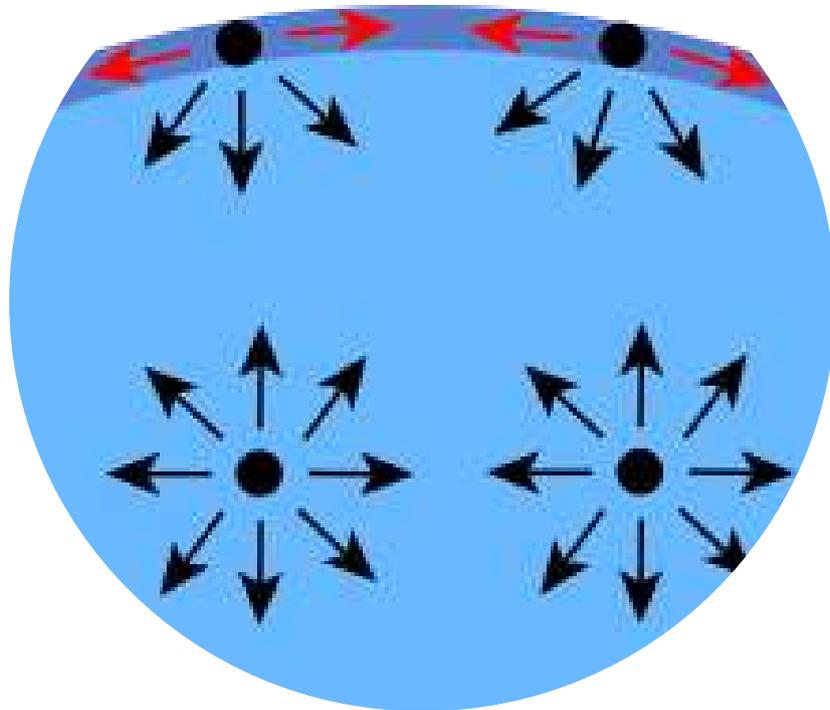


# Biophysique



## SCIENCES DE LA VIE



### Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



### Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



### Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

# Sample

TD de Fluorescence

---

SVI3

COMPLEMENT DU COURS DE BIOPHYSIQUE

Batch PDF Merger

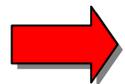
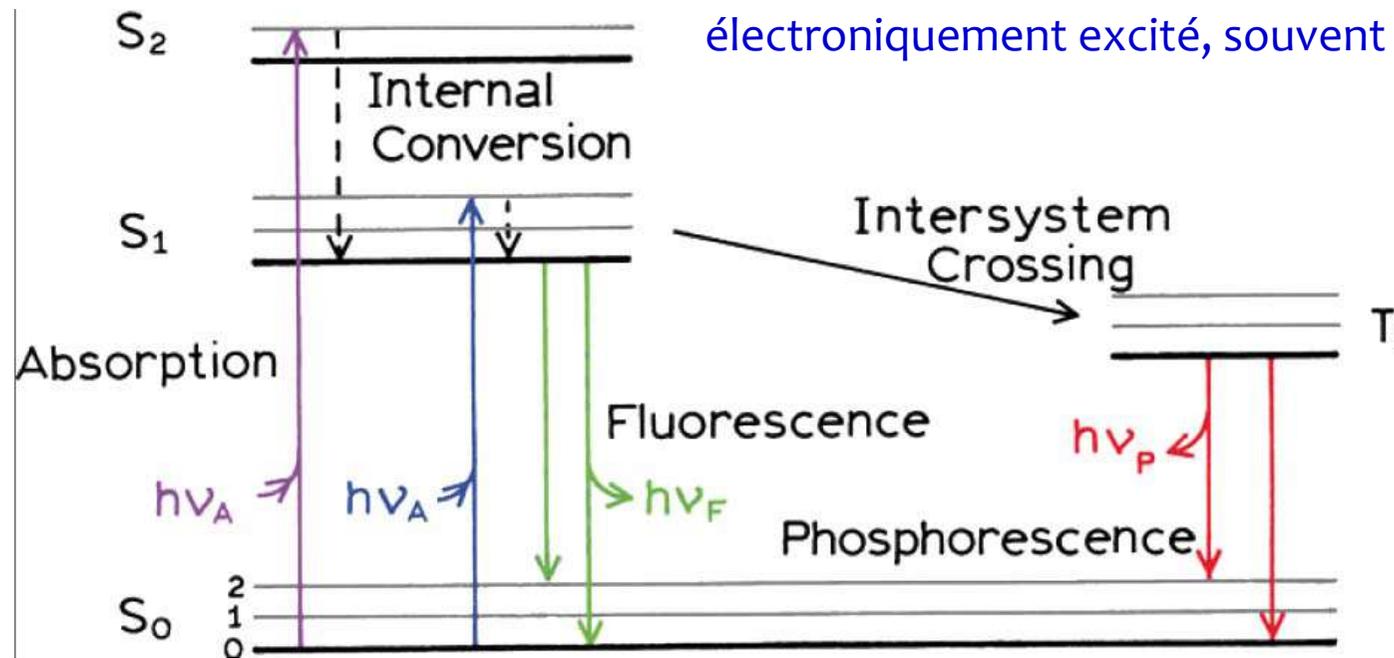
## La fluorescence: (quelques) applications

- Détermination des distances entre biomolécules (*FRET*).
  - Evaluation des paramètres de liaison ( $K_d$ , coopérativité de la liaison, stœchiométrie) entre les macromolécules biologiques (*Modèles de Scatchard, et de McGhee et von Hippel*).
  - Analyse d'une activité chaperonne d'une protéine.
  - Détection d'une activité enzymatique
  - Evaluation de la température de fusion d'un acide nucléique
- } *Molecular Beacons*
- Etude des changements conformationnels des molécules (*Anisotropie de fluorescence*).
  - Co-localisation des de biomolécules au niveau cellulaire (*Microscopie confocale*).
  - Analyse de la diffusion de macromolécules dans les cellules (*FCS*).

La fluorescence:  
le diagramme de Jablonski

Une molécule fluorescente (fluorophore) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer sous forme de lumière fluorescente

Une fois l'énergie du **photon** absorbée, la molécule se trouve alors généralement dans un état électroniquement excité, souvent un état singlet.



Le retour à l'état fondamental peut alors se faire de différentes manières : soit par **fluorescence**, soit par **phosphorescence**

# Luminescence

Luminescence: quelques généralités

Fluorescence

Phosphorescence

Transition  $S_1 \longrightarrow S_0$

Transition  $T_1 \longrightarrow S_0$

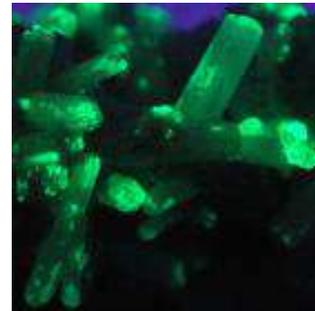
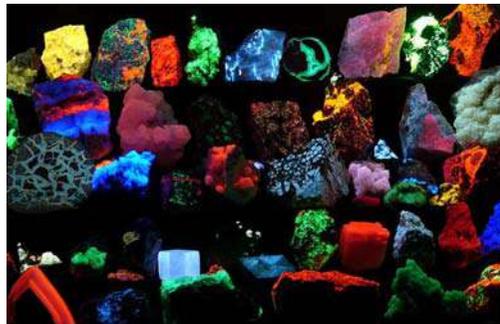
$10^{-9} - 10^{-8}$  sec

**Durée de vie à l'état excité:**  
c'est la durée pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état basal

$10^{-3}$  sec

protéine EGFP, acides aminés aromatiques...

Aluminate, terres rares, atomes lourds...



## Déplacement de Stokes

### Déplacement de Stokes

la longueur d'onde de la luminescence ( $\lambda_{emi}$ ) est plus grande

$$\lambda_{emi} > \lambda_{exc}$$

(donc d'énergie plus petite)

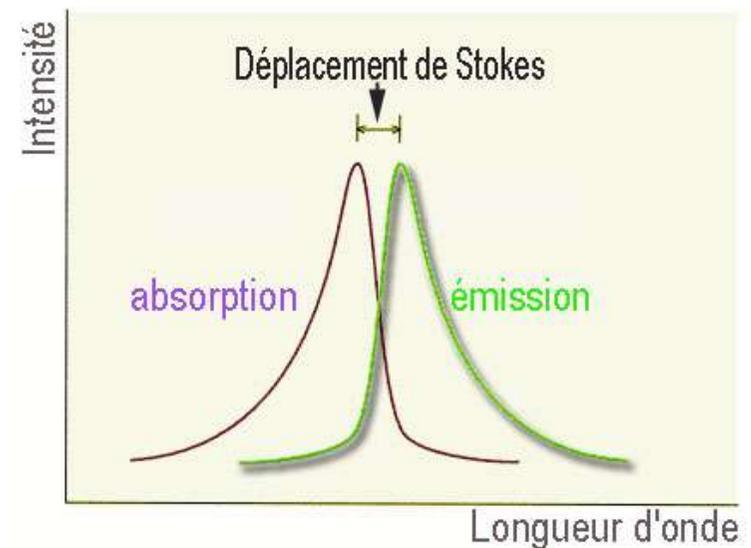
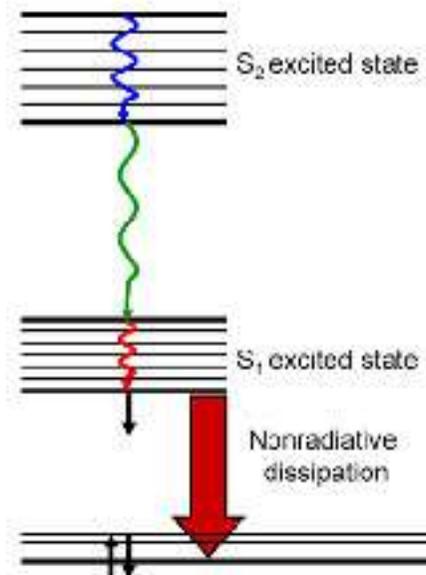
$$E = (hc)/\lambda = h\nu$$

$$h\nu_{exc} < h\nu_{emi}$$

que la lumière incidente.

Excitation  
(Absorption)

Emission  
(fluorescence)

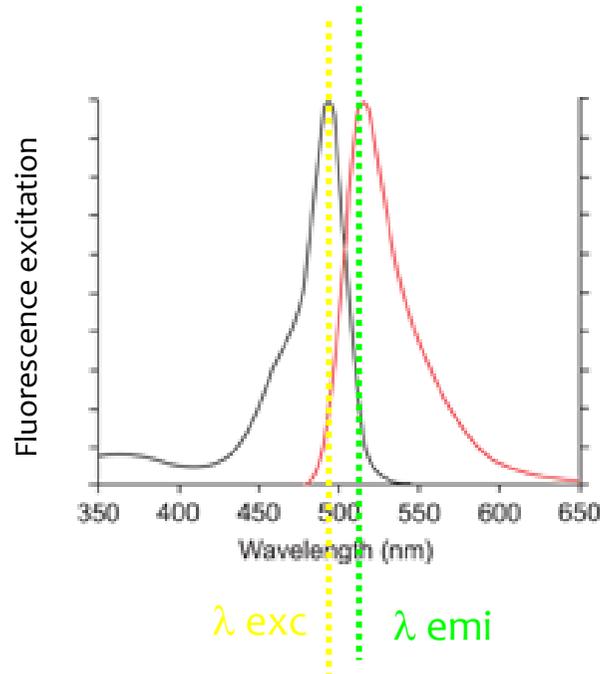


➔ Séparation spectrale

Spectre d'émission et d'excitation

Spectre d'excitation

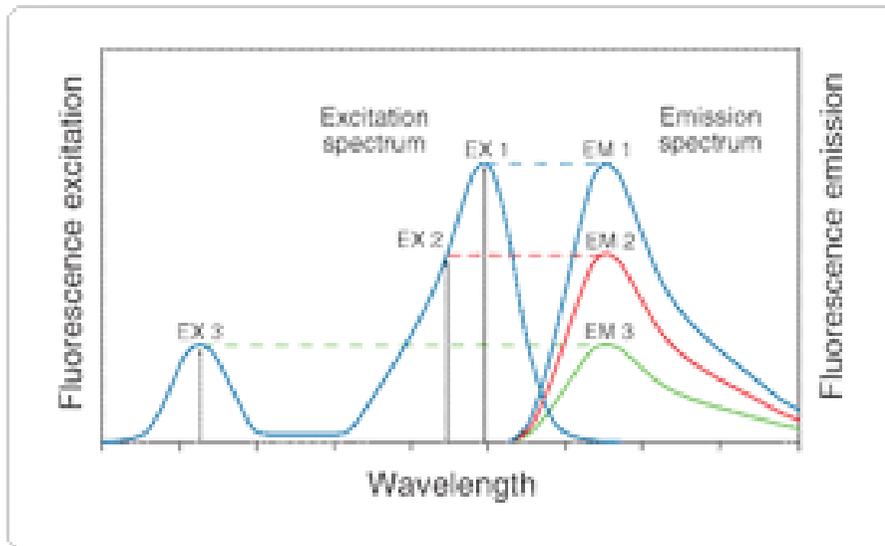
$\lambda_{emi}$  fixée  
 $\lambda_{exc}$  scan



Spectre d'émission

$\lambda_{emi}$  scan  
 $\lambda_{exc}$  fixée

Spectre d'excitation ~ spectre absorption



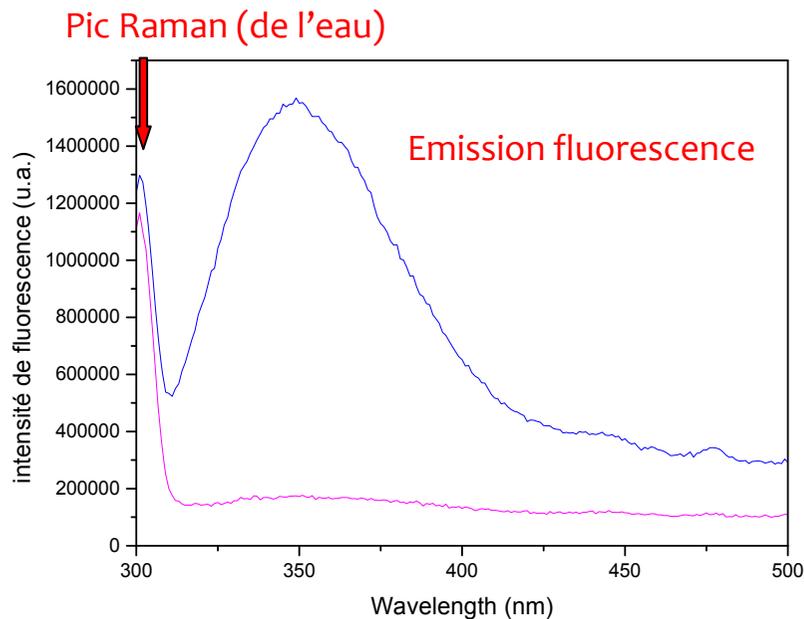
L'émission fluorescente ( $\lambda_{em}$ ) ne dépend pas de l'excitation ( $\lambda_{exc}$ )



Comment déterminer les  $\lambda_{exc}$  et  $\lambda_{emi}$  pour un fluorophore inconnu ?

## Pic Raman de l'eau

L'effet Raman (1930) consiste en l'existence d'un spectre décalé en fréquence dans la lumière diffusée par un échantillon soumis à une illumination monochromatique.

