une goutte au centre encadrée d'une partie de la précédente et de la suivante. On détecte également un signal résiduel entre les gouttes, provenant de photons d'excitation mal filtrés ou de la fluorescence résiduelle des dispositifs microfluidiques (lame de verre, PDMS).

5.2. Mesure de fluorescence de gouttes uniques par comptage de photons corrélés en temps

Des expériences préliminaires nous ont permis de mesurer la durée de vie de fluorescence de la fluorescéine et de nous assurer que le temps de déclin d'environ 4.1 ns était bien retrouvé. Pour évaluer la sensibilité de la mesure, nous avons également mesuré le signal provenant de gouttes où la fluorescence de la fluorescéine est inhibée, donc avec un déclin plus rapide. Pour ce faire, nous avons injecté dans les dispositifs microfluidiques une solution de fluorescéine relativement faiblement concentrée ($0.3 \mu\text{M}$) préalablement mélangée avec 0.5 M d'ions I^- . On observe les photons uniques provenant des gouttes, ainsi que les photons parasites (fond) entre les gouttes, comme montré figure 5.6.

220 histogrammes issus de 220 gouttes à environ 1400 photons par goutte ont été construits. La figure 5.7 présente l'histogramme obtenu pour une seule goutte à gauche et l'ajustement par une fonction mono-exponentielle de la forme de l'équation (2.50) est montré à droite.

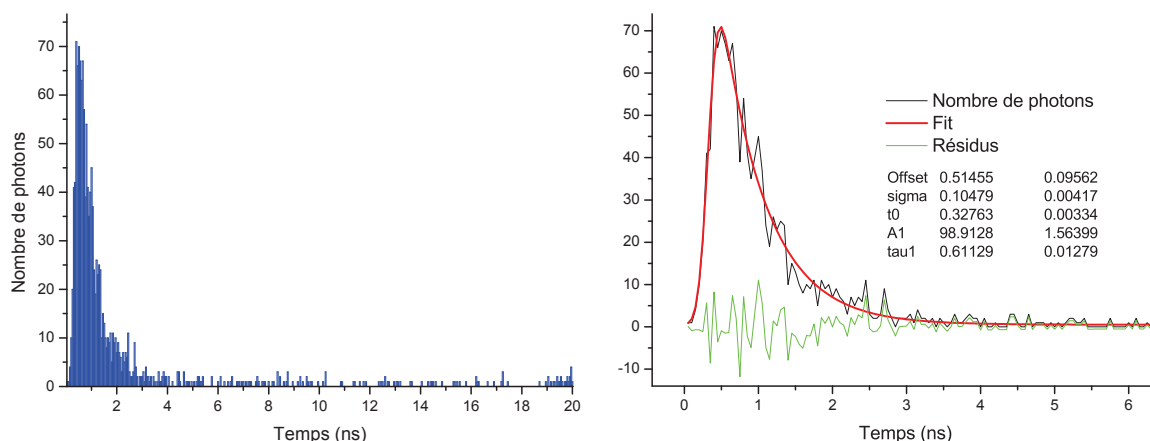


FIGURE 5.7 – Gauche : histogramme reconstruit d'une mesure de 1400 photons provenant d'une goutte contenant $0.3 \mu\text{M}$ de fluorescéine et 0.5 M d'ions I^- . Droite : ajustement mono-exponentiel (en rouge) du déclin correspondant à l'histogramme de gauche, représenté en noir. Les résidus sont tracés en vert. Le temps de déclin mesuré est de 611 ± 13 ps. L'écart-type de la gaussienne convoluant le signal est 105 ± 4 ps. La largeur à mi-hauteur correspondante est $2\sqrt{2 \ln 2} \sigma \approx 250$ ps.

5.2.4 Conclusion

L'utilisation d'une électronique sensible et rapide (SPAD et oscilloscope 6 GHz) ont permis d'acquérir des signaux de fluorescence résolue en temps dans des gouttes uniques. Des concentrations aussi réduites que $0.3 \mu\text{M}$ de fluorescéine, dont la fluorescence est de surcroît inhibée par une forte concentration d'ions iodure ont été détectée. La diode laser utilisée possède une durée d'impulsion bien supérieure et une puissance bien inférieure à celles d'un système laser tel que celui utilisé dans les expériences décrites précédemment. Cependant, la finalité de cette expérience n'est pas de mesurer des déclins de fluorescence afin de détecter des inhomogénéités de structures biomoléculaires (comme dans le chapitre précédent) mais de déterminer une durée de vie moyenne de fluorescence sur chaque goutte individuelle circulant à la fréquence typique due 1 kHz à travers le spot lumineux exciteur.

La perspective à moyen terme de cette application est de réduire la taille et le coût du matériel employé afin de tendre vers un « laboratoire sur puce » (*lab on a chip*). Cela a déjà été réalisé partiellement par l'utilisation d'une diode laser à la place du système laser utilisé lors les expériences décrites dans des chapitre précédents et permettant une résolution plus grande des signaux de fluorescence. La suite de ces développements consistera à remplacer l'oscilloscope par un système intégré nommé *time to digital converter*, développé par les chercheurs de Icube (W. Uhring *et al.*) et qui pourra produire pour chaque photon détecté le temps d'arrivée de celui-ci par rapport à l'impulsion laser précédente. Le traitement en temps réel des données grâce à une carte FPGA (*field-programmable gate array*) pourra par ailleurs remplacer avantageusement l'analyse *a posteriori* par Matlab. Avec ce dispositif, l'information sur la durée de vie de fluorescence longue ou courte pourra être connue juste après le passage d'un certain nombre de gouttes, nombre dépendant de la concentration en espèces fluorescentes détectées.

Conclusion

Ce travail de thèse a eu pour but de mesurer des cinétiques biomoléculaires hors d'équilibre dans des écoulements microfluidiques. Le développement du savoir-faire relatif à la fabrication et à l'utilisation des dispositifs microfluidiques a constitué une part importante du travail. L'aspect innovant des manipulations en spectroscopie a été d'imager la fluorescence provenant des micro-canaux sur la largeur d'une photocathode d'une caméra à balayage de fente. Ceci a notamment permis de caractériser avec précision le temps de mélange au sein des micro-réacteurs aqueux, en mesurant le quenching dynamique de la fluorescéine par les ions iodure. Cette technique présente l'avantage de pouvoir mesurer en une acquisition plusieurs points dans les canaux, donc plusieurs états du milieu réactionnel. Elle a par ailleurs permis de mesurer une cinétique bi-moléculaire pour un système modèle colorant – protéine. Cette expérience a montré qu'il était possible de suivre la relaxation d'un complexe bi-moléculaire hors d'équilibre et d'observer l'évolution pendant le temps de réaction, de sous-populations caractérisées par leur contribution au signal de fluorescence résolu en temps, généralement multi-exponentiel [45]. En ce sens, on peut dire que l'objectif de ma thèse a été rempli, bien que l'étude de la molécule de Patent Blue qui se lie à la BSA se soit révélée relativement limitée en termes d'intérêt biologique.

Ces expériences associant la microfluidique de goutte à la mesure de fluorescence résolue en temps constituent la preuve de principe ouvrant la voie à des investigations sur des complexes moléculaires d'intérêt biologique, dans le domaine de la recherche sur des nouvelles thérapies contre le VIH ou le cancer.

Un autre aspect des voies que ce travail permet d'ouvrir concerne le développement d'une nouvelle technologie grâce à laquelle des photons uniques de fluorescence sont détectés dans des micro-gouttes uniques. Cette expérimentation faisant l'objet d'un brevet déposé à la toute fin de ma thèse peut trouver une application dans le domaine de la recherche pharmacologique. En effet, une telle technologie permet d'envisager un développement vers le criblage à haut débit [46].

Appendices

Annexe A

Spectroscopie d'absorption transitoire des molécules d'Alexa

L'équipe de Ben Schuler nous a proposé d'étudier les chromophores d'Alexa 488 et Alexa 594 par la méthode pompe-sonde. Cette technique de spectroscopie permet la mesure d'absorption transitoire avec une résolution sub-picoseconde. Plusieurs études utilisant un montage pompe-sonde ont été réalisées au sein de l'équipe BioDyn comme par exemple des études de la dynamique ultra-rapide de la rhodopsine, molécule responsable de la vision [24, 123] ou d'états à transfert de charge dans des molécules organiques pour des applications photovoltaïques [26].

A.1 Principe expérimental

Le principe de l'expérience est le suivant : un laser impulsionnel amplifié issu d'un oscillateur titane-saphir est séparé en deux faisceaux. L'un d'eux est focalisé dans un cristal de fluorure de calcium (CaF_2) pour générer un super-continuum de lumière blanche (sonde). L'autre est utilisé par un amplificateur paramétrique optique pour générer un faisceau dont on peut choisir la longueur d'onde, destiné à porter la molécule étudiée dans son état S_1 . Une ligne à délai ajustable, placée sur le trajet de la sonde, permet de contrôler le temps d'arrivée entre la pompe et la sonde. Le schéma de l'expérience pompe-sonde est présenté figure A.1.

Les deux faisceaux sont ensuite focalisés dans une cuve où circule la molécule en solution étudiée. Le spectre de transmission de la sonde est mesuré grâce à un spectrophotomètre et une caméra CCD. Grâce à un système de *choppers* (roues bloquant séquentiellement la lumière), la sonde est mesurée successivement avec et sans la pompe. On obtient finalement le spectre différentiel d'absorption ΔA , où se superposent les contributions du photo-blanchiment (*Ground State Bleaching*, GSB), de l'émission stimulée et

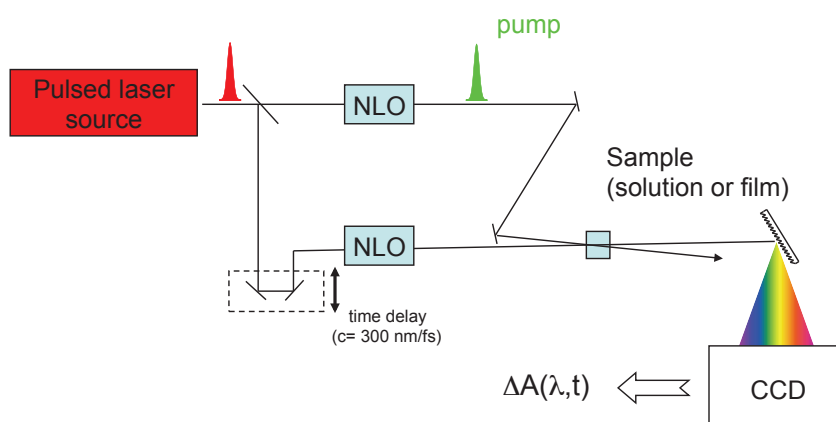


FIGURE A.1 – Montage expérimental de l'expérience pompe-sonde.

de l'absorption depuis le premier état excité (*Excited State Absorption*, ESA). Le GSB correspond à une augmentation de la transmission due à la promotion d'électrons de l'état fondamental vers l'état excité et l'émission stimulée entraîne la création de photons. À ces deux contributions correspondent donc un signal ΔA négatif. L'ESA au contraire implique l'apparition de nouveaux pics d'absorption où ΔA est positif.