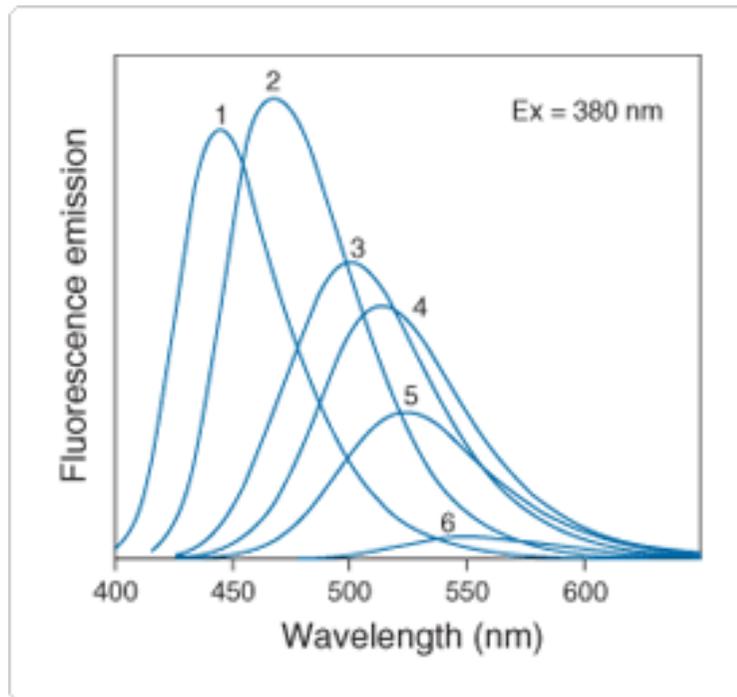


Les molécules peuvent relaxer vers un niveau vibrationnel autre que celui de l'état vibrationnel fondamental.

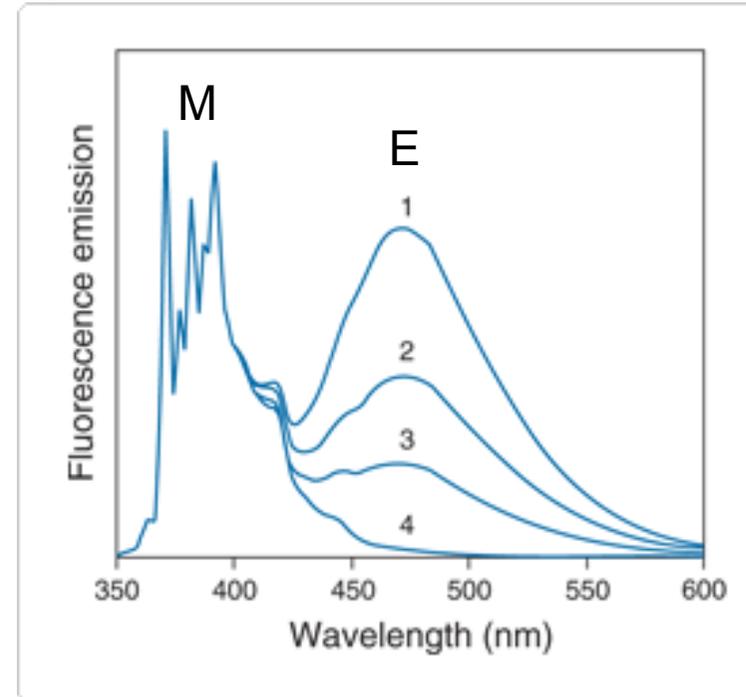
Les changements de fréquence (ou longueur d'onde) observés sont alors essentiellement liés aux vibrations moléculaires.

Il est caractéristique de l'échantillon étudié et lié aux vibrations des édifices atomiques constituant l'échantillon observé  $\longrightarrow$  Spectroscopie Raman

## Sensibilité des sondes de fluorescence

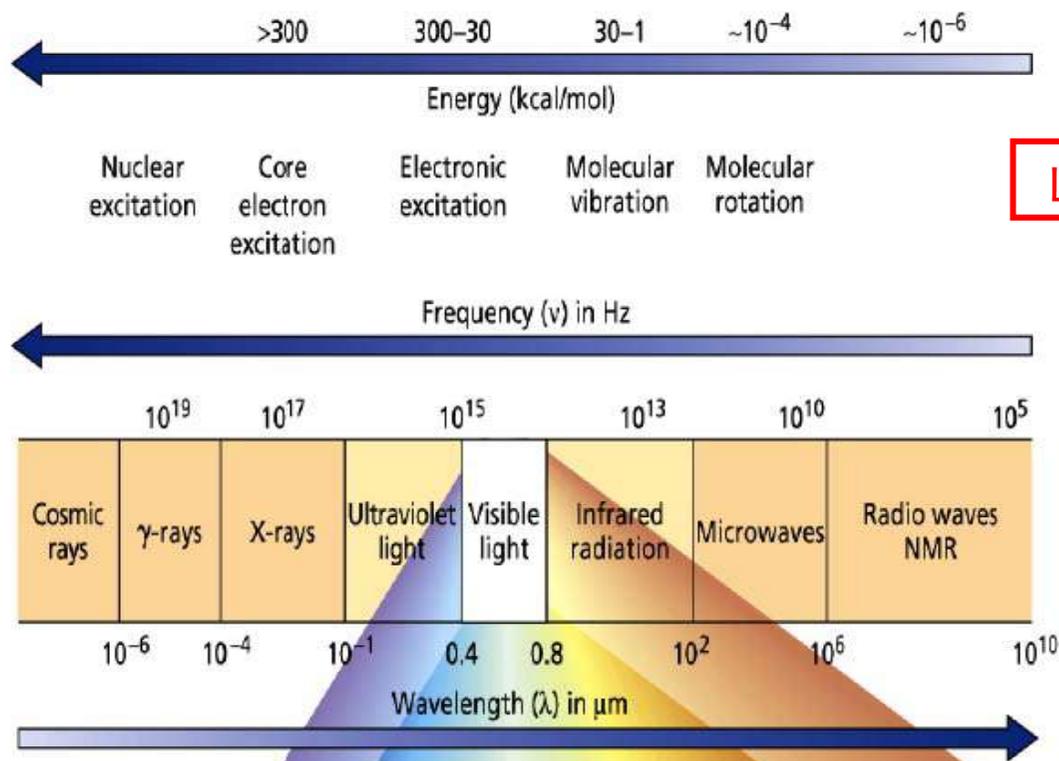


Badan en 1) toluène, 2) chloroforme, 3) acetonitrile, 4) éthanol, 5) méthanol and 6) eau



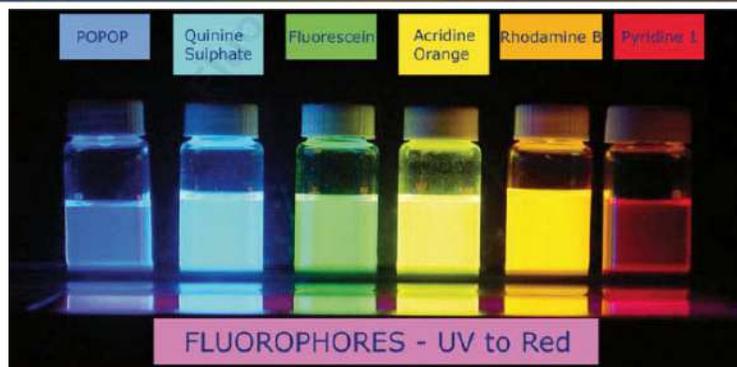
Formation de l'excimer du pyrène dans l'éthanol

L'émission fluorescente est extrêmement sensible à l'environnement du fluorophore



Le spectre électromagnétique

400nm



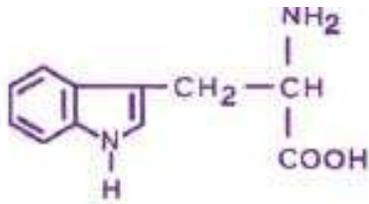
800nm

Trouver un fluorophore approprié

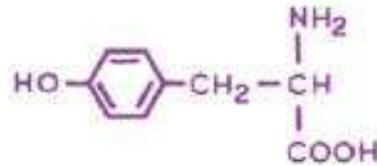
(système, émission, rendement quantique,...)

## Les sondes « naturelles » de fluorescence

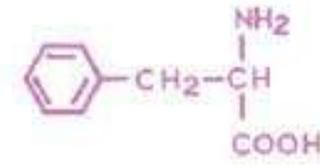
### Acides aminés aromatiques:



Tryptophan



Tyrosine



Phenylalanine

Acide aminé	$\lambda$ exc (nm)	$\lambda$ emi (nm)	Rendement Quantique
Trp	295	350	0,2
Phe	260	282	0,04
Tyr	275	304	0,14

H<sub>2</sub>O pH 7,0

## Le rendement quantique (quantum yield)

Le rendement quantique:

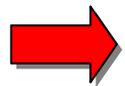
$$\Phi = k_r / (k_r + k_{nr})$$

$k_r$  = constante de vitesse fluorophore

$k_{nr}$  = constante de vitesse non-radiatif

efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation ou

bilan entre le nombre de photons émis / nombre de photons absorbés



Les meilleurs fluorophores ont un rendement quantique proche de 1

## Les sondes de fluorescence

### Acides aminés aromatiques:

Acide aminé	$\lambda$ exc (nm)	$\lambda$ emi (nm)	Rendement Quantique
Trp	295	350	0,2
Phe	260	282	0,04
Tyr	275	304	0,14

Le Trp a le meilleur rendement quantique et il est le résidu qui présente la plus grande sensibilité à l'environnement

Meilleure sonde pour décrire les changements conformationnels d'une protéine  
(association protéine-protéine, interaction avec les acides nucléiques, dénaturation de la protéine...)

## Exploitation de la fluorescence intrinsèque des protéines

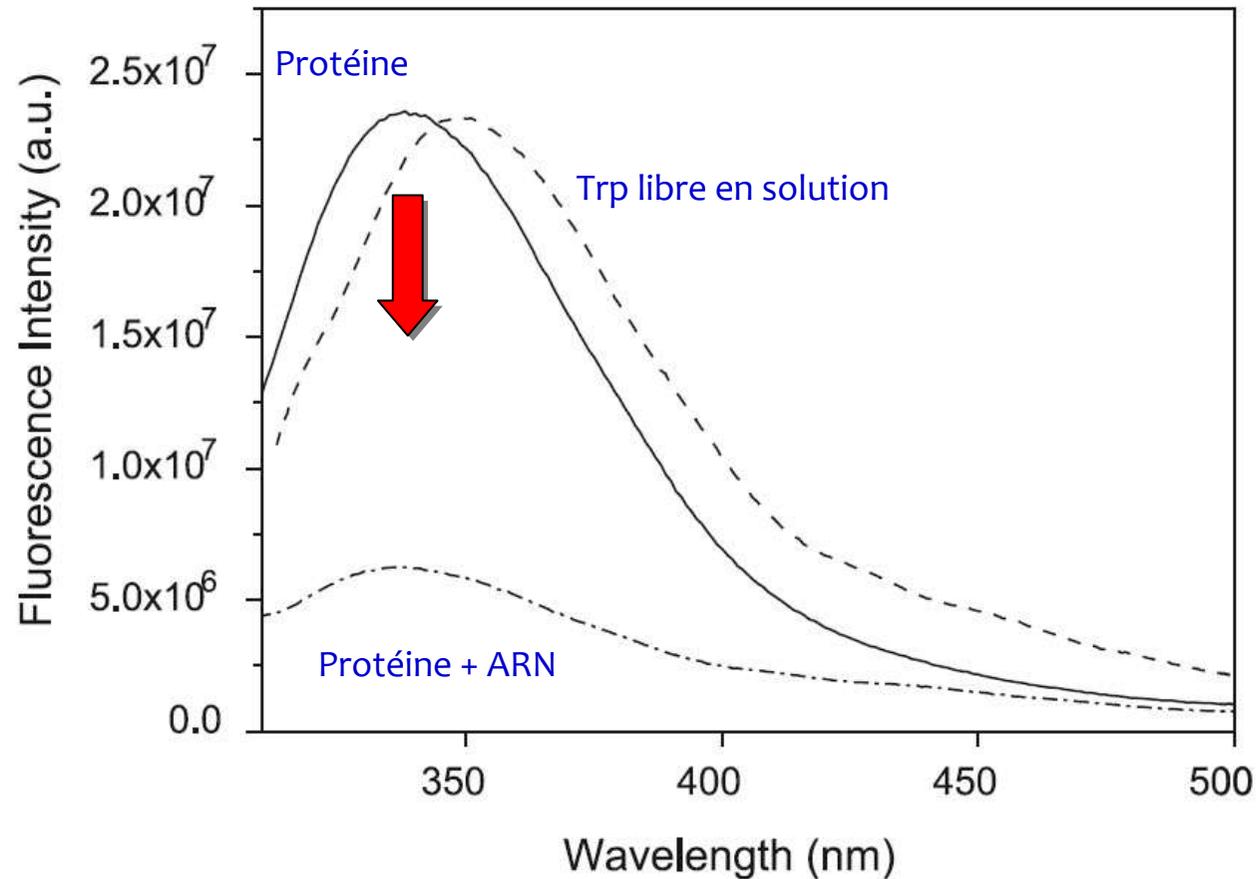


FIGURE 3. Emission fluorescence spectra of free Trp amino acid (*dash line*), HIV-1 Vif protein free in solution (*solid line*) and in complex with RNA C (*dash-dot line*). Excitation wavelength was set at 295 nm.

## Analyse spectrale: titrage acide nucléique/ protéine

Titration: ajout de quantités croissantes d'acide nucléique à une quantité fixe de protéine



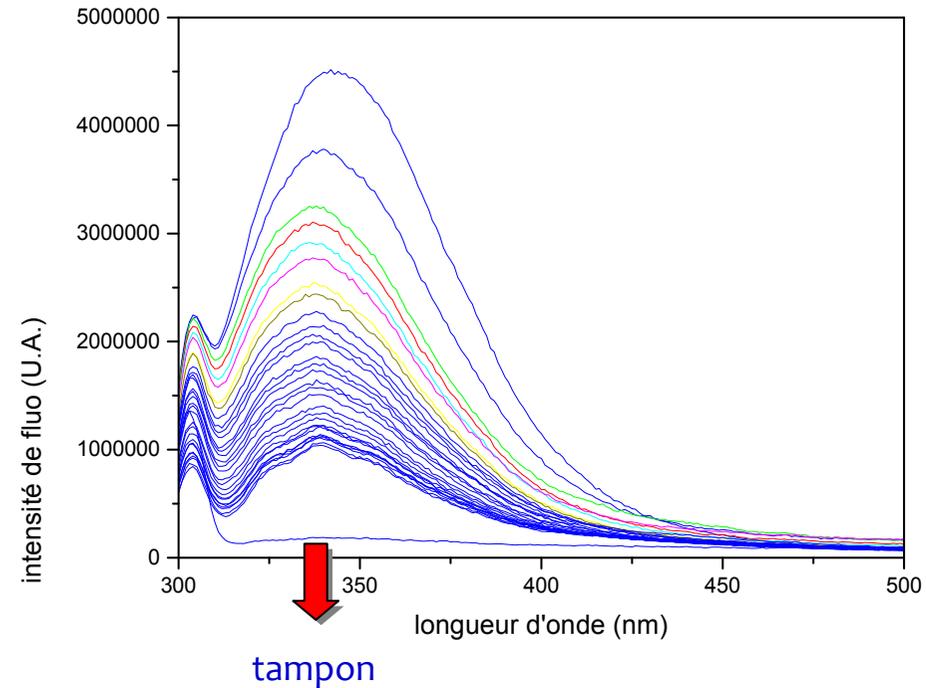
✓ Evaluer l'intensité de fluorescence pour chaque spectre



✓ Corriger les données par la fluorescence du tampon

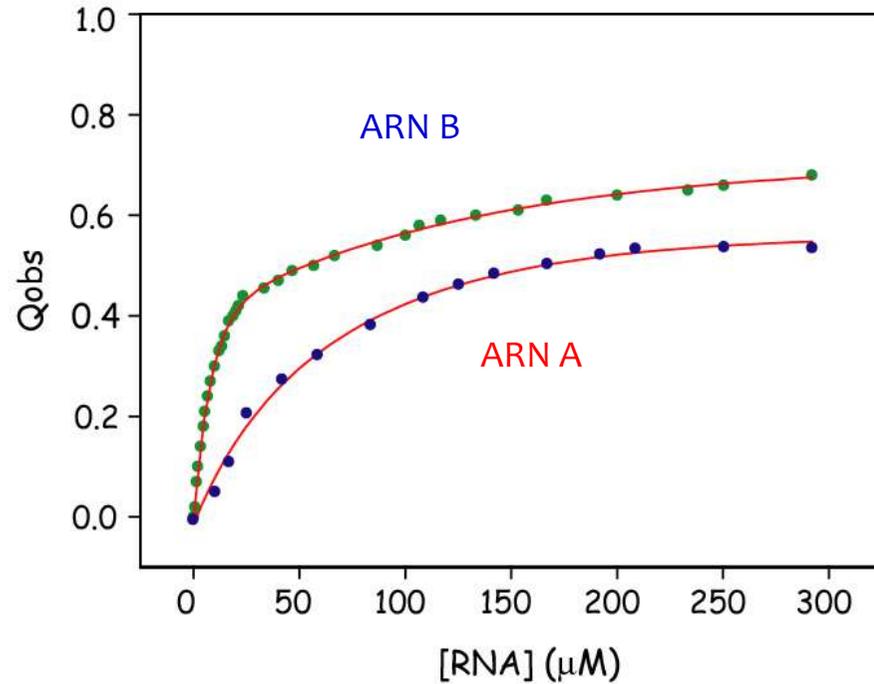


✓ Corriger les données par l'effet de dilution



✓ Représenter la variation du signal de fluorescence en fonction de la concentration d'acide nucléique

## Exploitation de la fluorescence intrinsèque des protéines



Quels ARN possède la plus forte affinité pour la protéine étudiée?

Fit des données par un modèle mathématique afin de déterminer les paramètres de liaison

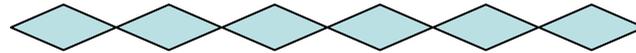


$K_d$  constante de dissociation,  
 $\omega$  coopérativité de liaison,  
 $n$  stœchiométrie de liaison

## Analyse de titrages acide nucléique / protéine

### Modèle de McGhee et von Hippel (1974):

- L'acide nucléique (substrat) est considéré comme un réseau formé de unités répétitives (*dans notre cas des nucléotides*)

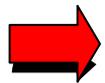
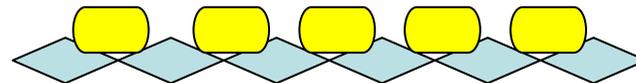


- Le réseau est infiniment long

- La protéine (le ligand) se lie de manière polaire avec une orientation définie

- Une protéine qui lie l'acide nucléique couvre n nucléotides successifs et le substrat est entièrement recouvert par le ligand

- Les interactions protéine-protéine ne peuvent avoir lieu qu'entre protéines voisines

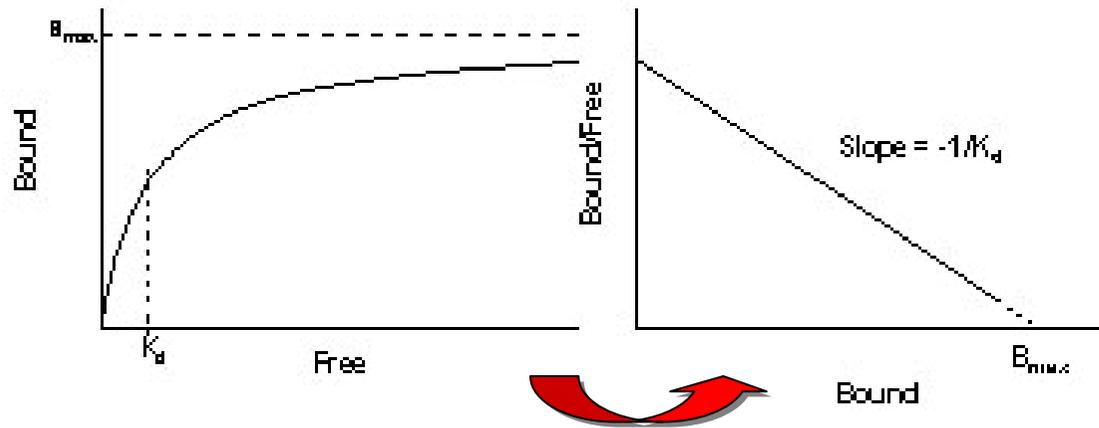


Information sur la coopérativité de la liaison

# Analyse de titrages acide nucléique / protéine

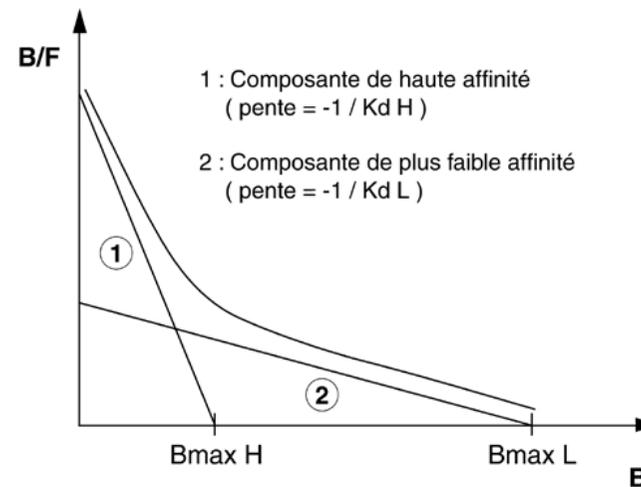
Modèle de Scatchard (1949):

Stœchiométrie 1 : 1

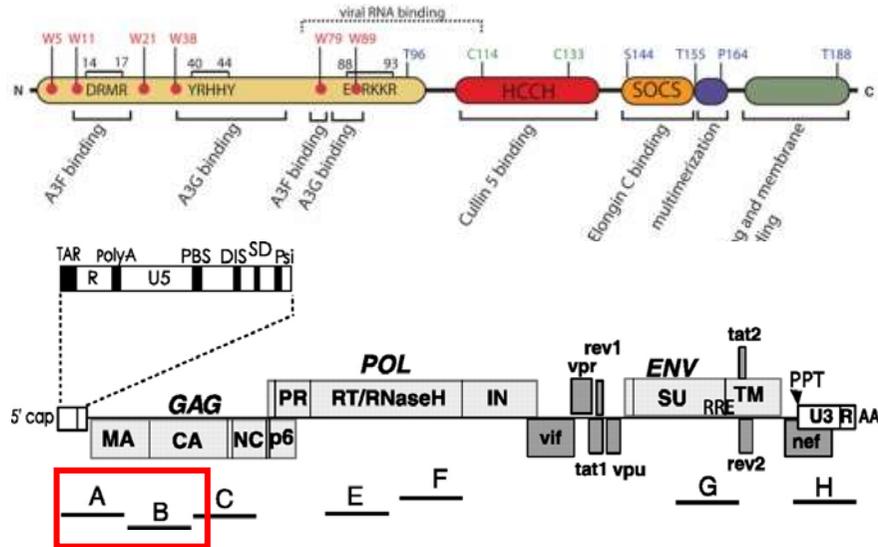


$$B = K_d F / (1 + K_d F)$$

Stœchiométrie 2 : 1



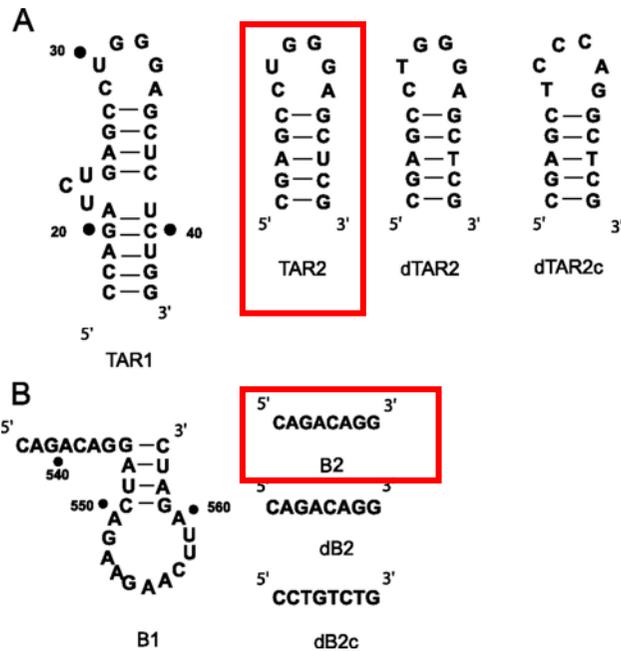
# Viral Infectivity Factor, 23KDa



Exemple: protéine Vif du VIH-1

ARN viral du VIH-1: quelle région du génome est fixée par la protéine Vif?

ARNs 500nts → Modèle McGhee



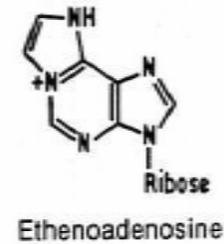
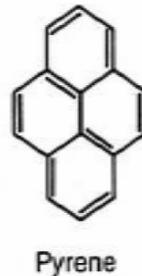
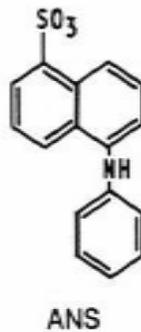
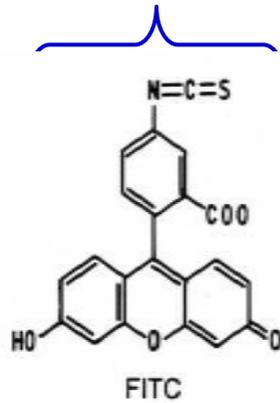
Etude des sites à haute affinité

Oligos → Modèle Scatchard

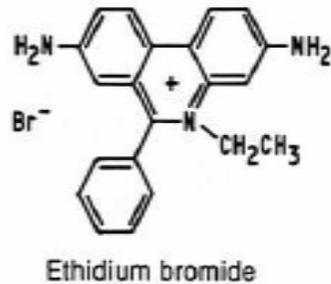
- Bernacchi et al., 2007 J Biol Chem

## Exemples des sondes de fluorescence

Conjugué avec les  
macromolécules biologiques  
(liaison covalente)

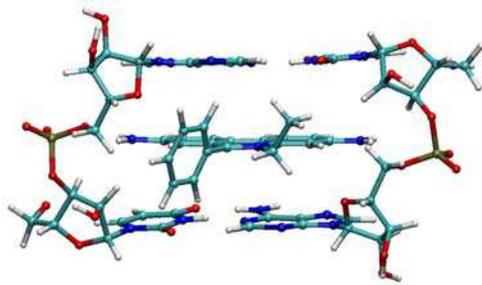


Analogue  
fluorescente d'une  
base nucléotidique

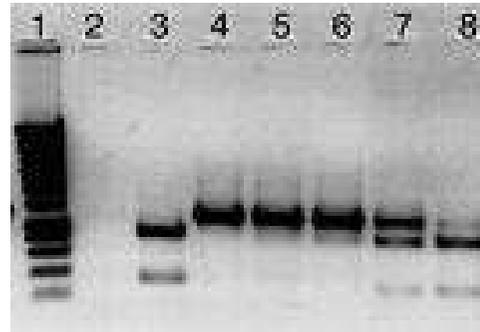


Intercalant d'ADN

Marquage des acides nucléiques:  
Intercalant d'ADN

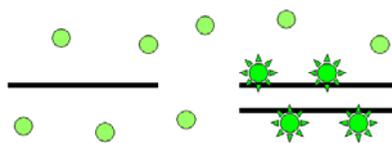


Sonde BET entre deux paires de bases



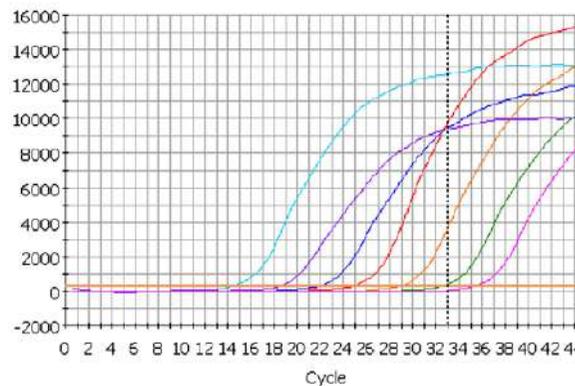
Application: électrophorèse

Fluorescence de la sonde est exaltée lors qu'elle s'intercale entre deux paires de bases

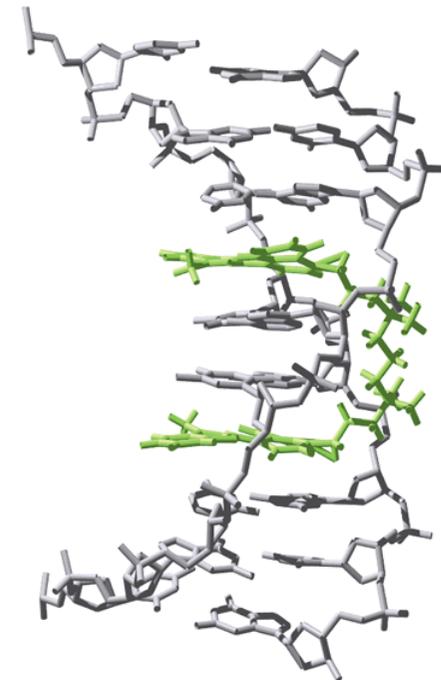


Sonde SybGreen

Spécifique de l'ADN double brin



Application: PCR (Polymerase Chain Réaction)



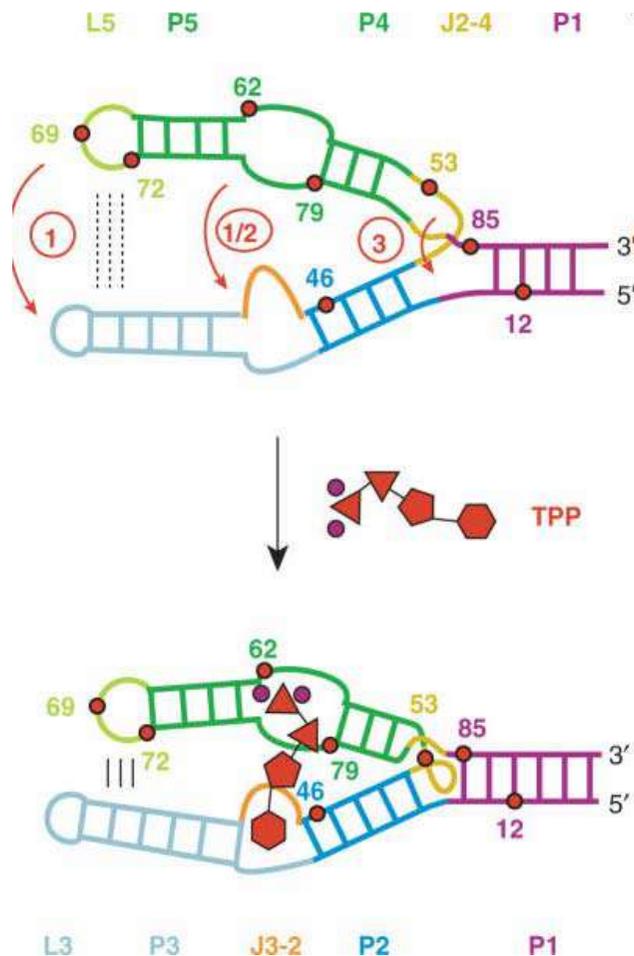
Structure RMN de la sonde TOTO lié à l'ADN

➤ Meilleure affinité par rapport au BET (bis intercalant)



Marquage des acides nucléiques:  
analogues fluorescents de bases

Ligand-induced folding of the thiM TPP riboswitch investigated by a structure-based fluorescence spectroscopic approach.