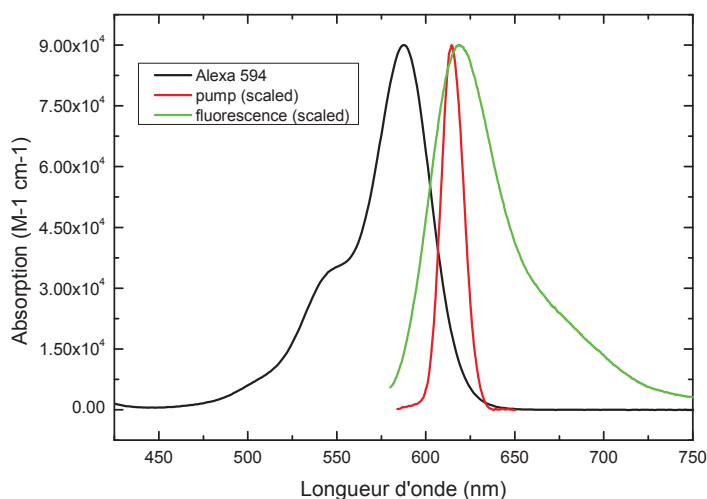


FIGURE A.2 – Spectres d'absorption et d'émission de la molécule d'Alexa 594. Le spectre d'absorption est exprimé en absorption molaire. Le spectre de la pompe représenté est celui utilisé lors de l'expérience sur Alexa 594. Le spectre du laser et la fluorescence ont été mis à l'échelle du spectre d'absorption.

A.2. Détermination des spectres d'absorption depuis l'état excité

Les molécules d'Alexa ont un rendement quantique élevé et une durée de vie dans l'état excité nettement supérieure à 100 ps. De plus, à cette échelle de temps, les phénomènes de relaxation vibrationnelle ou de relaxation thermique avec le solvant, intervenant avant la picoseconde, ont eu lieu : la molécule est vibrationnellement relaxée dans son état S_1 . Lors des expériences pompe-sonde réalisées, nous avons donc réglé la ligne à délai de telle sorte à ce que la sonde arrive 100 ps après la pompe. Les molécules d'Alexa étudiées ont été utilisées telles que préparées par Dominik Hänni, post-doctorant de l'équipe de Ben Schuler. Les spectres statiques d'absorption et de fluorescence pour la molécule d'Alexa 594 sont présentés figure A.2, ainsi que la longueur d'onde de laser utilisée pour l'expérience pompe-sonde.

A.2 Détermination des spectres d'absorption depuis l'état excité

Le spectre d'émission stimulée peut être déduit du spectre de fluorescence. D'après Strickler & Berg, qui définissent les coefficients d'Einstein pour les systèmes moléculaires [51], l'émission stimulée peut être vue comme une absorption négative, où le coefficient d'extinction molaire serait un coefficient de gain. Ainsi, le spectre d'émission stimulée $S_{SE}(\lambda)$ est obtenu à partir du spectre de fluorescence $S_F(\lambda)$ par la relation suivante :

$$S_{SE}(\lambda) = S_F(\lambda) \times \lambda^4 \quad (\text{A.1})$$

Sur la figure A.3, les spectres statiques correspondant au GSB et à l'émission stimulée sont représentés en négatif pour les superposer aux contributions supposées dans le signal d'absorption transitoire. Pour obtenir les spectres d'absorption de l'état excité, il faut trouver une combinaison linéaire entre les spectres transitoire ΔA , d'émission stimulée $S_{ES}(\lambda)$ et d'absorption statique $S_{GSB}(\lambda)$:

$$S_{ESA}(\lambda) = a \times \Delta A - b \times S_{GSB}(\lambda) - c \times S_{ES}(\lambda) \quad (\text{A.2})$$

et déterminer les coefficients positifs a , b et c .

Le spectre d'absorption statique est exprimé en unité d'extinction molaire ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$), pour pouvoir par la suite exprimer l'absorption depuis l'état excité (ESA) dans la même unité. D'après le travail de Strickler & Berg [51], comme l'absorption et l'émission stimulée sont issues du même moment dipolaire de transition, il existe une relation entre le coefficient d'absorptivité molaire $\varepsilon_{GSB}(\lambda)$ et un gain d'émission stimulée $\varepsilon_{SE}(\lambda)$ (voir équation (2.13)) :

$$\int \frac{-\varepsilon_{SE}(\lambda)}{\lambda} d\lambda = \int \frac{\varepsilon_{GSB}(\lambda)}{\lambda} d\lambda \quad (\text{A.3})$$

Ainsi, on a une relation entre l'absorption statique, dont la valeur est donnée par $\varepsilon_{594} = 9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour Alexa 594 par exemple, et l'émission stimulée. Les coefficients b et c de la combinaison linéaire, équation (A.2), sont donc déterminés. Le coefficient a est déterminé à la main pour que la partie de basse énergie ($> 525 \text{ nm}$ pour Alexa 488, voir figure A.3 (a) et $> 625 \text{ nm}$ pour Alexa 594, voir figure A.3 (b)) du spectre transitoire et d'émission stimulée se superposent le mieux possible. En d'autres termes, on a supposé que dans cette région de faible énergie, le spectre d'absorption transitoire contenait uniquement la contribution de l'émission stimulée.

On obtient donc les spectres d'absorption depuis le premier état excité, voir courbes rouges figure A.3.

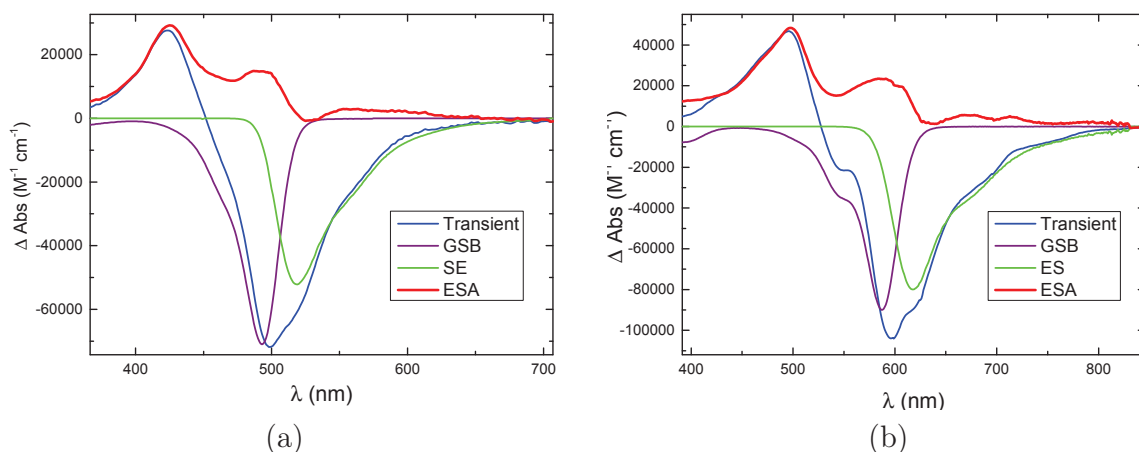


FIGURE A.3 – Résultats de l'expérience d'absorption transitoire sur les molécules d'Alexa 488 (a) et 594 (b). Dans les deux graphes, la courbe ΔA est représentée en bleu, les spectres statiques d'absorption (en violet) et d'émission stimulée (en vert) sont représentés en négatif pour reproduire les contributions présentes de le spectre d'absorption différentielle. Le résultat de la combinaison linéaire des trois et représentant le spectre d'absorption depuis l'état excité est représenté en rouge. Le coefficient a vaut 0.95 pour Alexa 488 et 0.97 pour Alexa 594. Les spectres d'absorption transitoire représentés sont multipliés par ces valeurs.

Il est à présent possible de déterminer le recouvrement entre les spectres d'ESA et les spectres de fluorescence : figure A.4. On constate en premier lieu que les spectres d'ESA d'Alexa 488 et de fluorescence d'Alexa 594 ne se superposent pas.

A.4. Discussion

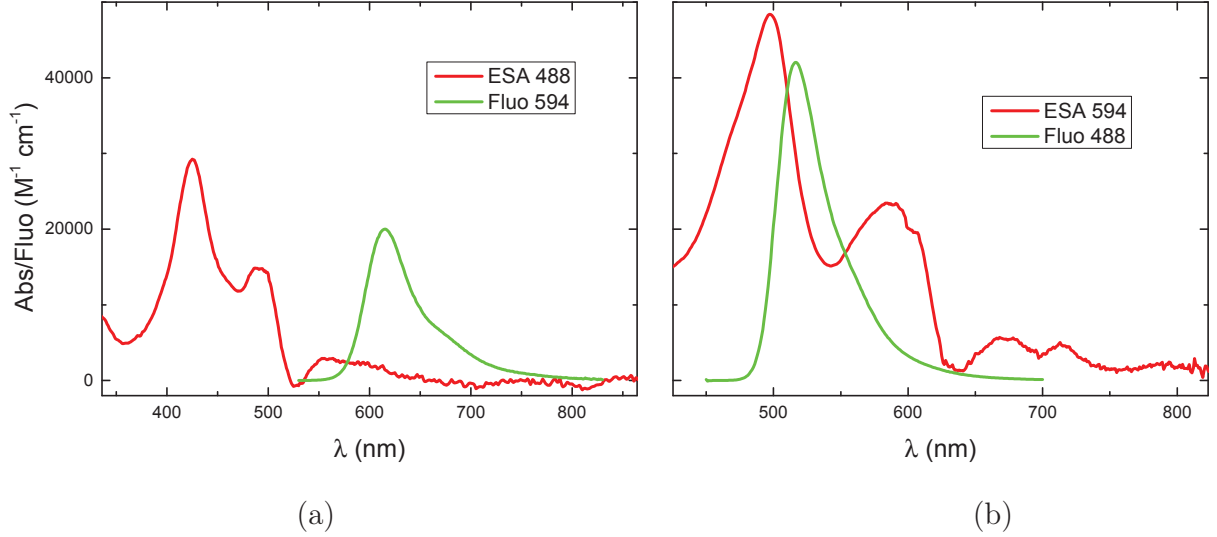


FIGURE A.4 – Comparaison des spectres (a) d’ESA d’Alexa 488 et de fluorescence d’Alexa 594 et (b) d’ESA d’Alexa 594 avec la fluorescence d’Alexa 488. Les spectres de fluorescence sont mis à l’échelle des spectres d’ESA. On constate que les spectres d’ESA d’Alexa 488 et de fluorescence d’Alexa 594 ne se superposent pas.