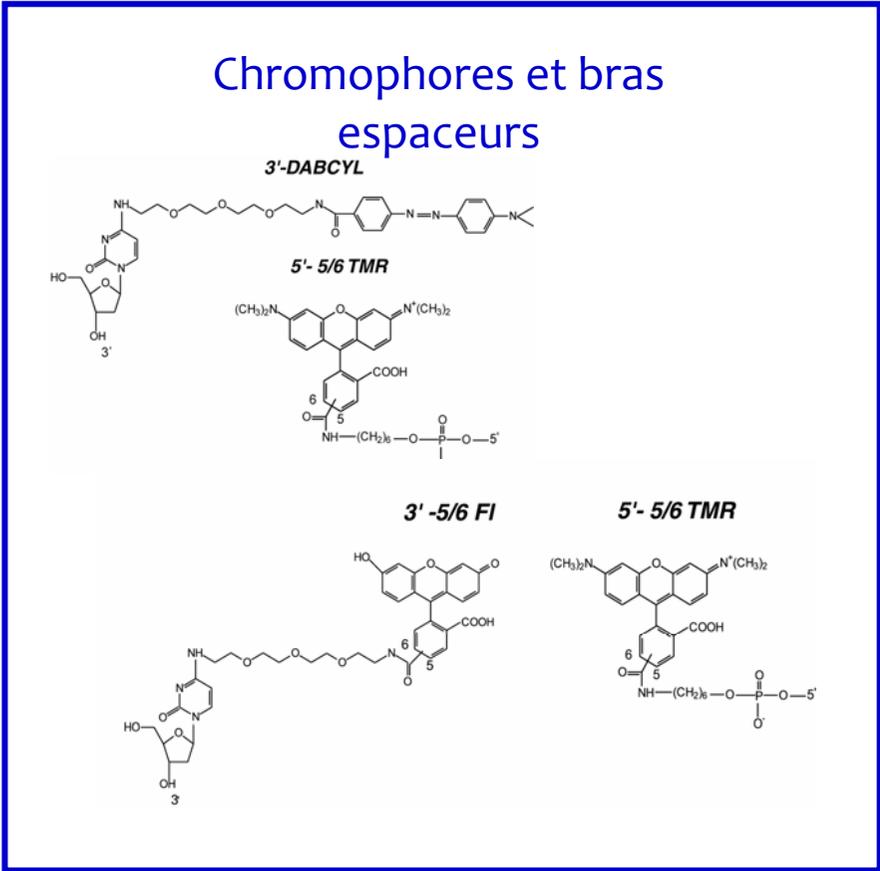


2-aminopurine (AP) nucleobase replacement to monitor formation of tertiary interactions during ligand binding in real time by fluorescence experiments.

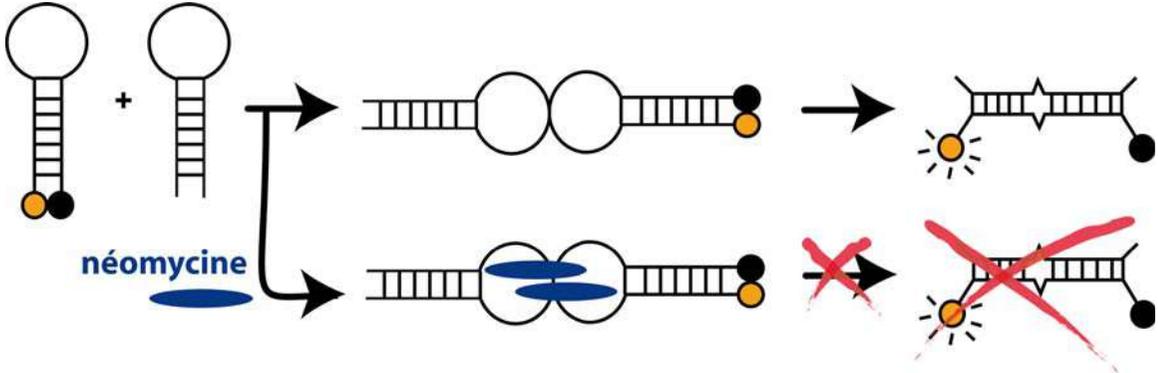
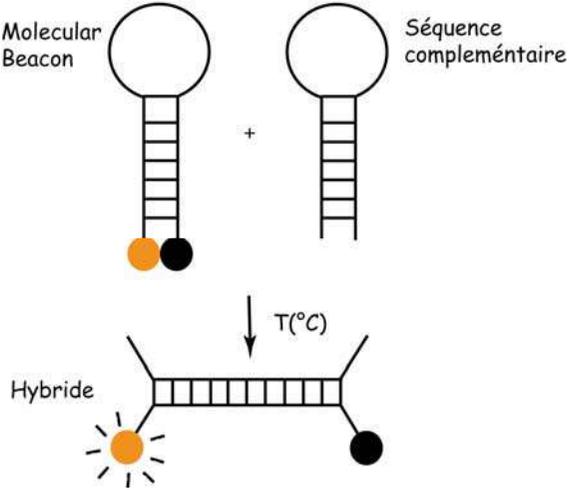
Ligand-induced folding of a thiamine pyrophosphate (TPP) responsive riboswitch.

- Lang et al., 2007, Nucleic Acids Res

Marquage des acides nucléiques:  
liaison covalente



**Molecular Beacon**

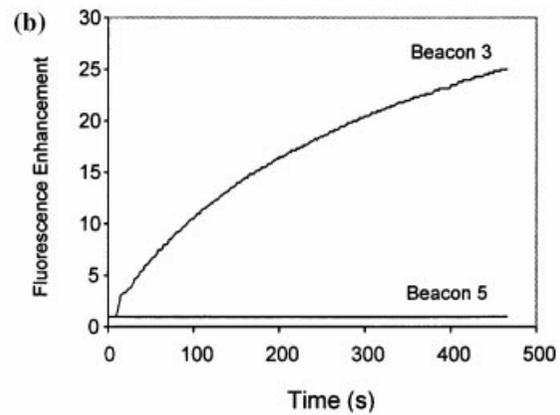
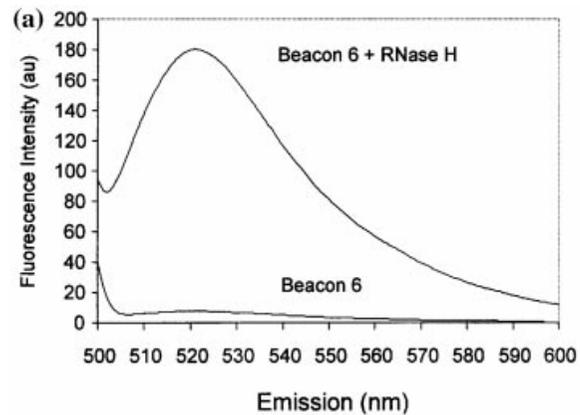


Applications: « biosenseurs » ADN, PCR, interaction acide nucléique/ligand...

## Molecular Beacons: applications

### Chimeric RNA:DNA molecular beacon assay for ribonuclease H activity

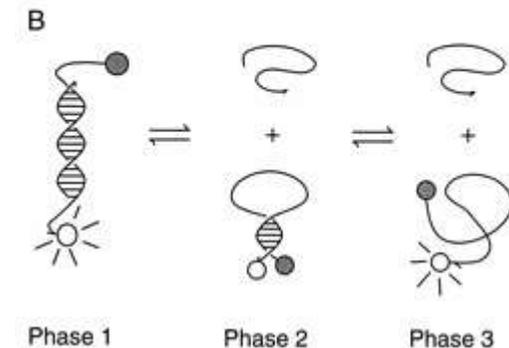
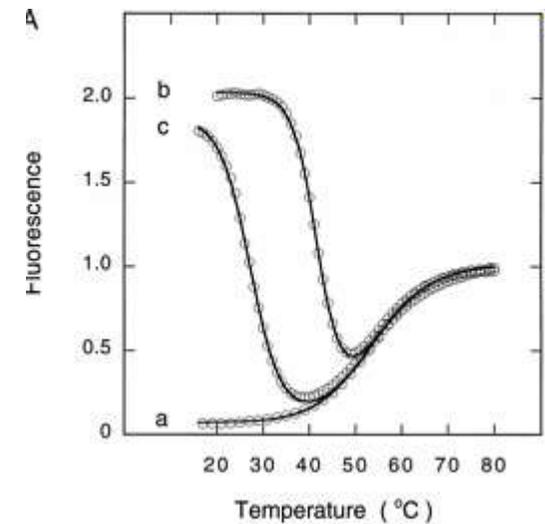
RNase H specifically hydrolyzes the RNA strand of an RNA:DNA duplex through an endonucleolytic mechanism.



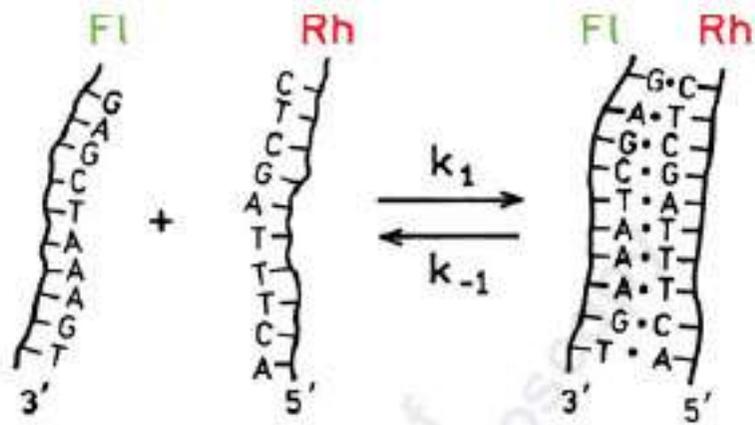
Contrôle: MB non chimérique

- Rizzo et al., 2002, Molecular and Cellular Probes

### Evaluation de la température de fusion d'un acide nucléique



Marquage des acides nucléiques:  
liaison covalente



$$K_{eq} = k_1 / k_{-1}$$

Constante d'équilibre =  
rapport des constantes cinétiques

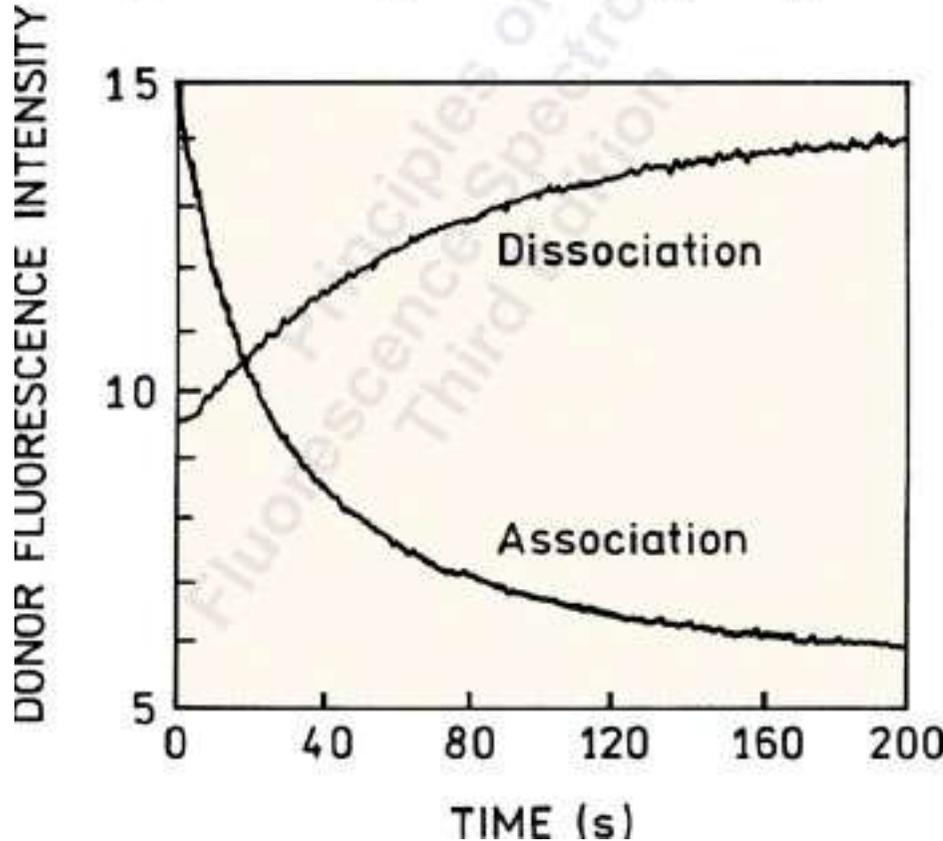
Cinétique par fluorescence

FI et Rh constituent un couple  
donneur/accepteur



FRET

Transfert d'énergie non-radiatif



# Fluorescence Resonance Energy Transfert (FRET)

## Vitesse de transfert

$$K_T = 8.71 \times 10^{23} \frac{k^2 \phi_D}{R^6 \tau_D} n^{-4} J_{AD} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6$$

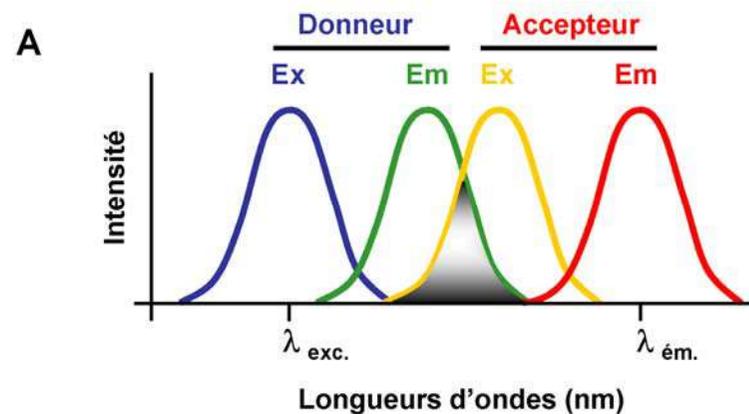
Föster, 1949

- $\phi_D$  et  $\tau_D$  désignent respectivement le **rendement quantique** et la **durée de vie du donneur**,  $R$  est la **distance** entre les chromophores,  $n$  est l'**indice de réfraction** du milieu.
- $k^2$  représente un **facteur géométrique** qui caractérise l'orientation entre les moments de dipôle de transition des deux chromophores.

normalement  $k^2$  est égal à  $2/3$ , ce qui correspond à une situation où le donneur et l'accepteur sont libres de prendre toutes les orientations possibles pendant la durée de vie de l'état excité du donneur.

- l'intégrale  $J_{AD}$  représente le **recouvrement** entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur :

$$J_{AD} = \int \varepsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$



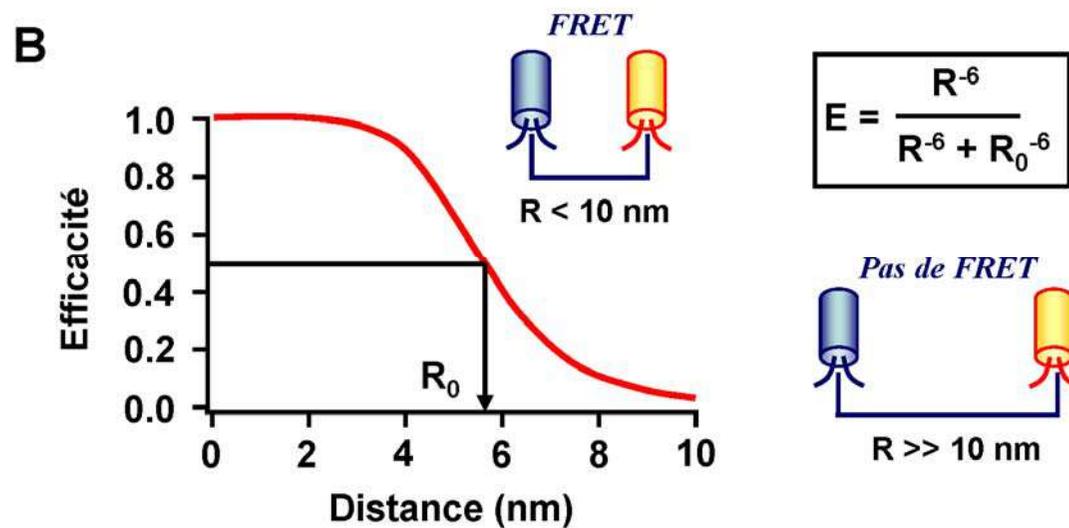
# Fluorescence Resonance Energy Transfert (FRET)

## Vitesse de transfert

$$K_T = 8.71 \times 10^{23} \frac{k^2 \phi_D}{R^6 \tau_D} n^{-4} J_{AD} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6$$

$R_0$  est la **distance critique de Förster** :

$$R_0 = (8.79 \times 10^{23} n^{-4} \phi_D k^2 J_{AD})^{1/6}$$



Efficacité de transfert

Expérimentalement,  
l'efficacité du  
transfert d'énergie



$$E = 1 - F_{DA}/F_D$$

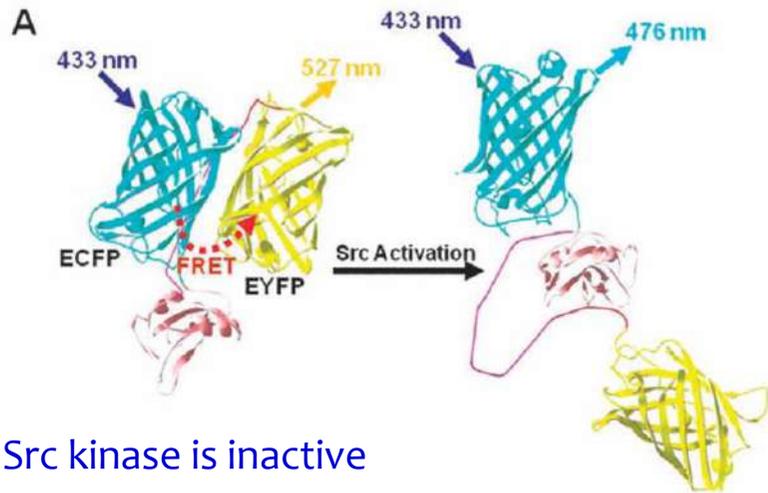
$$E = 1 - \tau_{DA}/\tau_D$$

L'efficacité de transfert varie entre 0 et 1. En pratique, la gamme des distances mesurables par le FRET est comprise entre  $R_0/2$  et  $2R_0$ .

$R_0$  dépend du couple donneur/accepteur (10-100 Å)

## Mechanism of the Src biosensor

FRET: exemples



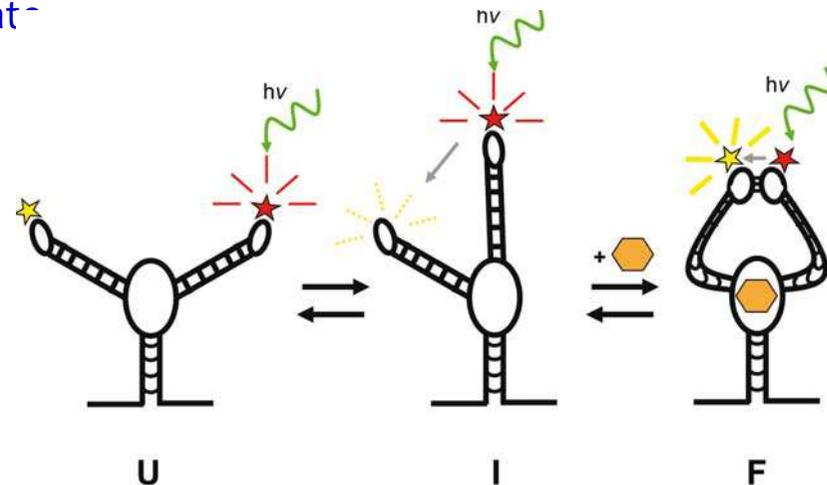
Src kinase is inactive

FRET

Src kinase is activated  
to phosphorylate the substrate

- Wang et Wang, 2009, Integr Biol

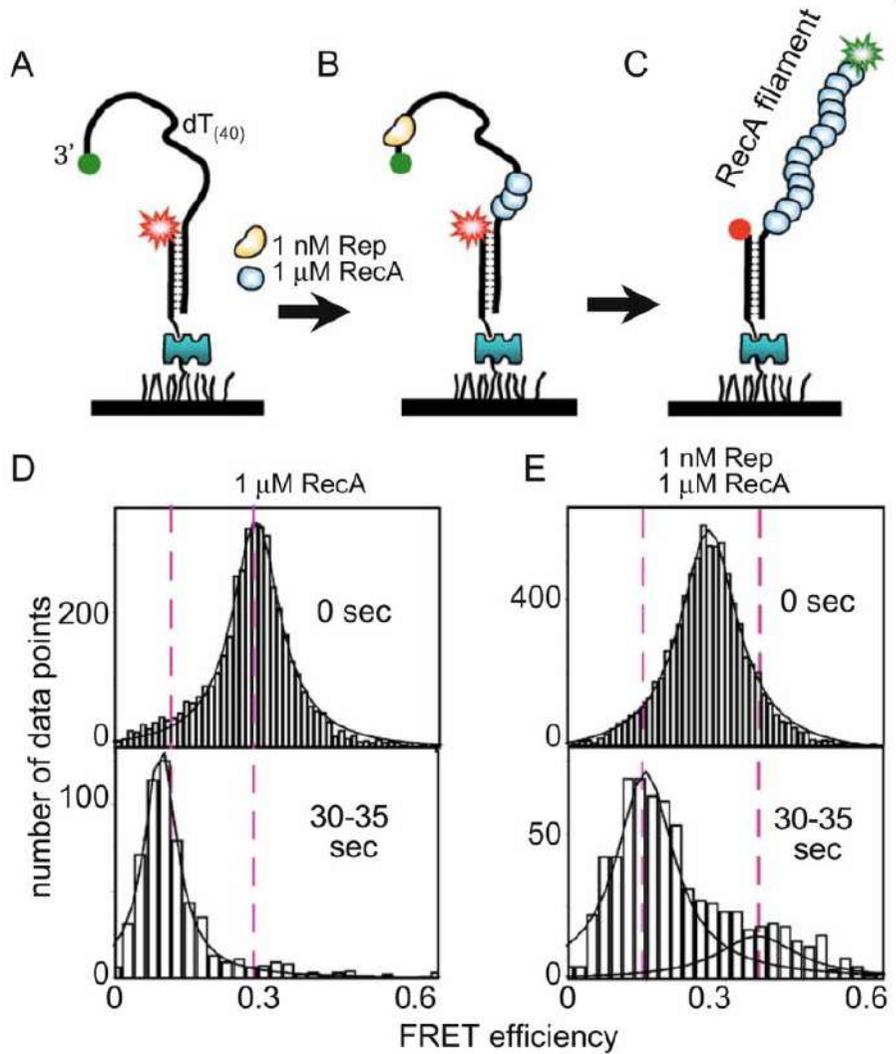
## Formation of a tertiary contact of the adenine riboswitch



- Frenandez-Luna & Miranda-Rios, 2008, RNA Biology

FRET: exemples

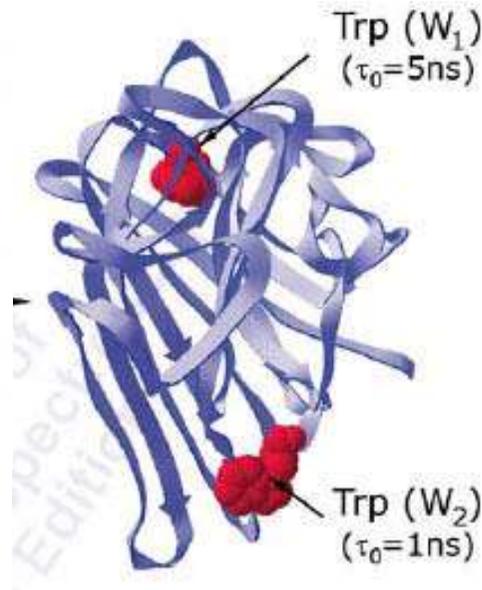
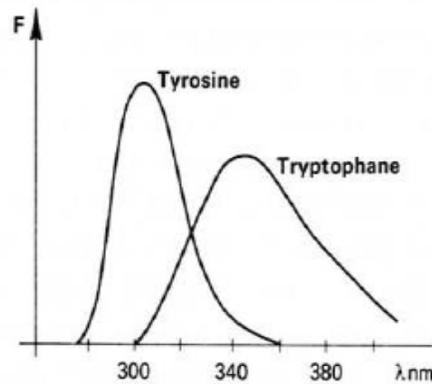
Rep helicase inhibits assembly of RecA on ssDNA.



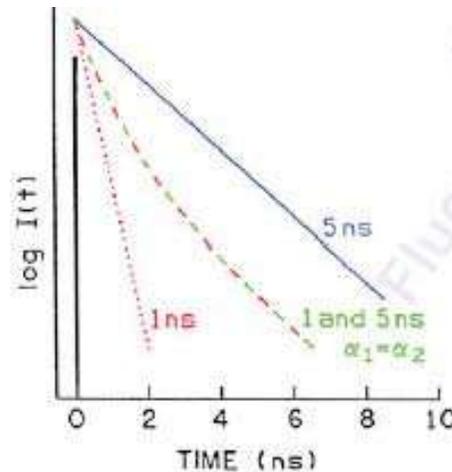
• Leuba et al., 2008, Chromosome Res.

Fluorescence résolue en temps:  
Durées de vie

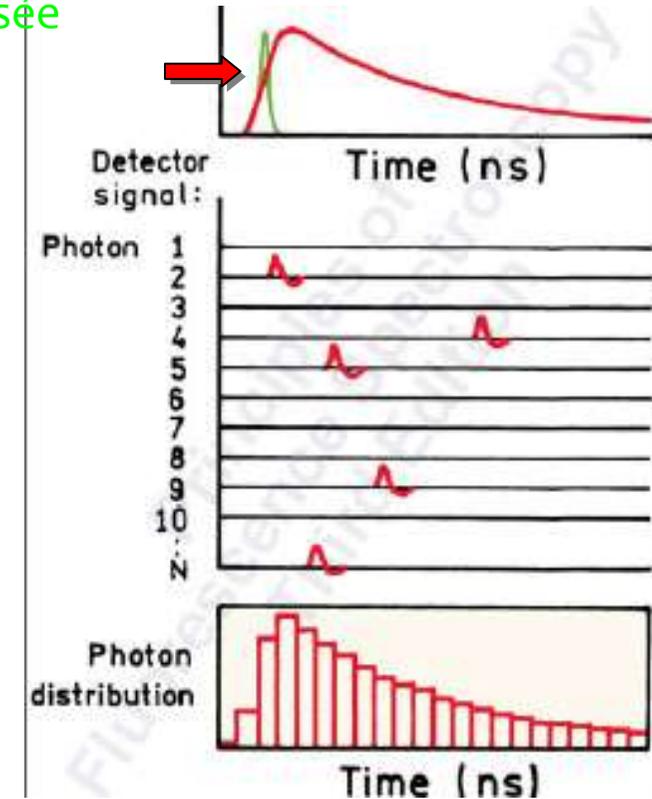
La fluorescence statique représente une moyenne entre l'émission fluorescente de chaque sonde.



La fluorescence résolue en temps permet d'avoir des informations sur la contribution de chaque sonde.



Excitation  
pulsée



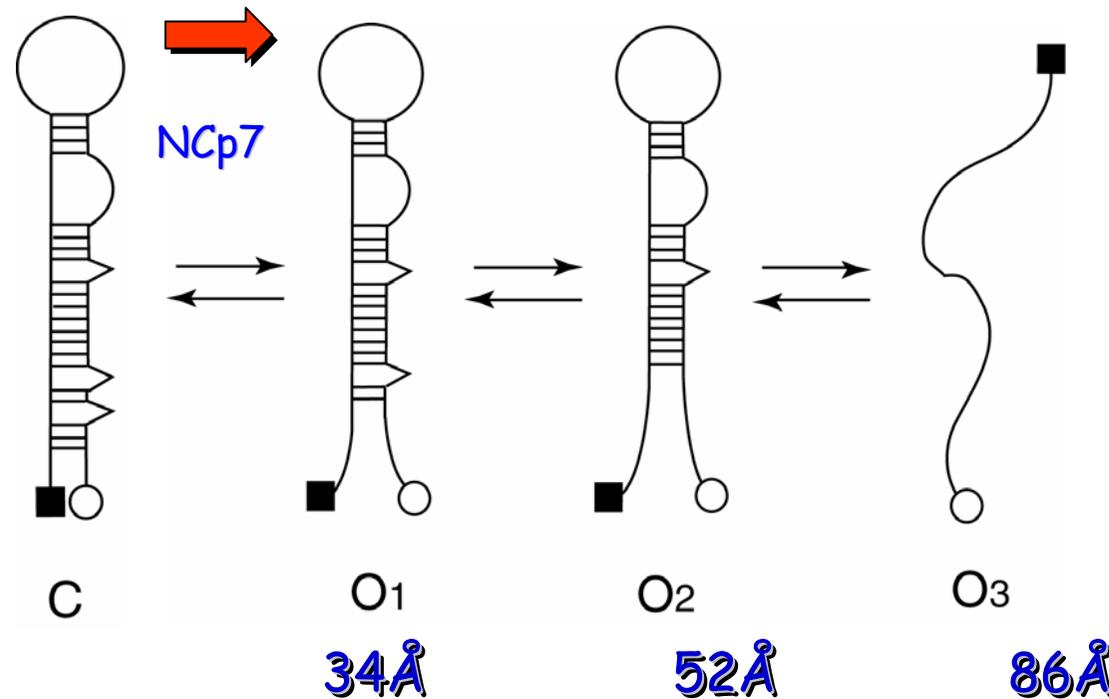
Deconvolution  
(fit multiexponentiels)



Durées de vie

Fluorescence résolue en temps:  
Durées de vie

Tige-boucle TAR du génome du VIH-1 qui nécessite une forte déstabilisation de la part de la protéine virale NCp7 pour que la transcription inverse s'accomplisse.



Analyse des durées de vie



FRET



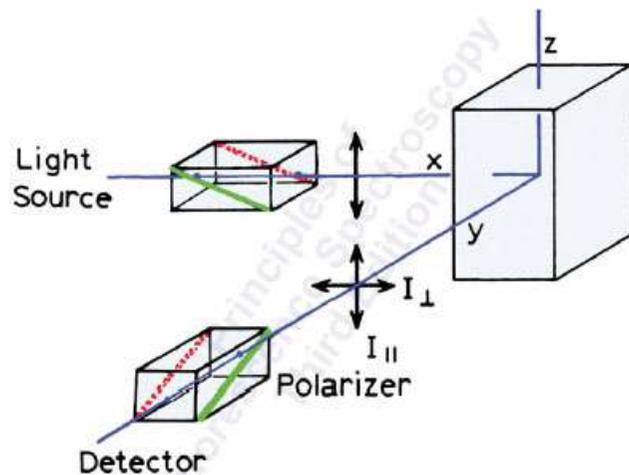
Distances entre les sondes

NCp7 déplace l'équilibre entre les formes ouvertes.

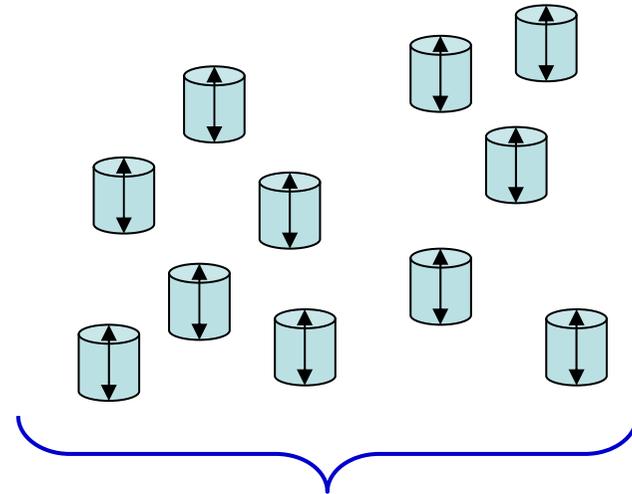
## Anisotropie de fluorescence

Lorsque la lumière excitatrice est polarisée, la fluorescence émise par un certain nombre de molécules l'est également.

L'amplitude de cette polarisation est décrite en terme d'**anisotropie**.