A.3 Discussion

L’équipe de Ben Schuler a réalisé des expériences de FCS, *Fluorescence Correlation Spectroscopy* [124, 125], afin de déterminer le taux de transfert par annihilation d’électrons singulet-singulet (SSA, *Singlet-Singlet Annihilation*) par rapport au taux de transfert par FRET. Ceci est réalisé en calculant les coefficients J et J_{SSA} de recouvrements spectraux d’une part entre la fluorescence du donneur $f_{\text{D}}(\lambda)$ et l’absorption de l’accepteur $\epsilon_{\text{A}}^{(\text{ESA})}(\lambda)$ et d’autre part entre le spectre d’ESA d’Alexa 488 et la fluorescence d’Alexa 594 et entre spectre d’ESA d’Alexa 594 avec la fluorescence d’Alexa 488 :

$$J_{(\text{SSA})} = \int_0^{+\infty} f_{\text{D}}(\lambda) \epsilon_{\text{A}}^{(\text{ESA})}(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (\text{A.4})$$

avec $\int_0^{+\infty} f_{\text{D}}(\lambda) d\lambda = 1$.

Le rapport J_{SSA}/J trouvé par l’équipe de B. Schuler est de 0.78. Le rapport trouvé grâce aux spectres obtenus par mesure d’absorption transitoire est de 0.87 et est donc en excellent accord avec le résultat obtenu par FCS.

A.4 Conclusion

Grâce à la mesure d'absorption transitoire sur les molécules composant la paire de FRET Alexa 488 – Alexa 594, nous avons confirmé qu'il pouvait exister un transfert d'énergie entre Alexa 488* et Alexa 594*, en plus du transfert d'énergie vers Alexa 594 (l'astérisque marque l'état excité). Il n'y a pas de recouvrement entre les spectres d'état excité d'Alexa 488 et de fluorescence d'Alexa 594, donc pas de transfert possible.

Annexe B

Convolution d'une somme d'exponentielles avec une gaussienne

B.1 Somme d'exponentielles convoluée par un gaussienne

Le signal de fluorescence résolu en temps $F(t)$ est ajusté par une somme d'exponentielles, convoluée par la fonction de réponse instrumentale $R(t)$:

$$F(t) = \left\{ A_0 + H(t) \times \left(\sum A_i e^{-t/\tau_i} \right) \right\} \otimes R(t - t_0) \quad (\text{B.1})$$

où A_0 représente un offset éventuel aux temps négatifs, $H(t)$ est la fonction de Heaviside ($H(t) = 0$ pour $t < 0$; $H(t) = 1$ pour $t \geq 0$). À chaque constante de temps τ_i est associée une amplitude A_i .

Si on suppose que la fonction de réponse $R(t)$ est une gaussienne normalisée d'écart-type σ :

$$R(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma^2}\right),$$

alors la convolution peut être calculée analytiquement, en utilisant la fonction d'erreur (error function, $\text{erf}(t)$) :

$$\text{erf}(t) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^t e^{-u^2} du = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_{-t}^0 e^{-u^2} du = -\text{erf}(-t).$$

La convolution peut s'écrire de la façon suivante :

$$\Delta A(t) = A_0 + \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} H(t') \sum A_i \exp\left(-\frac{t'}{\tau_i}\right) \exp\left(-\frac{(t - t_0 - t')^2}{2\sigma^2}\right) dt'. \quad (\text{B.2})$$

L'argument des fonctions exponentielles peut être récrit pour chaque i :

$$\begin{aligned}
 -\frac{t'}{\tau_i} - \frac{(t-t_0-t')^2}{2\sigma^2} &= -\frac{1}{2\sigma^2} \left((t-t_0)^2 - 2t'(t-t_0 - \sigma^2/\tau_i) + t'^2 \right) \\
 &= -\frac{1}{2\sigma^2} \left((t-t_0)^2 + (t-t_0 - \sigma^2/\tau_i - t')^2 - (t-t_0 - \sigma^2/\tau_i)^2 \right) \\
 &= -\frac{(t-t_0 - \sigma^2/\tau_i - t')^2}{2\sigma^2} - \frac{t-t_0}{\tau_i} + \frac{\sigma^2}{2\tau_i^2}.
 \end{aligned}$$

En effectuant le changement de variable $X = t' - (t-t_0 - \sigma^2/\tau_i)$, la convolution (B.2) devient :

$$F(t) = A_0 + \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \sum A_i e^{\frac{\sigma^2}{2\tau_i^2}} e^{-\frac{t-t_0}{\tau_i}} \int_{-\infty}^{+\infty} H(X + (t-t_0 - \sigma^2/\tau_i)) \exp\left(-\frac{X^2}{2\sigma^2}\right) dX.$$

Il faut donc calculer :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} H(X + (t-t_0 - \sigma^2/\tau_i)) \exp\left(-\frac{X^2}{2\sigma^2}\right) dX \quad (\text{B.3})$$

$$= \int_{-(t-t_0-\sigma^2/\tau_i)}^{+\infty} \exp\left(-\frac{X^2}{2\sigma^2}\right) dX \quad (\text{B.4})$$

$$= \int_{-(t-t_0-\sigma^2/\tau_i)}^0 \exp\left(-\frac{X^2}{2\sigma^2}\right) dX + \int_0^{+\infty} \exp\left(-\frac{X^2}{2\sigma^2}\right) dX \quad (\text{B.5})$$

$$= \sigma\sqrt{2} \int_{-\frac{t-t_0-\sigma^2/\tau_i}{\sigma\sqrt{2}}}^0 \exp(-Y^2) dY + \frac{1}{2} \sigma\sqrt{2\pi} \quad (\text{B.6})$$

$$= \frac{\sigma\sqrt{2\pi}}{2} \left\{ \operatorname{erf}\left(\frac{t-t_0 - \sigma^2/\tau_i}{\sigma\sqrt{2}}\right) + 1 \right\} \quad (\text{B.7})$$

Enfin :

$$F(t) = A_0 + \sum_i \left\{ \frac{A_i}{2} \exp\left(\frac{\sigma^2}{2\tau_i^2}\right) \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau_i}\right) \times \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t-t_0 - \sigma^2/\tau_i}{\sigma\sqrt{2}}\right) \right] \right\}. \quad (\text{B.8})$$

B.2. *Cas d'une composante non résolue*

B.2 Cas d'une composante non résolue

Nous nous intéressons au cas où le système étudié présente une composante τ beaucoup plus courte que le temps de résolution σ : $\tau \ll \sigma$.

Dans la convolution, éq. (B.2), la fonction exponentielle prend des valeurs non nulles sur un intervalle de quelques fois τ autour de $t' = 0$ (ou $t' = \tau$). Sur cet intervalle, la fonction de réponse instrumentale varie très peu, et peut être approximée par un développement de Taylor :

$$\text{avec } f(t') = \exp\left(-\frac{(t-t_0-t')^2}{2\sigma^2}\right) \quad (\text{B.9})$$

$$\begin{aligned} f(t') &= \exp\left(-\frac{(t-t_0-\tau)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (\text{B.10}) \\ &\times \left(1 + \frac{t-t_0-\tau}{\sigma^2}(t'-\tau) + \frac{(t-t_0-\tau)^2 - \sigma^2}{2\sigma^4}(t'-\tau)^2 + \mathcal{O}((t'-\tau)^3)\right) \end{aligned}$$

Ainsi, on peut écrire la convolution de la façon suivante :

$$\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} H(t') A \exp\left(-\frac{t'}{\tau}\right) \exp\left(-\frac{(t-t_0-t')^2}{2\sigma^2}\right) dt' \quad (\text{B.11})$$

$$= \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}\right) \int_0^{+\infty} \exp\left(-\frac{t'}{\tau}\right) \left(1 + \frac{t-t_0}{\sigma^2}t' + \dots\right) dt' \quad (\text{B.12})$$

En remarquant que pour $n \geq 0$:

$$\int_0^{+\infty} t'^n \times \exp\left(-\frac{t'}{\tau}\right) dt' = n! \tau^{n+1}, \quad (\text{B.13})$$

la convolution devient :

$$A \tau \times \left(1 + \frac{(t-t_0)}{\sigma^2}\tau + \frac{(t-t_0)^2 - \sigma^2}{\sigma^4}\tau^2 + \dots\right) \times \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (\text{B.14})$$

En conclusion, la fonction de réponse instrumentale est simplement multipliée par l'aire $A \times \tau$ de la composante courte non résolue, avec un facteur de correction tendant vers 1 pour des τ/σ tendant vers 0.

Chapitre B. *Convolution d'une somme d'exponentielles avec une gaussienne*

Annexe C

Dispositifs microfluidiques

C.1 Fabrication

C.1.1 Procédé de photolithographie en salle blanche

Une salle blanche est un environnement dont l'air est "propre", ce qui veut dire qu'il est filtré et renouvelé en permanence. La lumière est par ailleurs privée de rayons UV à cause des résines employées qui y sont sensibles. A l'IPCMS, il existe deux salles blanches. L'une est de classe 1000, l'autre de classe 100000. La classe x signifie qu'il doit y avoir moins de x particules par pied au cube (norme américaine). La salle blanche de classe 100000 est appelée familièrement salle grise, car moins propre. Ce qui suit est une énumération des détails techniques de l'étape de fabrication du patron, mentionnée dans le chapitre 3. Cette recette vaut pour la fabrication de canaux de hauteur $50 \mu\text{m}$, donc l'utilisation de la résine SU8-2050 est requise. La résine SU-2015 permet de déposer des hauteurs de résine plus faibles ($\sim 15\text{-}20 \mu\text{m}$).