Lumière excitation polarisée

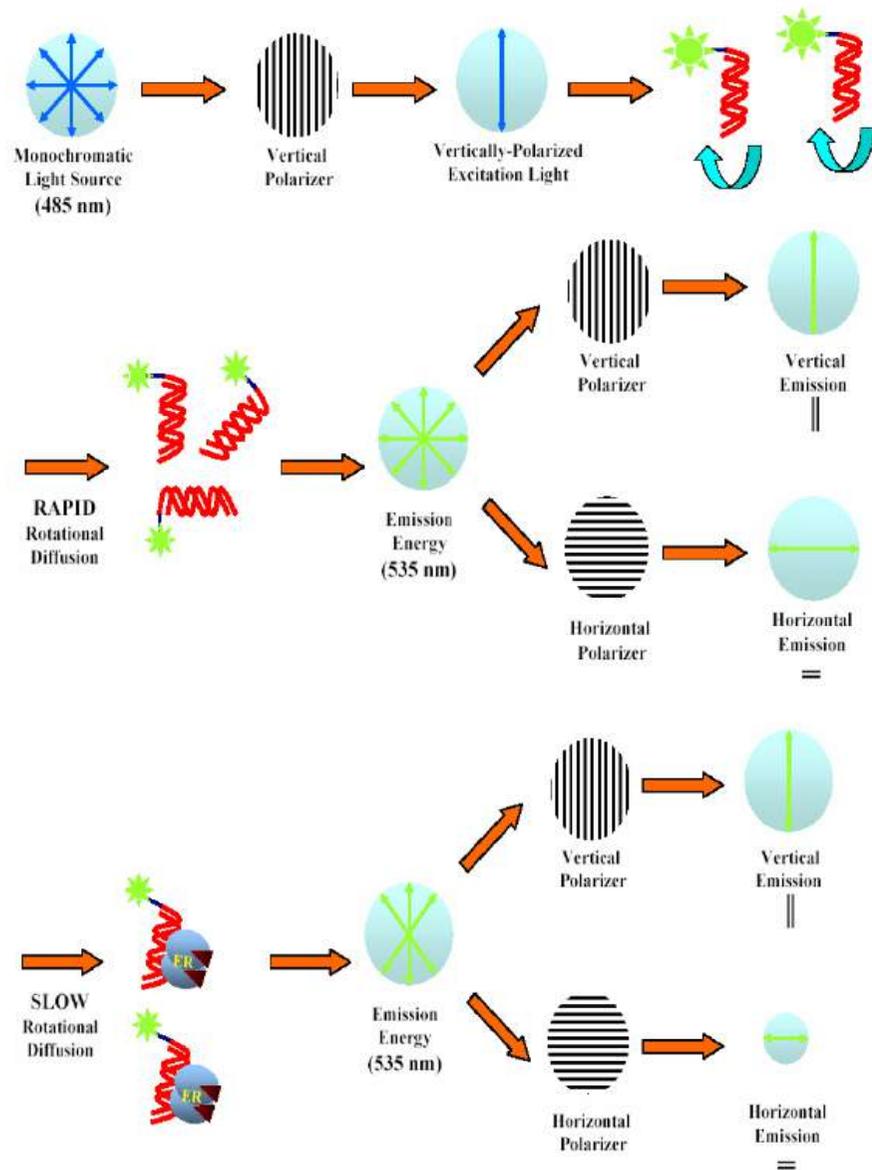


Dipôle de transition // lumière incidente

Photosélection

L'anisotropie de fluorescence est définie comme :  $A = r = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + 2F_{\perp})$

# Anisotropie de fluorescence



Diffusion rapide des molécules

Emission verticale ~ émission horizontale

$A \sim 0$

Diffusion lente des molécules

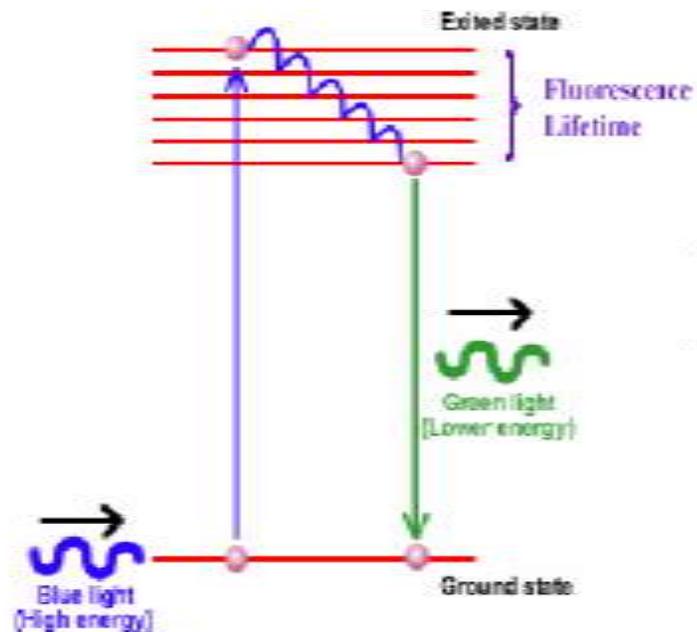
Emission verticale  $\neq$  émission horizontale

$A \neq 0$

 Quels sont les paramètres qui déterminent la diffusion des molécules?

## Anisotropie de fluorescence

L'anisotropie peut être également exprimée en fonction du temps de vie  $\tau$ , et du temps de corrélation de rotation  $\Theta$ .



Equation de Perrin

$$r_0 / r = 1 + \tau / \Theta$$

$$r_0 = 0,4$$

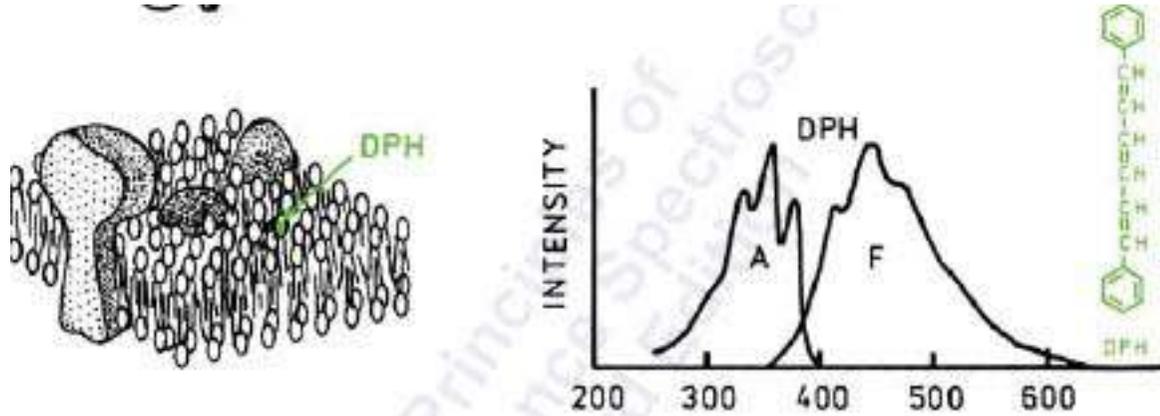
$$\Theta = \eta V / RT = 1/6D$$

Temps nécessaire à la molécule pour décrire un angle

$\eta$  viscosité du solvant, V volume fluorophore, et T température

D coefficient de diffusion rotationnelle

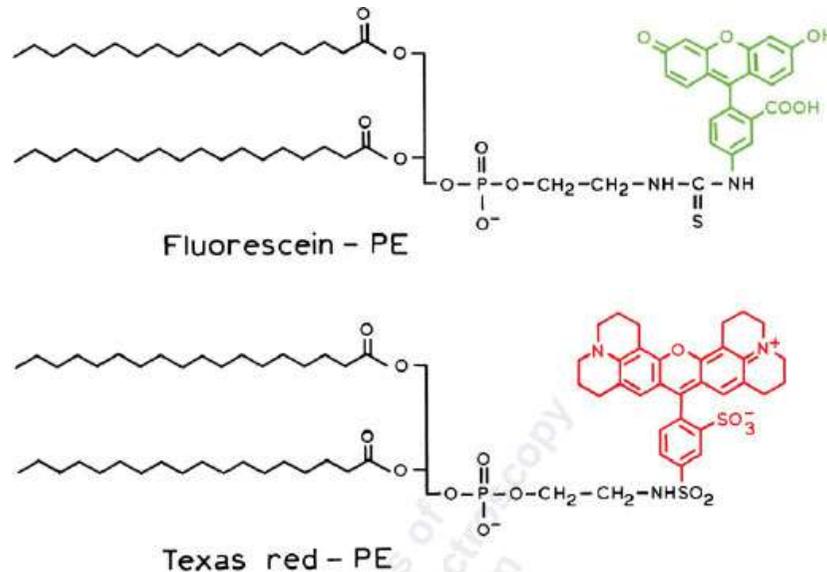
## (Une possible) application de l'anisotropie



## Marquage de membrane

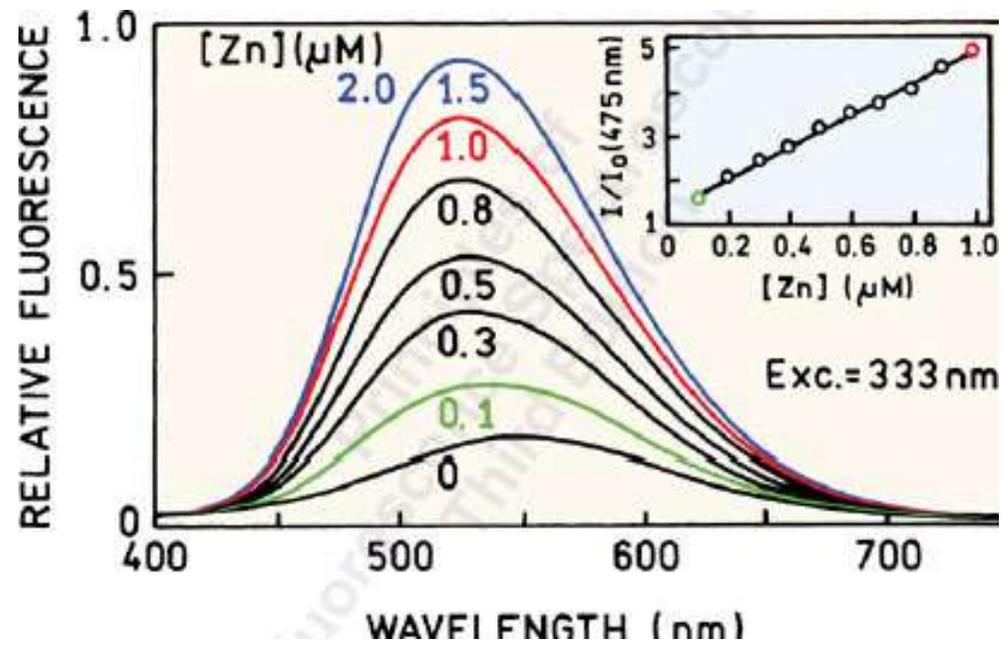
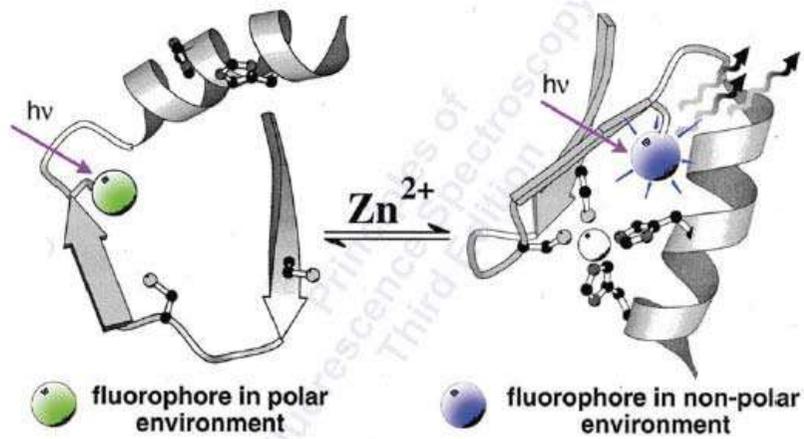
Le DPH est très faiblement fluorescent en solution.

Le rendement quantique augmente considérablement si la sonde se trouve à l'intérieur de la membrane lipidique.



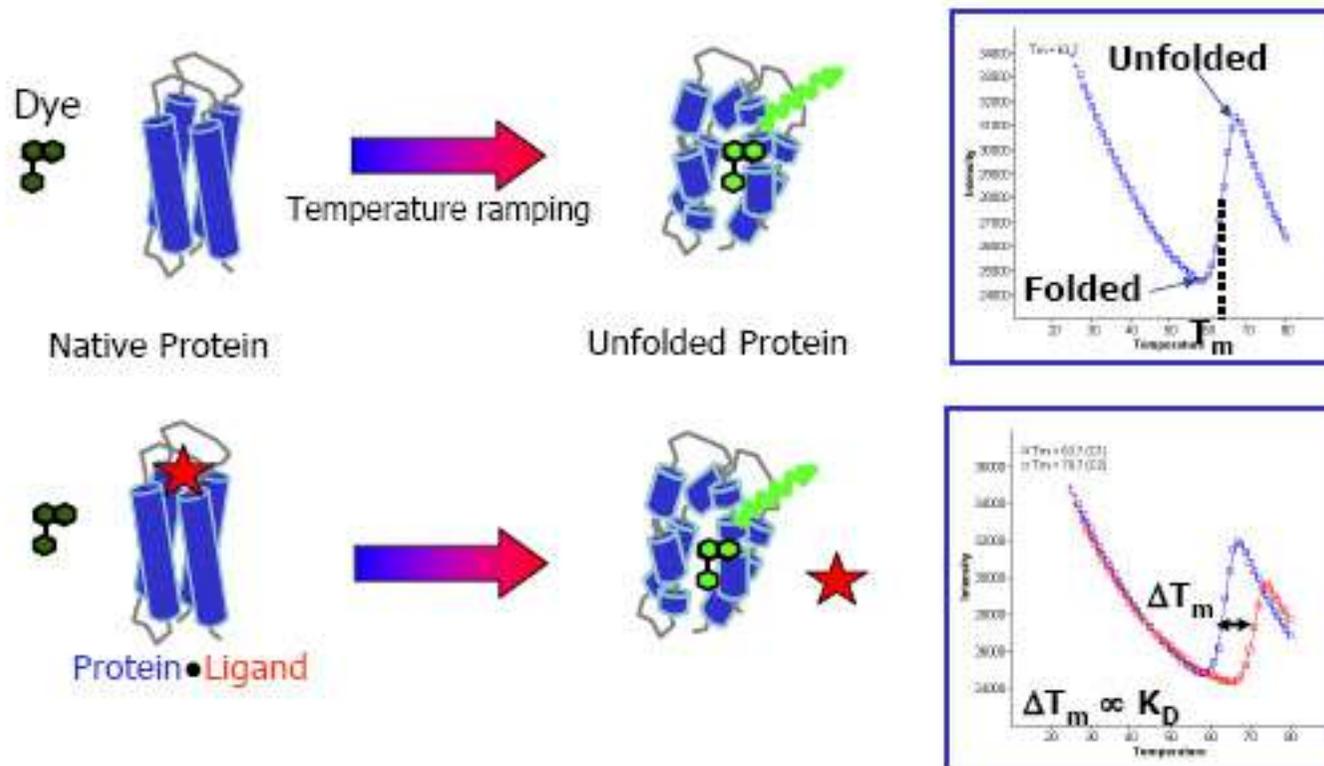
Exemples de marqueurs fluorescents de membrane

« Sensor protein »: suivi du repliement d'un doigt de Zn



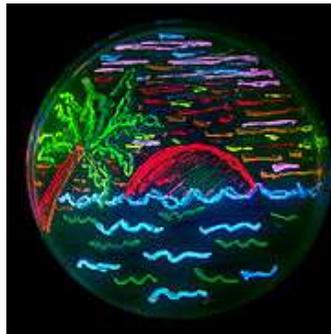
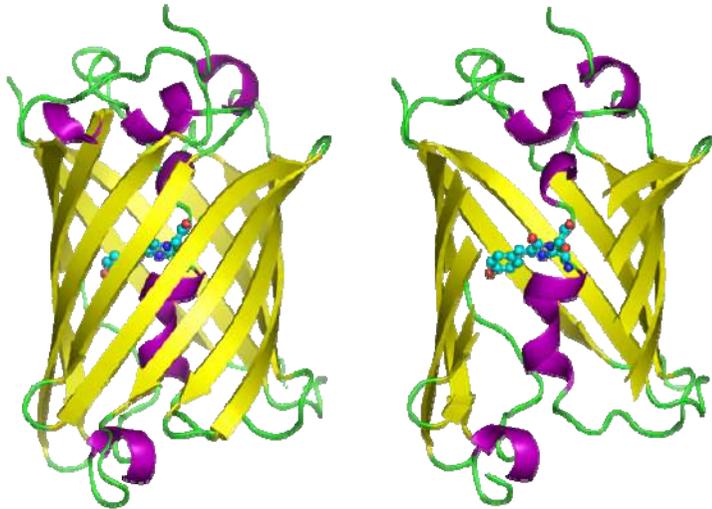
# Détermination du $T_m$ d'une protéine

## ThermoFluor®: Fluorescent Detection of Protein Unfolding



Informations sur l'interactions protéine/ligand

## Green Fluorescent Protein



\*

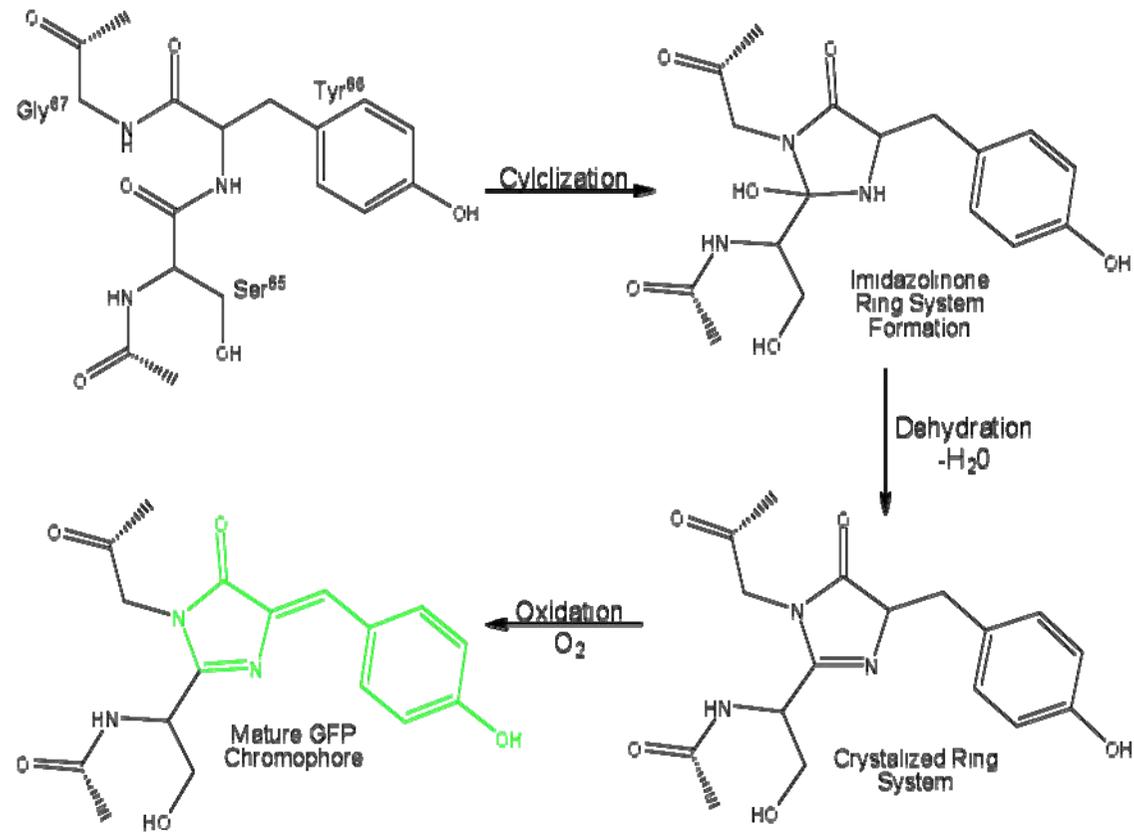
- Issue d'une méduse *Aequorea Victoria*
- Elle est constituée de 238 acides aminés. Le centre actif responsable de la fluorescence est constitué par les chaînes latérales d'une **glycine**, une **tyrosine** et une **sérine**.
- La GFP a deux maxima d'excitation. Le premier se trouve avec une longueur d'onde de 395 nm (lumière UV), le deuxième à 475 nm (lumière bleue). La longueur d'onde d'émission maximale est à 504 nm.
- **Son gène peut être fusionné *in-vitro* au gène d'une protéine que l'on souhaite étudier**



\*Jeu sur **boîte de Petri** de bactéries possédant un plasmide exprimant plusieurs GFP qui fluorescent à différentes longueurs d'onde (Labo de R. Tsien, Prix Nobel 2008).

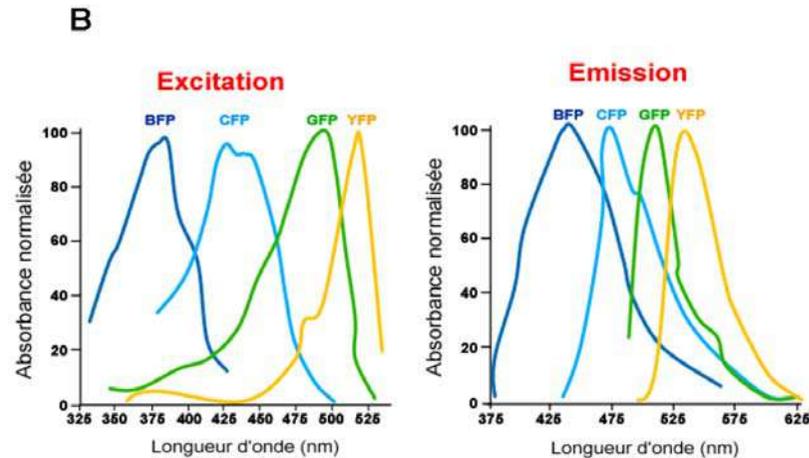
# Green Fluorescent Protein

Maturation post-traductionnelle du fluorophore de la GFP



## Dérivées de la GFP

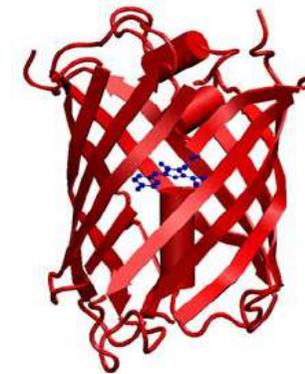
Il existe maintenant différentes variantes de la GFP qui ont été obtenues en modifiant celle-ci par ingénierie génétique:



Enhanced GFP  
ECyanFP  
EYellowFP  
EBlueFP

Il existe également d'autres protéines fluorescentes issues d'autres organismes que *A. Victoria*

DsRed : fluorescence rouge, issue d'un corail, du genre *Discosoma*.



DsRed et GFP  
ECFP et EYFP

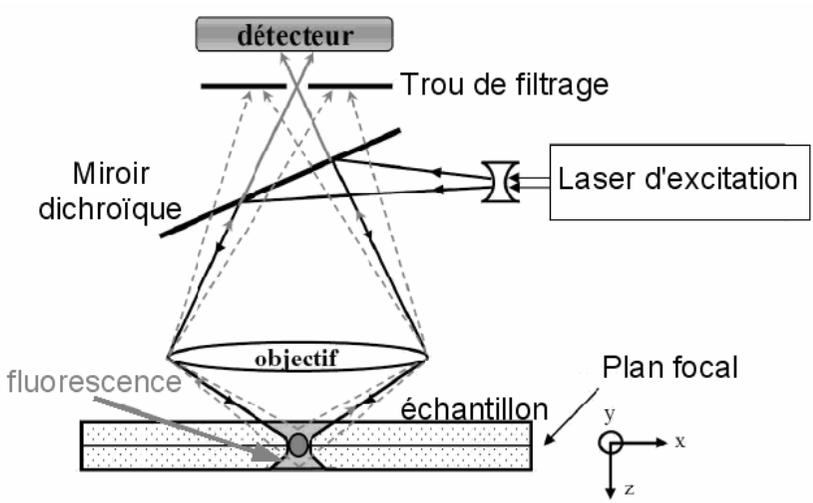


Constituent des couples  
Donneur/Accepteur  
FRET

<http://www.cytographica.com/animations/index.html>

Microscopie confocale

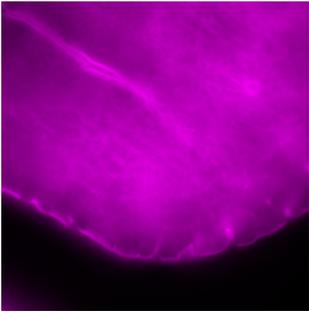
On illumine l'échantillon par un laser, qui balaie la surface en positionnant un **pinhole** devant le détecteur.



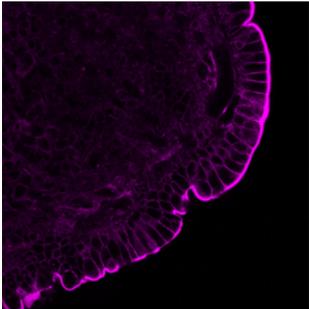
seuls les photons provenant du plan focal passent le « **pinhole** » et participent à la formation de l'image.

La lumière provenant des plans adjacents (floue) est arrêtée par les bords du trou.

actine



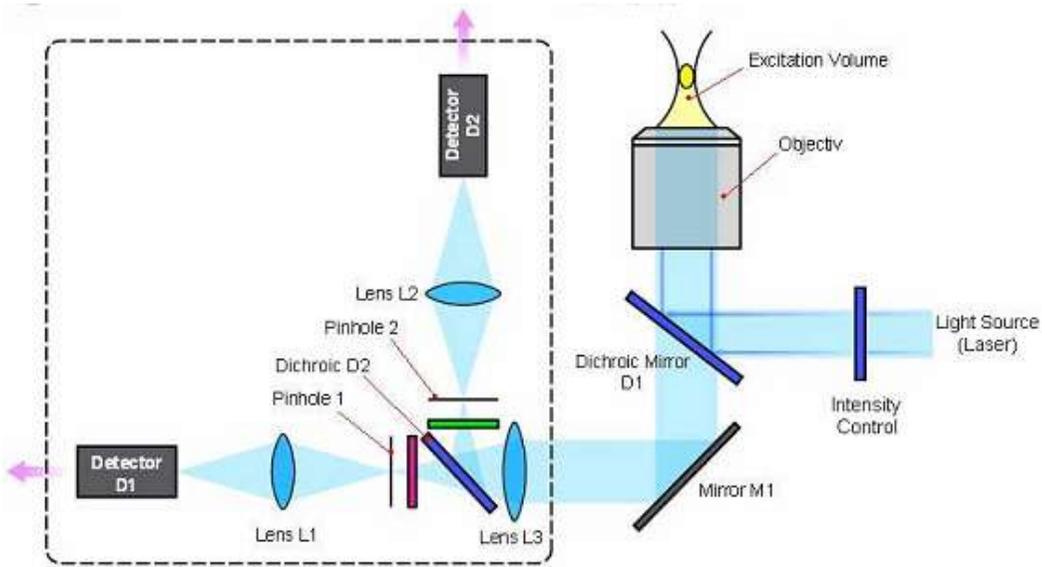
Champ large



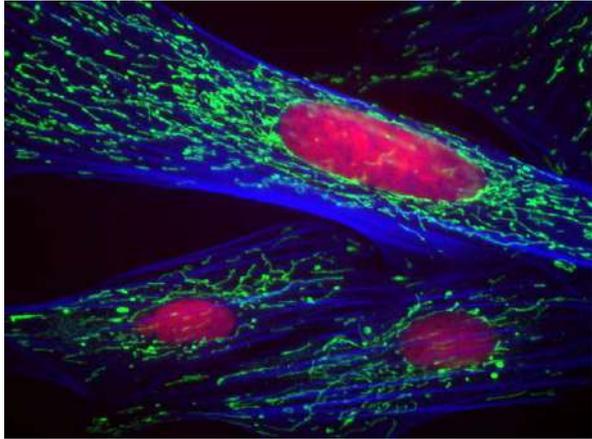
Confocal

Il est ainsi possible d'obtenir une coupe optique nette correspondant uniquement au plan focal.

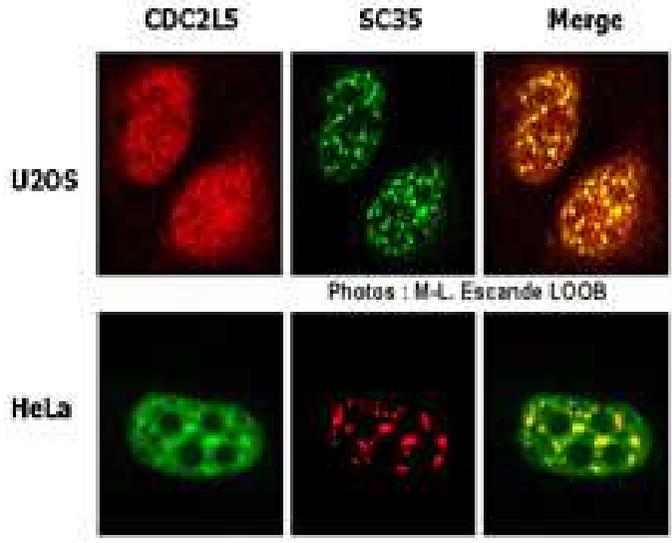
Microscopie confocale



Fibroblastes

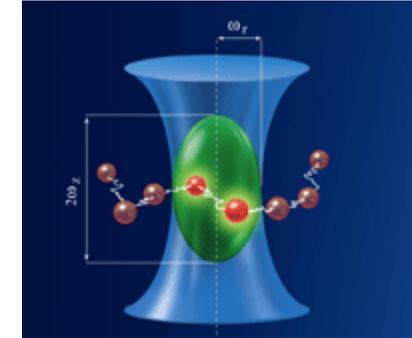
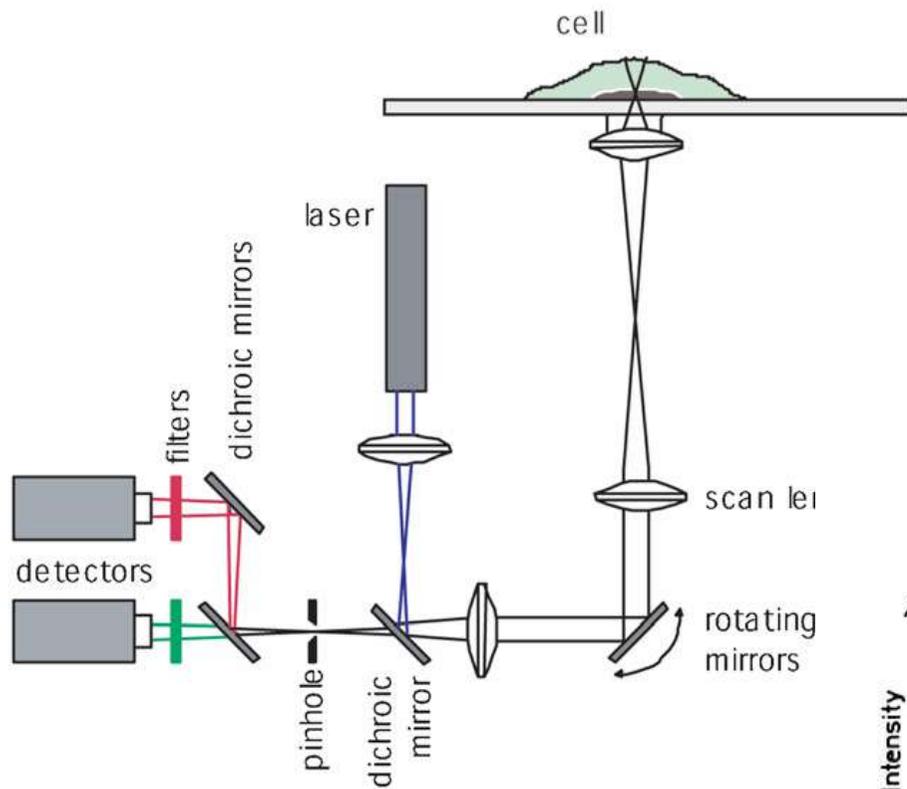


Marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine-AF350.  
Marquage des mitochondries avec un AbI et un AbII couplé AF500.  
Marquage du noyau par un intercalant de l'ADN, le TOPRO3.