1. Chauffage d'un wafer (plaque) de silicium à $T > 100^\circ \text{C}$ pour éliminer l'eau, qui peut empêcher la résine d'adhérer.
2. Dépôt du wafer sur le *spin-coater* (tournette) et coulage de la résine sur environ la moitié du wafer. Pour la résine SU8-2050 et l'épaisseur recherchée, la recette de *spin-coat* est la suivante : 500 tr/min pendant 5 s puis 3000 tr/min pendant 30 s. Pour la résine SU8-2015 : 500 tr/min pendant 5 s puis 2500 tr/min pendant 30 s.
3. Chauffage du wafer enrésiné à 65°C pendant 3 minutes puis 95°C pendant 7 minutes sur plaque chauffante.
4. Après attente d'environ 5 minutes, pour que la résine n'adhère pas au masque, insolation. Suivant la puissance surfacique de l'illumination, variable selon les machines (MJB4 en salle blanche : 14 mJ/cm^2 ; MJB3 en salle grise : 13 mJ/cm^2) et selon

l'épaisseur de la résine, le temps d'exposition varie. En salle blanche, il faut illuminer 13 secondes. La disposition du masque est importante car comme il s'agit d'une plaque transparente imprimée d'un côté uniquement, il faut mettre le côté de l'encre contre le wafer pour éviter la diffraction qui interviendrait dans le cas contraire. La diffraction entraîne une perte de résolution dans la lithographie.

5. Chauffage 2 minutes à 65 ° C et 6 minutes à 95 ° C.
6. Développement, 7 minutes : *SU8-developer* + isopropanol. S'il reste de la résine à développer, l'isopropanol laisse des traces blanches à son passage et il faut remettre le wafer dans le *SU8-developer* quelques minutes pour enlever le reste de résine.
7. Chauffage de consolidation : 150 ° C pendant 5 minutes (donnée constructeur). Si c'est plus chaud et plus longtemps, on a plus de chance que le patron conserve ses motifs durablement, on préfère donc chauffer à 200 ° C pendant deux heures, par exemple.

Selon les conditions, il est possible que les motifs en résine se détachent de la plaque de silicium pendant l'étape de développement. Les paramètres peuvent donc être optimisés. La meilleure solution est souvent d'exposer un peu plus longtemps que les 13 secondes indiquées (~1 minute).

C.1.2 Moulage du PDMS

Le moulage du PDMS peut être réalisé dans la salle blanche ou en dehors.

1. Déposition du wafer dans une boîte de Petri, qui peut être en plastique ou en verre.
2. Fabrication du PDMS :
 - (a) Mélange 10 : 1 du PDMS avec son agent durcisseur ("curing agent") dans un gobelet. Il faut mélanger énergiquement.
 - (b) Coulage du PDMS dans la boîte de Petri avec le wafer.
 - (c) Dégazage dans enceinte à vide : le PDMS versé et agité a formé des bulles d'air qu'il faut enlever pour éviter toute déformation des canaux.
 - (d) Une fois l'air extrait du PDMS : chauffage à 65 ° C dans étuve pendant 1 heure pour faire durcir le PDMS (qui reste néanmoins souple).
3. Découpage du PDMS au scalpel ou au cutter autour de la zone d'intérêt et démoulage de la future puce.
4. Trous au niveau des entrées pour y raccorder des tuyaux effectués grâce à une aiguille à biopsie (appelée aussi "punch"). Une carotte de PDMS est extraite et cette étape est critique car il y a un risque d'éclatement du PDMS et de formation d'une fissure. L'éclatement peut être dû à un mélange du PDMS avec son agent durcisseur mal

C.1. Fabrication

ajusté : mélange 9 : 1 parfois aussi utilisé mais PDMS plus rigide et plus cassant. Il peut aussi être dû à la vieillisse de l'aiguille à biopsie, qui doit alors être changée. Une fissure peut être source de fuites à l'interface PDMS/tuyau. Ultérieurement, pour le câblage : utilisation de diamètres des tuyaux supérieurs aux diamètres des trous afin d'assurer l'étanchéité du raccord (voir section C.1.4).

C.1.3 Finalisation du dispositif microfluidique

1. Nettoyage du morceau de PDMS (futur chip) : application de bande adhésive, puis éthanol et soufflage à l'azote sec (N_2). Nettoyage d'une lame de microscope : éthanol ou acétone puis N_2 .
2. Activation plasma (machine diener electronic Femto) : pompage à vide 30 secondes, introduction oxygène pendant 20 secondes. Plasma à puissance 2.5 pendant 30 secondes. Puis assemblage en appliquant une pression modérée sur les deux parties. **Attention** : l'activation plasma consiste à arracher des électrons à la surface du PDMS et du verre, afin que des liaisons covalentes se créent. L'assemblage PDMS-verre doit donc être réalisé dans la minute qui suit l'activation, car les liaisons covalentes se recréent en surface et le scellement n'est plus possible.
3. Chauffage à $65^\circ C$ pendant 3 à 5 minutes dans étuve ou sur plaque chauffante à $100^\circ C$ pendant 10 minutes pour consolider le collage.
4. Traitement hydrophobe : injection par seringue et tuyau de 1% de 1H,1H,2H,2H-perfluorodiméthyltrichlorosilane, dilué dans l'huile (perfluorodecanaphtaleine). Puis rinçage air sec (N_2). Il peut arriver que le liquide ne passe pas dans le canal de relaxation car il emprunte les entrées destinées au fluides aqueux, moins longs et présentant donc une résistance hydrodynamique plus faible. Il peut être utile de créer une dépression grâce à une seringue vide et un tuyau connectés à la sortie du dispositif, afin que tout le canal soit traité.

C.1.4 Matériel pour la mise en œuvre expérimentale

L'huile utilisée lors de la production des gouttes est celle utilisée par l'équipe de R. F. Ismagilov *et al.* : il s'agit d'un mélange au rapport 10 : 1 (volume/volume) de perfluorodecanaphtaleine (PFD, Alfa Aesar) avec du perfluorooctanol (surfactant, Alfa Aesar). Le choix du PFD est justifié par le fait qu'il ne provoque pas le gonflement du PDMS, contrairement aux huiles hydrocarbonées. Par ailleurs, le PFD est bio-compatible [35]. Les fluides sont injectés grâce des seringues de 1 mL (Braun) et des tubes en Poly-(tetrafluoroethylene) ou Teflon (PTFE) (Fisher Bioblock) de diamètre interne 0.56, \emptyset externe 1.07 mm, raccordés aux seringues par des aiguilles G23 (\emptyset externe 0.64 mm). Le

diamètre interne du tube est légèrement inférieur au diamètre externe de l'aiguille pour assurer l'étanchéité du raccord. De même, le diamètre externe du tube est légèrement supérieur au diamètre des trous (\emptyset 1 mm) d'entrées/sortie des dispositifs.

C.2 Modèle de Poiseuille

C.2.1 Géométrie circulaire

Le modèle de Poiseuille peut décrire l'écoulement d'un fluide dans un conduit. On suppose l'unidirectionnalité et la stationnarité de l'écoulement et l'incompressibilité du fluide :

$$\begin{aligned}\vec{v} = (v_x, v_y, v_z) &= (v_x, 0, 0) \text{ (unidirectionnalité),} \\ \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} &= \vec{0} \text{ (stationnarité),} \\ \vec{\nabla} \cdot \vec{v} &= 0 \text{ (incompressibilité),} \\ \vec{f} &= \vec{0}.\end{aligned}$$

Or

$$\begin{aligned}\vec{\nabla} \cdot \vec{v} &= \frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} + \frac{\partial v_z}{\partial z} \\ &= \frac{\partial v_x}{\partial x} = 0,\end{aligned}$$

car $v_y = v_z = 0$. Ainsi $\vec{v} = (v_x(y, z), 0, 0)$, ce qui nous mène à

$$\left(\vec{v} \cdot \vec{\nabla}\right) \vec{v} = \vec{0}$$

et l'équation de Navier-Stokes peut alors prendre une forme très simple :

$$\vec{0} = -\vec{\nabla}p + \mu\Delta\vec{v} \tag{C.1}$$

Le cas qui nous intéresse est l'écoulement de Poiseuille dans un canal de section S. Si l'on considère que le mouvement est induit par une différence de pression Δp entre l'entrée et la sortie du canal, on peut poser que le coefficient de perte de charge vaut

C.2. Modèle de Poiseuille

$K = -\frac{\partial p}{\partial x} = \frac{\Delta p}{L}$ (où L est la longueur du canal) et on a l'équation de Navier-Stokes suivante :

$$\mu \left(\frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} \right) + K = 0. \quad (\text{C.2})$$

Dans le cas d'une section circulaire de rayon R , on exprime l'équation de Navier-Stokes dans le système de coordonnées cylindriques :

$$0 = -\frac{\partial p}{\partial x} + \frac{1}{r} \left[\frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial v_x}{\partial r} \right) \right]. \quad (\text{C.3})$$

Les conditions aux limites se résument à $v_x(r = R) = 0$ (viscosité) et $v_x(r = 0) = V_0$. En intégrant, on obtient :

$$\boxed{v_x(r) = V_0 \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right)} \quad (\text{C.4})$$

La vitesse a donc un profil parabolique. On peut remarquer que $v_x(r = 0) = V_0 = \frac{KR^2}{4\mu}$.

Pour trouver le débit volumique Q , il faut ensuite intégrer la vitesse sur une section S droite du tube :

$$Q = \iint_S v \cdot dS = \int_0^R v_x(r) 2\pi r \, dr = \frac{\pi K R^4}{8\mu},$$

et avec $K = \frac{\Delta p}{L}$ et $R = \sqrt{\frac{S}{\pi}}$:

$$\boxed{Q = \frac{\Delta p S^2}{8\pi\mu L}} \quad (\text{C.5})$$

Le débit dépend du carré de la section du cylindre. Le calcul détaillé pour une section rectangulaire est présenté ci-après.

C.2.2 Géométrie rectangulaire

Soit un fluide incompressible, en écoulement stationnaire selon z dans une conduite de section rectangulaire, voir figure C.1.

Le champ de vitesse associé au fluide dans le canal est

$$\mathbf{u} = u_x(x, y, z)\mathbf{e}_x + u_y(x, y, z)\mathbf{e}_y + u_z(x, y, z)\mathbf{e}_z$$

or il est clair qu'il n'y a pas de composante suivant x et y . De plus, la conservation de la matière donne

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot \mathbf{j} = 0$$

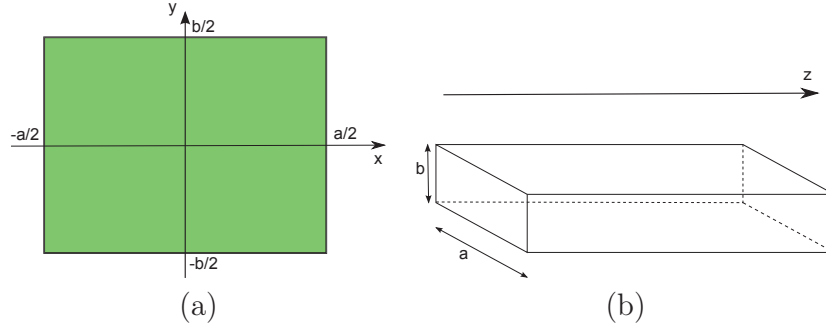


FIGURE C.1 – (a) Schéma du canal de section rectangulaire, de dimension $a \times b$. (b) Schéma du canal dans la direction z .

La densité de matière ne varie pas au cours du temps et $\mathbf{j} = \rho \mathbf{u}$ donc

$$\frac{\partial u_z(x, y, z)}{\partial z} = 0 \Rightarrow \mathbf{u} = u_z(x, y) \mathbf{e}_z$$

On peut reprendre l'équation de Navier-Stokes (C.2) de la partie précédente

$$\mu \left(\frac{\partial^2 u_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u_z}{\partial y^2} \right) + K = 0.$$

et les conditions aux limites suivantes :

$$u_z(x = \pm a/2, y) = 0 \quad \forall y \quad (\text{C.6})$$

$$u_z(x, y = \pm b/2) = 0 \quad \forall x \quad (\text{C.7})$$

On note $\frac{-K}{\mu} = \alpha$. L'équation (C.2) est une équation de Poisson ($\Delta u_z = \alpha$) et sa solution est la somme d'une solution particulière et de la solution homogène :

$$u_z(x, y) = u_p(x, y) + u_h(x, y)$$

Une solution particulière peut être trouvée en posant $u_p(x, y) = u_p(x)$, en intégrant l'équation (C.2) selon une seule direction, mettons x , et en tenant compte des conditions aux limites (C.6, C.7). On trouve

$$u_p(x, y) = \frac{\alpha}{2} \left(x^2 - \left(\frac{a}{2} \right)^2 \right)$$

La solution homogène peut se trouver par la méthode de séparation des variables :

$$u_h(x, y) = \psi(x) \xi(y)$$

C.2. Modèle de Poiseuille

On injecte ceci dans l'équation homogène :

$$0 = \frac{\partial^2 [\psi(x)\xi(y)]}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 [\psi(x)\xi(y)]}{\partial y^2}$$

On obtient l'équation suivante en réarrangeant :

$$\frac{1}{\psi(x)} \frac{d^2 \psi(x)}{dx^2} = -\frac{1}{\xi(y)} \frac{d^2 \xi(y)}{dy^2} = \beta$$

β est une constante car la somme des deux membres de l'équation vaut 0 pour tout (x, y) . En notant $\beta = -k^2$, on obtient les deux équations différentielles suivantes :

$$\begin{aligned} \frac{d^2 \psi(x)}{dx^2} + k^2 \psi(x) &= 0 \\ \frac{d^2 \xi(y)}{dy^2} - k^2 \xi(y) &= 0 \end{aligned}$$

Les conditions aux limites associées à $\psi(x)$ et $\xi(y)$ sont analogues à celles pour $u_z(x, y)$:

$$\psi(x = \pm a/2) = 0 \quad \forall y \quad (\text{C.8})$$

$$\xi(y = \pm b/2) = 0 \quad \forall x \quad (\text{C.9})$$

Les solutions admises pour les équations différentielles sont

$$\begin{aligned} \psi(x) &= A \cos(kx) + B \sin(kx) \\ \xi(y) &= C \cosh(ky) + D \sinh(ky) \end{aligned}$$

Comme ces fonctions doivent être paires car le problème est symétrique, on a

$$\begin{aligned} \psi(x) &= A \cos(kx) \\ \xi(y) &= C \cosh(ky) \end{aligned}$$

La condition aux limites pour $\psi(x)$ (C.8) donne

$$\begin{aligned} \psi(x = \pm a/2) &= 0 \\ \Leftrightarrow \cos\left(k\frac{a}{2}\right) &= 0 \\ \Leftrightarrow k\frac{a}{2} &= n\pi + \frac{\pi}{2} \\ \Leftrightarrow k &= k_n = (2n + 1)\frac{\pi}{a} \end{aligned}$$

et donc,

$$\begin{aligned}\psi(x) &= A_n \cos(k_n x) \\ \xi(y) &= C_n \cosh(k_n y)\end{aligned}$$

et

$$u_h(x, y) = \sum_{n=0}^{+\infty} \zeta_n \cos(k_n x) \cosh(k_n y)$$

donc

$$u_z(x, y) = \frac{\alpha}{2} \left(x^2 - \left(\frac{a}{2} \right)^2 \right) + \sum_{n=0}^{+\infty} \zeta_n \cos(k_n x) \cosh(k_n y)$$

Il reste à satisfaire la condition aux limites (C.7), il faut pour cela calculer les coefficients ζ_n qui vérifient $u_z(x, y = \pm b/2) = 0$. On peut utiliser la relation suivante :

$$\int_0^{a/2} dx \cos\left((2n+1)\frac{\pi x}{a}\right) \cos\left((2m+1)\frac{\pi x}{a}\right) = \frac{a}{4} \delta_{nm}$$

où δ_{nm} est le symbole de Kronecker. En remplaçant y par $b/2$ ($-b/2$ donne la même chose car le cosinus hyperbolique est une fonction paire), en multipliant par $\cos(k_m x)$ et en intégrant, on peut écrire :

$$0 = \int_0^{a/2} dx \frac{\alpha}{2} \left(x^2 - \left(\frac{a}{2} \right)^2 \right) \cos(k_m x) + \sum_{n=0}^{+\infty} \zeta_n \cosh\left(k_n \frac{b}{2}\right) \int_0^{a/2} dx \cos(k_n x) \cos(k_m x)$$

Ce qui nous donne, en intégrant par parties et en remarquant que $\sin\left((2n+1)\frac{\pi}{2}\right) = (-1)^n$:

$$0 = \frac{\alpha}{2} \left(\frac{a}{2} \right)^2 \frac{(-1)^m}{k_m} - \frac{\alpha}{k_m^3} (-1)^m - \frac{\alpha}{2} \left(\frac{a}{2} \right)^2 \frac{(-1)^m}{k_m} + \frac{\zeta_m a}{4} \cosh\left((2m+1)\frac{\pi b}{2a}\right)$$

Et finalement,

$$\zeta_n = \frac{4(-1)^n \alpha a^2}{(2n+1)^3 \pi^3 \cosh\left((2n+1)\frac{\pi b}{2a}\right)}$$

Et enfin

$$u_z(x, y) = \frac{\alpha}{2} \left(x^2 - \left(\frac{a}{2} \right)^2 \right) + \frac{4\alpha a^2}{\pi^3} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{(-1)^n}{(2n+1)^3} \frac{\cos\left((2n+1)\frac{\pi x}{a}\right) \cosh\left((2n+1)\frac{\pi y}{a}\right)}{\cosh\left((2n+1)\frac{\pi b}{2a}\right)}$$

C.2. Modèle de Poiseuille

Il est à présent possible de calculer le débit Q , intégrale sur la section de la vitesse :

$$Q = \iint_S dx dy u_z(x, y)$$

soit

$$Q = \int_{-\frac{a}{2}}^{\frac{a}{2}} \int_{-\frac{b}{2}}^{\frac{b}{2}} dx dy \frac{\alpha}{2} \left(x^2 - \left(\frac{a}{2} \right)^2 \right) + \frac{4\alpha a^2}{\pi^3} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{(-1)^n}{(2n+1)^3 \cosh\left((2n+1)\frac{\pi b}{2a}\right)} \int_{-\frac{a}{2}}^{\frac{a}{2}} \int_{-\frac{b}{2}}^{\frac{b}{2}} dx dy \cos(k_n x) \cosh(k_n y)$$

On a utilisé $k_n = (2n+1)\frac{\pi}{a}$ pour alléger un tant soit peu la formule. On trouve facilement que le résultat de la première intégrale est $-\frac{\alpha b a^3}{12}$ et celui de la deuxième est $\frac{4(-1)^n \sinh\left((2n+1)\frac{\pi b}{2a}\right)}{k_n^2}$ donc

$$\begin{aligned} Q &= -\frac{\alpha b a^3}{12} + \frac{16\alpha a^4}{\pi^5} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{(-1)^{2n} \sinh\left((2n+1)\frac{\pi b}{2a}\right)}{(2n+1)^5 \cosh\left((2n+1)\frac{\pi b}{2a}\right)} \\ \Leftrightarrow Q &= -\frac{\alpha b a^3}{12} \left[1 - \frac{192a}{\pi^5 b} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{\tanh\left((2n+1)\frac{\pi b}{2a}\right)}{(2n+1)^5} \right] \\ \Leftrightarrow Q &= \frac{\Delta p b a^3}{\mu L 12} \left[1 - \frac{192a}{\pi^5 b} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{\tanh\left((2n+1)\frac{\pi b}{2a}\right)}{(2n+1)^5} \right] \end{aligned} \quad (\text{C.10})$$

Remarque En gardant le même système (équation de Navier-Stokes-Poisson + conditions aux limites) mais en prenant la solution particulière pour $u_z(x, y)$ comme $u_p(x, y) = u_p(y) = \frac{\alpha}{2} \left(y^2 - \left(\frac{b}{2} \right)^2 \right)$ et la solution homogène $u_h(x, y) = \sum_{n=0}^{+\infty} \zeta_n \cos(k_n y) \cosh(k_n x)$ avec $k_n = (2n+1)\frac{\pi}{b}$, on trouve :

$$Q = \frac{\Delta p a b^3}{\mu L 12} \left[1 - \frac{192b}{\pi^5 a} \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{\tanh\left((2n+1)\frac{\pi a}{2b}\right)}{(2n+1)^5} \right]$$

à comparer avec équation (C.10). On constate que a et b sont simplement intervertis, ce qui met la symétrie du problème en exergue. En effet, les choix de la solution particulière

et de la solution homogène sont arbitraires. Remplacer a par b et b par a correspond à effectuer une rotation de 90° de notre canal, ce qui ne doit pas changer les propriétés physiques de l'écoulement car on néglige la gravité.

Bibliographie

- [1] DE Koshland Jr. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(2) :98, 1958. *Cité page 1*
- [2] James R Williamson. Induced fit in rna–protein recognition. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(10) :834–837, 2000. *Cité page 1*
- [3] Peter Csermely, Robin Palotai, and Ruth Nussinov. Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments : an extended view of binding events. *Trends in biochemical sciences*, 35(10) :539–546, 2010. *Cité page 1*
- [4] Hans Frauenfelder, Stephen G Sligar, and Peter G Wolynes. The energy landscapes and motions of proteins. *Urbana*, 51(61801) :61801, 1991. *Cité page 1*
- [5] K. Henzler-Wildman and D. Kern. Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450(7172) :964–972, 2007. *2 citations pages 1 et 2*
- [6] David D Boehr, Ruth Nussinov, and Peter E Wright. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nature chemical biology*, 5(11) :789–796, 2009. *2 citations pages 1 et 2*
- [7] Barry J Grant, Alemayehu A Gorfe, and J Andrew McCammon. Large conformational changes in proteins : signaling and other functions. *Current opinion in structural biology*, 20(2) :142–147, 2010. *Cité page 1*
- [8] Peter E Wright and H Jane Dyson. Intrinsically unstructured proteins : re-assessing the protein structure–function paradigm. *Journal of molecular biology*, 293(2) :321–331, 1999. *Cité page 1*
- [9] Peter Tompa. Intrinsically disordered proteins : a 10-year recap. *Trends in biochemical sciences*, 2012. *Cité page 1*

- [10] H.M. Al-Hashimi and N.G. Walter. Rna dynamics : it is about time. *Current opinion in structural biology*, 18(3) :321–329, 2008. *2 citations pages 1 et 3*
- [11] A.G. Palmer. Nmr characterization of the dynamics of biomacromolecules. *Chemical Reviews*, 104(8) :3623–3640, 2004. *Cité page 2*
- [12] Lars Konermann, Xin Tong, and Yan Pan. Protein structure and dynamics studied by mass spectrometry : H/d exchange, hydroxyl radical labeling, and related approaches. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(8) :1021–1036, 2008. *Cité page 2*
- [13] Elke Haustein and Petra Schwille. Single-molecule spectroscopic methods. *Current opinion in structural biology*, 14(5) :531–540, 2004. *2 citations pages 2 et 3*
- [14] B. Schuler, E.A. Lipman, and W.A. Eaton. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature*, 419(6908) :743–747, 2002. *2 citations pages 2 et 21*
- [15] Zheng Xie, Narayanan Srividya, Tobin R Sosnick, Tao Pan, and Norbert F Scherer. Single-molecule studies highlight conformational heterogeneity in the early folding steps of a large ribozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2) :534–539, 2004. *Cité page 2*
- [16] Benjamin Schuler and Hagen Hofmann. Single-molecule spectroscopy of protein folding dynamics expanding scope and timescales. *Current opinion in structural biology*, 23(1) :36–47, 2013. *Cité page 2*
- [17] P.I.H. Bastiaens and A. Squire. Fluorescence lifetime imaging microscopy : spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends in cell biology*, 9(2) :48–52, 1999. *2 citations pages 4 et 82*
- [18] Joseph M Beechem and Ludwig Brand. Time-resolved fluorescence of proteins. *Annual review of biochemistry*, 54(1) :43–71, 1985. *2 citations pages 4 et 23*
- [19] Jose Ricardo Alcala, E Gratton, and FG Prendergast. Fluorescence lifetime distributions in proteins. *Biophysical journal*, 51(4) :597–604, 1987. *3 citations pages 4, 15, et 23*
- [20] C Vuilleumier, E Bombarda, N Morellet, D Gerard, BP Roques, and Y Mely. Nucleic acid sequence discrimination by the hiv-1 nucleocapsid protein ncp7 : a fluorescence study. *Biochemistry*, 38(51) :16816–16825, 1999. *2 citations pages 4 et 77*

- [21] Elisha Haas. The study of protein folding and dynamics by determination of intramolecular distance distributions and their fluctuations using ensemble and single-molecule fret measurements. *ChemPhysChem*, 6(5) :858–870, 2005. *Cité page 4*
- [22] Liang Zhao and Tianbing Xia. Probing rna conformational dynamics and heterogeneity using femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy. *Methods*, 49(2) :128–135, 2009. *2 citations pages 4 et 23*
- [23] T. Gelot, P. Tourón-Touceda, O. Crégut, J. Léonard, and S. Haacke. Ultrafast site-specific fluorescence quenching of 2-aminopurine in a dna hairpin studied by femtosecond down-conversion. *The Journal of Physical Chemistry A*, 116(11) :2819–2825, 2012. *3 citations pages 4, 18, et 25*
- [24] Adalgisa Sinicropi, Elena Martin, Mikhail Ryazantsev, Jan Helbing, Julien Briand, Divya Sharma, Jérémie Léonard, Stefan Haacke, Andrea Cannizzo, Majed Chergui, et al. An artificial molecular switch that mimics the visual pigment and completes its photocycle in picoseconds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(46) :17642–17647, 2008. *2 citations pages 4 et 91*
- [25] Julien Briand, Olivier Bräm, Julien Réhault, Jérémie Léonard, Andrea Cannizzo, Majed Chergui, Vinizio Zanirato, Massimo Olivucci, Jan Helbing, and Stefan Haacke. Coherent ultrafast torsional motion and isomerization of a biomimetic dipolar photoswitch. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(13) :3178–3187, 2010. *Cité page 4*
- [26] T Roland, J Léonard, G Hernandez Ramirez, S Méry, O Yurchenko, S Ludwigs, and S Haacke. Sub-100 fs charge transfer in a novel donor–acceptor–donor triad organized in a smectic film. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(1) :273–279, 2012. *2 citations pages 4 et 91*
- [27] P.C. Bevilacqua, R. Kierzek, K.A. Johnson, D.H. Turner, et al. Dynamics of ribozyme binding of substrate revealed by fluorescence-detected stopped-flow methods. *Science (New York, NY)*, 258(5086) :1355, 1992. *Cité page 4*
- [28] John T Groves, Jinbo Lee, and Sudhakar S Marla. Detection and characterization of an oxomanganese (v) porphyrin complex by rapid-mixing stopped-flow spectrophotometry. *Journal of the American Chemical Society*, 119(27) :6269–6273, 1997. *Cité page 4*
- [29] M.P. Lillo, B.K. Szpikowska, M.T. Mas, J.D. Sutin, and J.M. Beechem. Real-time measurement of multiple intramolecular distances during protein folding reactions :

- a multisite stopped-flow fluorescence energy-transfer study of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, 36(37) :11273–11281, 1997. *Cité page 4*
- [30] P. Mellet, C. Boudier, Y. Mely, and J.G. Bieth. Stopped flow fluorescence energy transfer measurement of the rate constants describing the reversible formation and the irreversible rearrangement of the elastase- α 1-proteinase inhibitor complex. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15) :9119–9123, 1998. *2 citations pages 4 et 59*
- [31] Tarita Biver, Claudia Cavazza, Fernando Secco, and Marcella Venturini. The two modes of binding of $\text{ru}(\text{phen})_2\text{dppz}^{2+}$ to dna : Thermodynamic evidence and kinetic studies. *Journal of inorganic biochemistry*, 101(3) :461–469, 2007. *2 citations pages 4 et 80*
- [32] George M Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101) :368–373, 2006. *Cité page 4*
- [33] Shia-Yen Teh, Robert Lin, Lung-Hsin Hung, and Abraham P Lee. Droplet microfluidics. *Lab on a Chip*, 8(2) :198–220, 2008. *Cité page 4*
- [34] H. Song and R.F. Ismagilov. Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents. *Journal of the American Chemical Society*, 125(47) :14613–14619, 2003. *Cité page 4*
- [35] H. Song, J.D. Tice, and R.F. Ismagilov. A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angewandte Chemie*, 115(7) :792–796, 2003. *7 citations pages 4, 38, 39, 40, 44, 47, et 103*
- [36] Helen Song, Delai L Chen, and Rustem F Ismagilov. Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angewandte chemie international edition*, 45(44) :7336–7356, 2006. *Cité page 4*
- [37] R. Benninger, O. Hofmann, J. McGinty, J. Requejo-Isidro, I. Munro, M. Neil, A. de Mello, P. French, et al. Time-resolved fluorescence imaging of solvent interactions in microfluidic devices. *Optics express*, 13(16) :6275–6285, 2005. *Cité page 4*
- [38] R.K.P. Benninger, O. Hofmann, B. Önfelt, I. Munro, C. Dunsby, D.M. Davis, M.A.A. Neil, P.M.W. French, and A.J. de Mello. Fluorescence-lifetime imaging of dna–dye interactions within continuous-flow microfluidic systems. *Angewandte Chemie*, 119(13) :2278–2281, 2007. *2 citations pages 4 et 38*
- [39] X. Casadevall i Solvas, M. Srisa-Art, A.J. deMello, and J.B. Edel. Mapping of fluidic mixing in microdroplets with 1 μs time resolution using fluorescence lifetime imaging. *Analytical chemistry*, 82(9) :3950–3956, 2010. *Cité page 4*

- [40] Osman Bilsel, Can Kayatekin, Louise A Wallace, and C Robert Matthews. A micro-channel solution mixer for studying microsecond protein folding reactions. *Review of scientific instruments*, 76(1) :014302–014302, 2005. *Cité page 4*
- [41] S. Batabyal, S. Rakshit, S. Kar, and S.K. Pal. An improved microfluidics approach for monitoring real-time interaction profiles of ultrafast molecular recognition. *Review of Scientific Instruments*, 83(4) :043113–043113, 2012. *Cité page 4*
- [42] Tetsunari Kimura, Jennifer C Lee, Harry B Gray, and Jay R Winkler. Site-specific collapse dynamics guide the formation of the cytochrome c' four-helix bundle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1) :117–122, 2007. *2 citations pages 4 et 23*
- [43] Seiji Yamada, Nicole D Bouley Ford, Gretchen E Keller, William C Ford, Harry B Gray, and Jay R Winkler. Snapshots of a protein folding intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5) :1606–1610, 2013. *2 citations pages 4 et 23*
- [44] Benjamin Schuler, Everett A Lipman, Peter J Steinbach, Michael Kumke, and William A Eaton. Polyproline and the “spectroscopic ruler” revisited with single-molecule fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8) :2754–2759, 2005. *Cité page 5*
- [45] Sacha Maillot, Alain Carvalho, Jean-Pierre Vola, Christian Boudier, Yves Mély, Stefan Haacke, and Jérémie Léonard. Picosecond fluorescence detection of out-of-equilibrium biomolecular complexes in microfluidic droplets. *Submitted*, 2013. *4 citations pages 5, 57, 61, et 87*
- [46] Jérémie Léonard, Wilfried Uhring, Sacha Maillot, Norbert Dumas, and Stefan Haacke. Dispositif et procédé de mesure de fluorescence résolue en temps pour le criblage à haut débit. *Brevet (FR)*, numéro de dépôt 1359860, 10-10-2013. *4 citations pages 6, 77, 81, et 87*
- [47] Dagmar Klostermeier and David P Millar. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer : A versatile tool for the analysis of nucleic acids. *Biopolymers*, 61(3) :159–179, 2002. *2 citations pages 7 et 23*
- [48] A. Einstein. Zur quantentheorie der strahlung. *Physikalische Zeitschrift*, 18 :121–128, 1917. *Cité page 7*
- [49] Bernard Valeur et al. *Molecular fluorescence : principles and applications*. John Wiley & Sons, 2013. *2 citations pages 10 et 21*

- [50] Robert Sjöback, Jan Nygren, and Mikael Kubista. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 51(6) :L7–L21, 1995. *2 citations pages 11 et 14*
- [51] SJ Strickler and Robert A Berg. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *The Journal of chemical physics*, 37 :814, 1962. *4 citations pages 12, 14, 30, et 93*
- [52] Julia G Lyubovitsky, Harry B Gray, and Jay R Winkler. Mapping the cytochrome c folding landscape. *Journal of the American Chemical Society*, 124(19) :5481–5485, 2002. *2 citations pages 15 et 23*
- [53] Andrei A Istratov and Oleg F Vyvenko. Exponential analysis in physical phenomena. *Review of Scientific Instruments*, 70(2) :1233–1257, 1999. *Cité page 15*
- [54] JM Beechem and E Haas. Simultaneous determination of intramolecular distance distributions and conformational dynamics by global analysis of energy transfer measurements. *Biophysical journal*, 55(6) :1225–1236, 1989. *Cité page 15*
- [55] Joseph R Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*, volume 1. Springer, 2006. *Cité page 17*
- [56] Th Förster. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der physik*, 437(1-2) :55–75, 1948. *Cité page 18*
- [57] David L Dexter. A theory of sensitized luminescence in solids. *The Journal of Chemical Physics*, 21 :836, 1953. *Cité page 19*
- [58] Lubert Stryer and Richard P Haugland. Energy transfer : a spectroscopic ruler. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(2) :719, 1967. *Cité page 21*
- [59] Hervé Beltz, Céline Clauss, Etienne Piémont, Damien Ficheux, Robert J Gorelick, Bernard Roques, Caroline Gabus, Jean-Luc Darlix, Hugues de Rocquigny, and Yves Mély. Structural determinants of hiv-1 nucleocapsid protein for tar dna binding and destabilization, and correlation with inhibition of self-primed dna synthesis. *Journal of molecular biology*, 348(5) :1113–1126, 2005. *Cité page 21*
- [60] Julien Godet, Hugues de Rocquigny, Chinnappan Raja, Nicole Glasser, Damien Ficheux, Jean-Luc Darlix, and Yves Mély. During the early phase of hiv-1 dna synthesis, nucleocapsid protein directs hybridization of the tar complementary sequences *via* the ends of their double-stranded stem. *Journal of molecular biology*, 356(5) :1180–1192, 2006. *3 citations pages 21, 78, et 79*

- [61] Nick Ramalanjaona, Hugues de Rocquigny, Aurélie Millet, Damien Ficheux, Jean-Luc Darlix, and Yves Mély. Investigating the mechanism of the nucleocapsid protein chaperoning of the second strand transfer during hiv-1 dna synthesis. *Journal of molecular biology*, 374(4) :1041–1053, 2007. *Cité page 21*
- [62] Manuel Diez, Boris Zimmermann, Michael Börsch, Marcelle König, Enno Schweinberger, Stefan Steigmiller, Rolf Reuter, Suren Felekyan, Volodymyr Kudryavtsev, Claus AM Seidel, et al. Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound f0f1-atp synthase. *Nature structural & molecular biology*, 11(2) :135–141, 2004. *Cité page 21*
- [63] B. Schuler and W.A. Eaton. Protein folding studied by single-molecule fret. *Current opinion in structural biology*, 18(1) :16–26, 2008. *Cité page 21*
- [64] Johan Hofkens, Mircea Cotlet, Tom Vosch, Philip Tinnefeld, Kenneth D Weston, Christophe Ego, Andrew Grimsdale, Klaus Müllen, David Beljonne, Jean Luc Brédas, et al. Revealing competitive förster-type resonance energy-transfer pathways in single bichromophoric molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23) :13146–13151, 2003. *Cité page 22*
- [65] S Schenkl, F Van Mourik, G Van der Zwan, S Haacke, and M Chergui. Probing the ultrafast charge translocation of photoexcited retinal in bacteriorhodopsin. *Science Signaling*, 309(5736) :917, 2005. *Cité page 22*
- [66] Dario Polli, Piero Altoè, Oliver Weingart, Katelyn M Spillane, Cristian Manzoni, Daniele Brida, Gaia Tomasello, Giorgio Orlandi, Philipp Kukura, Richard A Mathies, et al. Conical intersection dynamics of the primary photoisomerization event in vision. *Nature*, 467(7314) :440–443, 2010. *Cité page 22*
- [67] Remo A Hochstrasser, Shiow-Meei Chen, and David P Millar. Distance distribution in a dye-linked oligonucleotide determined by time-resolved fluorescence energy transfer. *Biophysical chemistry*, 45(2) :133–141, 1992. *Cité page 23*
- [68] Peggy S Eis and David P Millar. Conformational distributions of a four-way dna junction revealed by time-resolved fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*, 32(50) :13852–13860, 1993. *Cité page 23*
- [69] AG Szabo and DM Rayner. Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 102(2) :554–563, 1980. *Cité page 23*

- [70] Sandra J Kroes, Gerard W Canters, Gianfranco Gilardi, Arie van Hoek, and Antonie JWG Visser. Time-resolved fluorescence study of azurin variants : conformational heterogeneity and tryptophan mobility. *Biophysical journal*, 75(5) :2441–2450, 1998. *Cité page 23*
- [71] Johanna Brazard, Arun K Thazhathveetil, Ignacio Vaya, Frederick D Lewis, Thomas Gustavsson, and Dimitra Markovitsi. Electronic excited states of guanine-cytosine hairpins and duplexes studied by fluorescence spectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2013. *Cité page 24*
- [72] F.A. Miannay, Á. Bányász, T. Gustavsson, and D. Markovitsi. Ultrafast excited-state deactivation and energy transfer in guanine-cytosine dna double helices. *Journal of the American Chemical Society*, 129(47) :14574–14575, 2007. *Cité page 25*
- [73] R. Plessow, A. Brockhinke, W. Eimer, and K. Kohse-Höinghaus. Intrinsic time- and wavelength-resolved fluorescence of oligonucleotides : A systematic investigation using a novel picosecond laser approach. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(15) :3695–3704, 2000. *Cité page 26*
- [74] VK Ramanujan, JA Jo, G Cantu, and BA Herman. Spatially resolved fluorescence lifetime mapping of enzyme kinetics in living cells. *Journal of microscopy*, 230(3) :329–338, 2008. *Cité page 26*
- [75] John TM Kennis, Bas Gobets, Ivo HM van Stokkum, Jan P Dekker, Rienk van Grondelle, and Graham R Fleming. Light harvesting by chlorophylls and carotenoids in the photosystem i core complex of synechococcus elongatus : a fluorescence upconversion study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(19) :4485–4494, 2001. *Cité page 26*
- [76] Christoph Biskup, Thomas Zimmer, Laimonas Kelbauskas, Birgit Hoffmann, Nikolaj Klöcker, Wolfgang Becker, Axel Bergmann, and Klaus Benndorf. Multi-dimensional fluorescence lifetime and fret measurements. *Microscopy research and technique*, 70(5) :442–451, 2007. *Cité page 26*
- [77] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, and G.M. Whitesides. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Analytical chemistry*, 70(23) :4974–4984, 1998. *2 citations pages 33 et 44*
- [78] H. Song, M.R. Bringer, J.D. Tice, C.J. Gerdts, and R.F. Ismagilov. Experimental test of scaling of mixing by chaotic advection in droplets moving through microfluidic channels. *Applied Physics Letters*, 83(22) :4664–4666, 2003. *4 citations pages 33, 43, 54, et 55*

- [79] D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz, and H. A. Stone. Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. *Phys. Rev. Lett.*, 92 :054503, Feb 2004. *Cité page 36*
- [80] S.H. Pfeil, C.E. Wickersham, A. Hoffmann, and E.A. Lipman. A microfluidic mixing system for single-molecule measurements. *Review of Scientific Instruments*, 80(5) :055105–055105, 2009. *Cité page 36*
- [81] Joshua D Tice, Helen Song, Adam D Lyon, and Rustem F Ismagilov. Formation of droplets and mixing in multiphase microfluidics at low values of the reynolds and the capillary numbers. *Langmuir*, 19(22) :9127–9133, 2003. *2 citations pages 39 et 55*
- [82] Todd Thorsen, Richard W Roberts, Frances H Arnold, and Stephen R Quake. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical review letters*, 86(18) :4163, 2001. *Cité page 40*
- [83] Piotr Garstecki, Michael J Fuerstman, Howard A Stone, and George M Whitesides. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic t-junction – scaling and mechanism of break-up. *Lab on a Chip*, 6(3) :437–446, 2006. *Cité page 40*
- [84] DE Graham and MC Phillips. Proteins at liquid interfaces : Ii. adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3) :415–426, 1979. *Cité page 40*
- [85] Jean-Christophe Baret, Felix Kleinschmidt, Abdeslam El Harrak, and Andrew D Griffiths. Kinetic aspects of emulsion stabilization by surfactants : a microfluidic analysis. *Langmuir*, 25(11) :6088–6093, 2009. *Cité page 40*
- [86] Takasi Nisisako, Toru Torii, and Toshiro Higuchi. Droplet formation in a micro-channel network. *Lab on a Chip*, 2(1) :24–26, 2002. *Cité page 40*
- [87] Shelley L Anna, Nathalie Bontoux, and Howard A Stone. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Applied physics letters*, 82 :364, 2003. *Cité page 40*
- [88] J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J.-C. Baret, A. El-Harrak, O.J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolf, K.J. Humphry, S. Köster, H. Duan, C. Holtze, D.A. Weitz, A.D. Griffiths, and C.A. Merten. Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of mammalian cells and multicellular organisms. *Chemistry & biology*, 15(5) :427–437, 2008. *Cité page 40*
- [89] J. Clausell-Tormos, A.D. Griffiths, and C.A. Merten. An automated two-phase microfluidic system for kinetic analyses and the screening of compound libraries. *Lab On a Chip*, 10 :1302–1307, 2010. *Cité page 40*

- [90] AR Abate, A Poitzsch, Y Hwang, J Lee, J Czerwinska, and DA Weitz. Impact of inlet channel geometry on microfluidic drop formation. *Physical Review E*, 80(2) :026310, 2009. *Cité page 40*
- [91] K Handique and Mark A Burns. Mathematical modeling of drop mixing in a slit-type microchannel. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 11(5) :548, 2001. *2 citations pages 41 et 42*
- [92] A. Liau, R. Karnik, A. Majumdar, and J.H.D. Cate. Mixing crowded biological solutions in milliseconds. *Analytical chemistry*, 77(23) :7618–7625, 2005. *2 citations pages 41 et 43*
- [93] Abraham D Stroock, Stephan KW Dertinger, Armand Ajdari, Igor Mezić, Howard A Stone, and George M Whitesides. Chaotic mixer for microchannels. *Science*, 295(5555) :647–651, 2002. *Cité page 43*
- [94] *Soft-Lithography-Based High Temperature Molding Method To Fabricate Whole Teflon Microfluidic Chips*. RSC, 2010. *Cité page 45*
- [95] James B. Knight, Ashvin Vishwanath, James P. Brody, and Robert H. Austin. Hydrodynamic focusing on a silicon chip : Mixing nanoliters in microseconds. *Phys. Rev. Lett.*, 80 :3863–3866, Apr 1998. *Cité page 53*
- [96] Jacob Q Umberger and Victor K LaMer. The kinetics of diffusion controlled molecular and ionic reactions in solution as determined by measurements of the quenching of fluorescence¹, 2. *Journal of the American Chemical Society*, 67(7) :1099–1109, 1945. *Cité page 54*
- [97] Hervé Beltz, Joel Azoulay, Serena Bernacchi, Jean-Pierre Clamme, Damien Ficheux, Bernard Roques, Jean-Luc Darlix, and Yves Mély. Impact of the terminal bulges of hiv-1 ctar dna on its stability and the destabilizing activity of the nucleocapsid protein ncp7. *Journal of molecular biology*, 328(1) :95–108, 2003. *Cité page 57*
- [98] R.F. Chen. Fluorescence stopped-flow study of relaxation processes in the binding of bilirubin to serum albumins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 160(1) :106–112, 1974. *Cité page 58*
- [99] A Barik, KI Priyadarsini, and Hari Mohan. Photophysical studies on binding of curcumin to bovine serum albumin. *Photochemistry and photobiology*, 77(6) :597–603, 2003. *Cité page 58*

- [100] Chris Tsopelas and Richard Sutton. Why certain dyes are useful for localizing the sentinel lymph node. *Journal of Nuclear Medicine*, 43(10) :1377–1382, 2002. *Cité page 58*
- [101] Franklin Tellier, Jérôme Steibel, Renée Chabrier, François Xavier Blé, Hervé Tubaldo, Ravelo Rasata, Jacques Chambron, Guy Duportail, Hervé Simon, Jean-François Rodier, et al. Sentinel lymph nodes fluorescence detection and imaging using patent blue v bound to human serum albumin. *Biomedical optics express*, 3(9) :2306, 2012. *2 citations pages 58 et 59*
- [102] C. Boudier, A.S. Klymchenko, Y. Mely, and A. Follenius-Wund. Local environment perturbations in alpha1-antitrypsin monitored by a ratiometric fluorescent label. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(6) :814–821, 2009. *Cité page 59*
- [103] Ivo HM van Stokkum, Delmar S Larsen, and Rienk van Grondelle. Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1657(2) :82–104, 2004. *Cité page 64*
- [104] N Morellet, H De Rocquigny, Y Mely, N Jullian, H Demene, M Ottmann, D Gerard, JL Darlix, MC Fournie-Zaluski, and BP Roques. Conformational behaviour of the active and inactive forms of the nucleocapsid ncp7 of hiv-1 studied by ^1H nmr. *Journal of molecular biology*, 235(1) :287–301, 1994. *Cité page 77*
- [105] Yves Mely, Hugues d Rocquigny, Volodymyr Shvadchak, Sergiy Avilov, Chang Zhi Dong, Ursula Dietrich, and Jean-Luc Darlix. Targeting the viral nucleocapsid protein in anti-hiv-1 therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8(1) :24–35, 2008. *Cité page 78*
- [106] Jean-Luc Darlix, José Luis Garrido, Nelly Morellet, Yves Mély, and Hugues de Rocquigny. Properties, functions, and drug targeting of the multifunctional nucleocapsid protein of the human immunodeficiency virus. *Advances in pharmacology*, 55 :299–346, 2007. *Cité page 78*
- [107] Serena Bernacchi, Stoyl Stoylov, Etienne Piémont, Damien Ficheux, Bernard P Roques, Jean Luc Darlix, and Yves Mély. Hiv-1 nucleocapsid protein activates transient melting of least stable parts of the secondary structure of tar and its complementary sequence. *Journal of molecular biology*, 317(3) :385–399, 2002. *Cité page 78*
- [108] Brian M Zeglis, Valerie C Pierre, and Jacqueline K Barton. Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chemical Communications*, (44) :4565–4579, 2007. *Cité page 80*

- [109] Christiana Xin Zhang and Stephen J Lippard. New metal complexes as potential therapeutics. *Current opinion in chemical biology*, 7(4) :481–489, 2003. *Cité page 80*
- [110] Viktor Brabec and Olga Nováková. Dna binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates*, 9(3) :111–122, 2006. *Cité page 80*
- [111] Alan E Friedman, Jean Claude Chambron, Jean Pierre Sauvage, Nicholas J Turro, and Jacqueline K Barton. A molecular light switch for dna : Ru (bpy) 2 (dppz) 2+. *Journal of the American Chemical Society*, 112(12) :4960–4962, 1990. *Cité page 80*
- [112] Hang Song, Jens T Kaiser, and Jacqueline K Barton. Crystal structure of δ -[ru (bpy) 2dppz] 2+ bound to mismatched dna reveals side-by-side metalloinsertion and intercalation. *Nature Chemistry*, 4(8) :615–620, 2012. *Cité page 80*
- [113] Mi Hee Lim, Hang Song, Eric D Olmon, Elizabeth E Dervan, and Jacqueline K Barton. Sensitivity of ru (bpy) 2dppz2+ luminescence to dna defects. *Inorganic chemistry*, 48(12) :5392–5397, 2009. *Cité page 80*
- [114] Wilfried Uehring, Patrick Poulet, Walter Hanselmann, René Glazenborg, Virginie Zint, Farouk Nouizi, Benoit Dubois, and Werner Hirschi. 200 ps fwhm and 100 mhz repetition rate ultrafast gated camera for optical medical functional imaging. In *SPIE Photonics Europe*, pages 84392L–84392L. International Society for Optics and Photonics, 2012. *Cité page 81*
- [115] Mira T Guo, Assaf Rotem, John A Heyman, and David A Weitz. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab on a Chip*, 12(12) :2146–2155, 2012. *Cité page 82*
- [116] Oliver J Miller, Abdeslam El Harrak, Thomas Mangeat, Jean-Christophe Baret, Lucas Frenz, Bachir El Debs, Estelle Mayot, Michael L Samuels, Eamonn K Rooney, Pierre Dieu, et al. High-resolution dose–response screening using droplet-based microfluidics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2) :378–383, 2012. *Cité page 82*
- [117] Robert P Hertzberg and Andrew J Pope. High-throughput screening : new technology for the 21st century. *Current opinion in chemical biology*, 4(4) :445–451, 2000. *Cité page 82*
- [118] Steven A Sundberg. High-throughput and ultra-high-throughput screening : solution-and cell-based approaches. *Current opinion in biotechnology*, 11(1) :47–53, 2000. *Cité page 82*

- [119] Lorenz M Mayr and Dejan Bojanic. Novel trends in high-throughput screening. *Current opinion in pharmacology*, 9(5) :580–588, 2009. *Cité page 82*
- [120] Theodorus WJ Gadella Jr, Thomas M Jovin, and Robert M Clegg. Fluorescence lifetime imaging microscopy (flim) : spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale. *Biophysical chemistry*, 48(2) :221–239, 1993. *Cité page 82*
- [121] Razvan L Cornea, Simon J Gruber, Elizabeth L Lockamy, Joseph M Muretta, Dongzhu Jin, Jiqui Chen, Russell Dahl, Tamas Bartfai, Krisztina M Zsebo, Gregory D Gillispie, et al. High-throughput fret assay yields allosteric serca activators. *Journal of Biomolecular Screening*, 18(1) :97–107, 2013. *Cité page 82*
- [122] Wilfried Uhring, Chantal-Virginie Zint, Jeremy Bartringer, et al. A low-cost high-repetition-rate picosecond laser diode pulse generator. In *Proceedings of SPIE*, volume 5452, pages 583–590, 2004. *Cité page 82*
- [123] Jérémie Léonard, Erwin Portuondo-Campa, Andrea Cannizzo, Frank van Mourik, Gert van der Zwan, Jörg Tittor, Stefan Haacke, and Majed Chergui. Functional electric field changes in photoactivated proteins revealed by ultrafast stark spectroscopy of the trp residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(19) :7718–7723, 2009. *Cité page 91*
- [124] Daniel Nettels, Armin Hoffmann, and Benjamin Schuler. Unfolded protein and peptide dynamics investigated with single-molecule fret and correlation spectroscopy from picoseconds to seconds. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(19) :6137–6146, 2008. *Cité page 95*
- [125] Dominik Haenni, Franziska Zosel, Luc Reymond, Daniel Nettels, and Benjamin Schuler. Intramolecular distances and dynamics from the combined photon statistics of single-molecule fret and photoinduced electron transfer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2013. *Cité page 95*