Une application de la détection de la co-localisation de protéines marquées par immunofluorescence dans des lignées de cellules (Even et al., 2005) .

# Fluorescence Correlation Spectroscopy

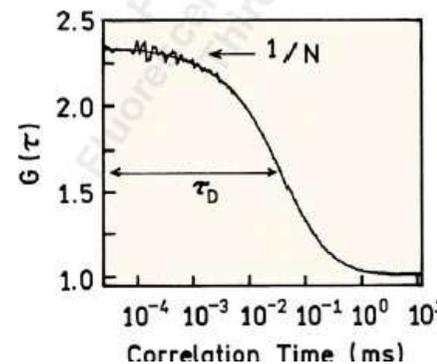
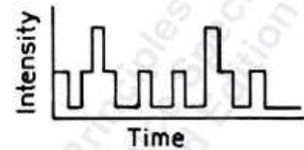
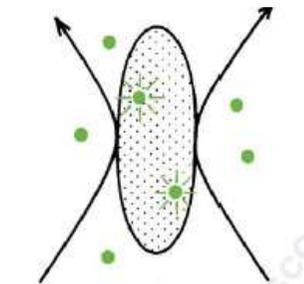


Volume focal  $\sim 10^{-15}$  l

La diffusion des molécules à l'intérieur du volume focale, provoque une fluctuation de l'intensité de fluorescence

A partir de l'intensité de fluorescence nous pouvons déterminer la fonction de auto-corrélation

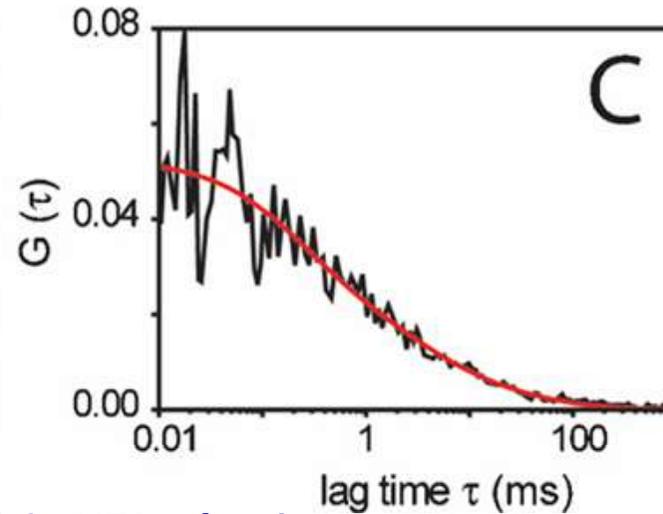
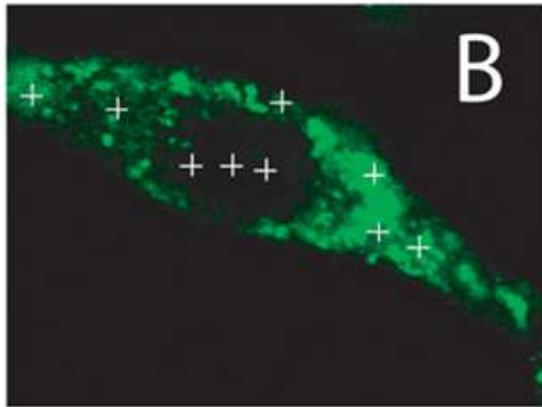
Informations sur le nombre ainsi que sur le temps de diffusion des molécules fluorescentes.



coefficient de diffusion (équation de Stokes-Einstein):

$$D = kT/6\pi\eta R$$

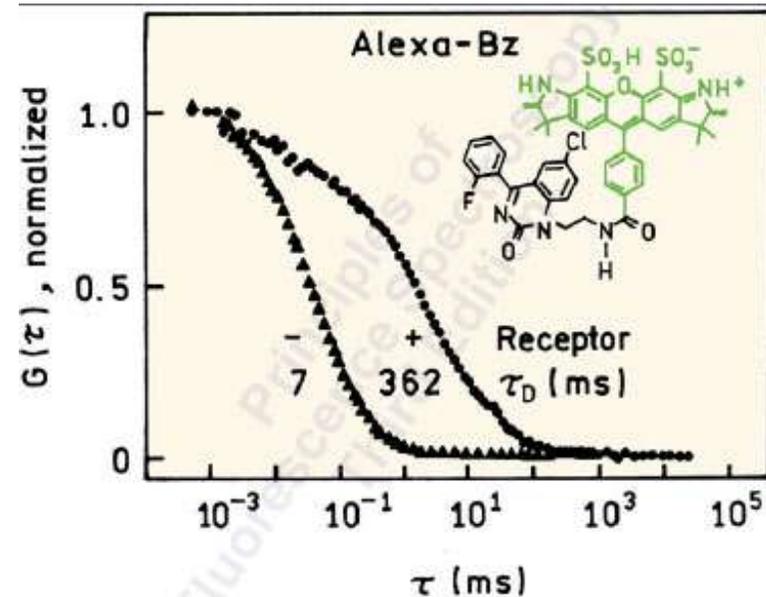
Etude du processus d'infection du virus SV40



(B) Image confocale d'une cellule RITA infectée par le virus EYFP-SV40; aux position indiquées (+), la fonction d'auto-corrélation a été acquise (C).

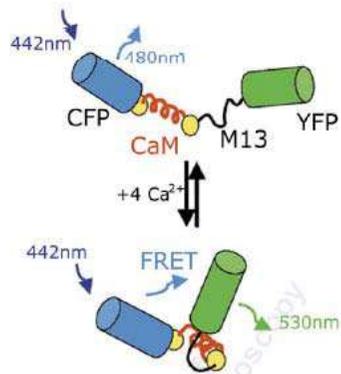
Développement des ligands

Diffusion de la sonde Alexa-Bz en solution et dans une cellule neuronale.



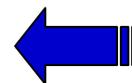
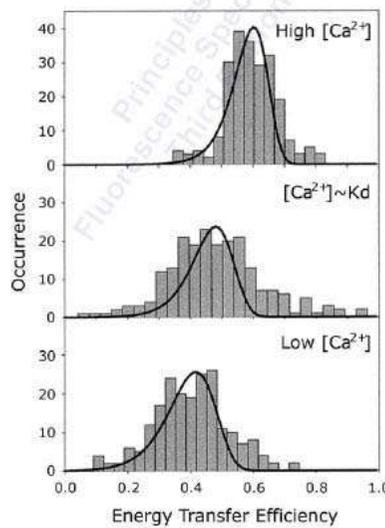
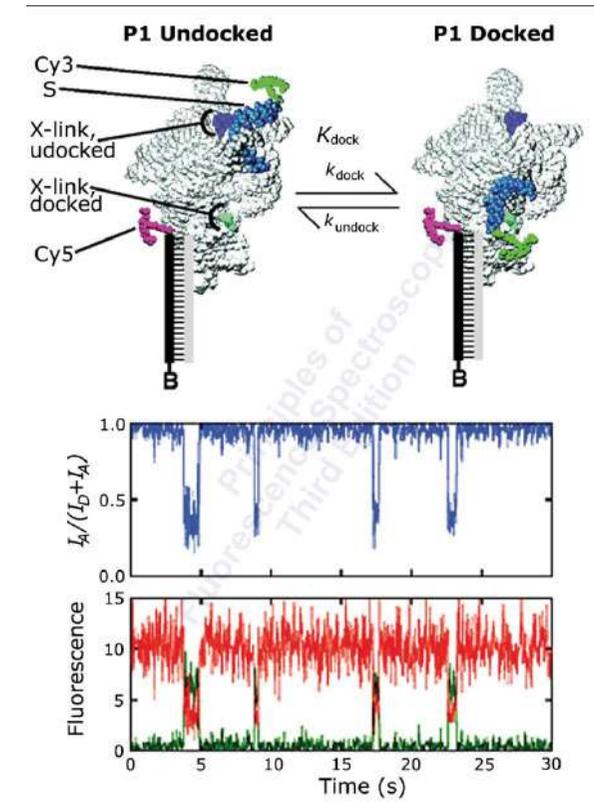
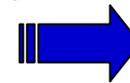
Expériences de molécule unique...comment optimiser le système

- Fluorophores immobilisés sur une surface
- Fluorophores avec meilleur rendement quantique possible et meilleur stabilité
- Photomultiplicateur adapté (optimisation signal/ bruit)



Expérience de FRET molécule unique sur un ribozyme (ARN catalytique).

Donneur Cy3 et accepteur Cy5

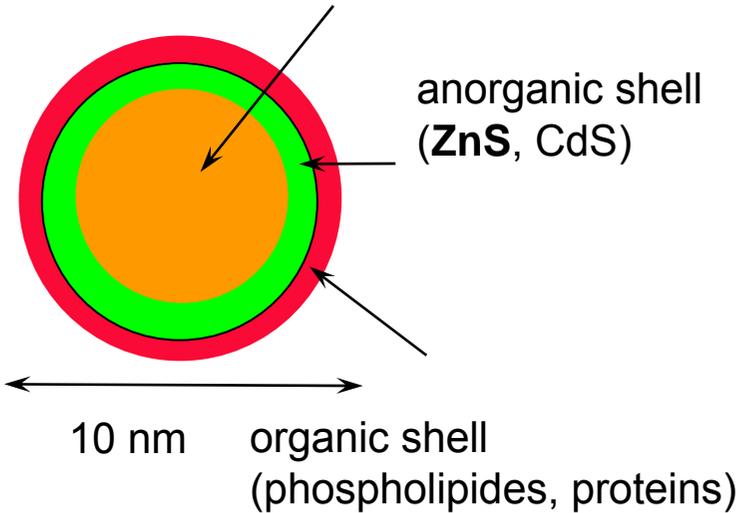


Détecteur de Calcium  
CFP-CaM et YFP-M13  
peptide

Quantum dots

Un fluorophore non aromatique...

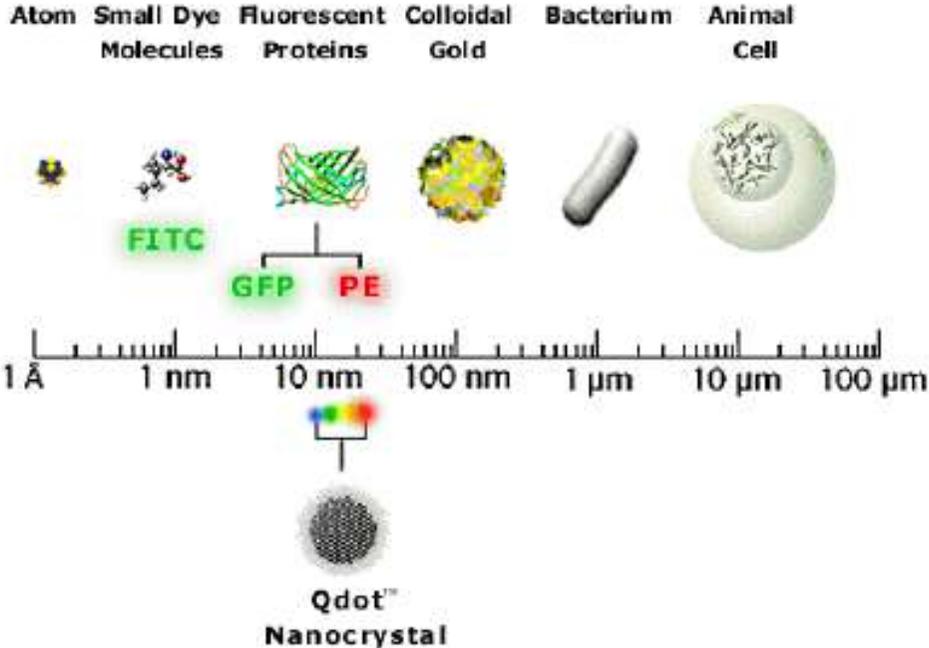
Core nanocrystals with size between 3-8 nm (CdSe, CdTe, CdS, ZnSe)



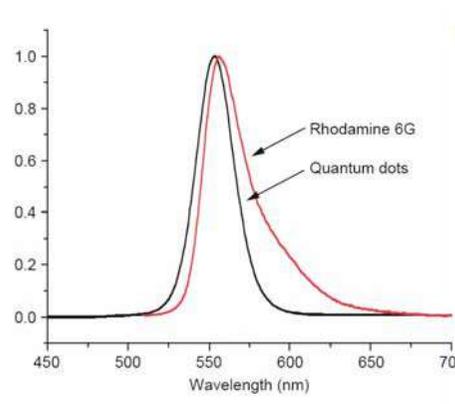
Facilement conjugable aux systèmes biologiques

Nano cristaux semi-conducteurs

Size Scale

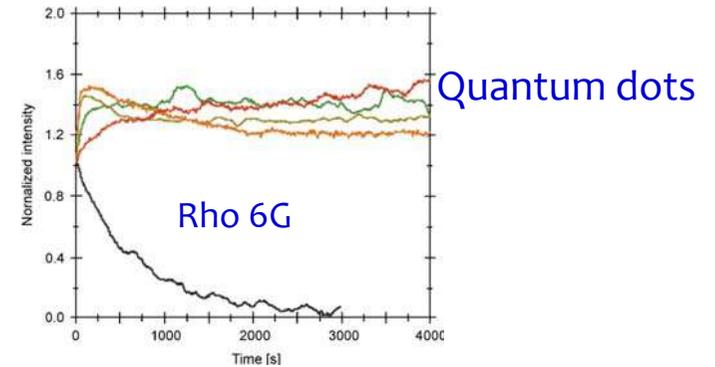


Très bon rendement quantique  
Emission fluorescente très fine

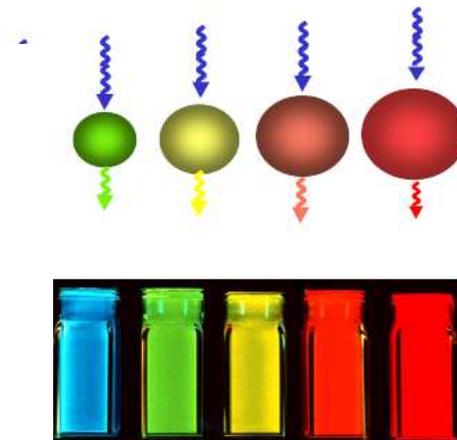
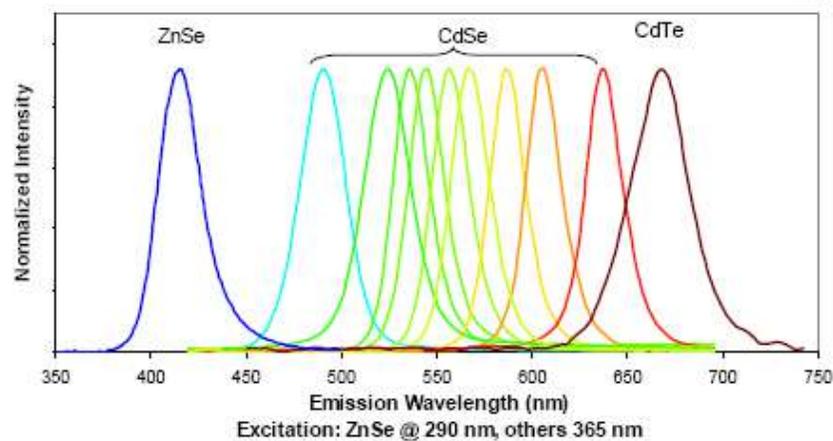


Quantum dots

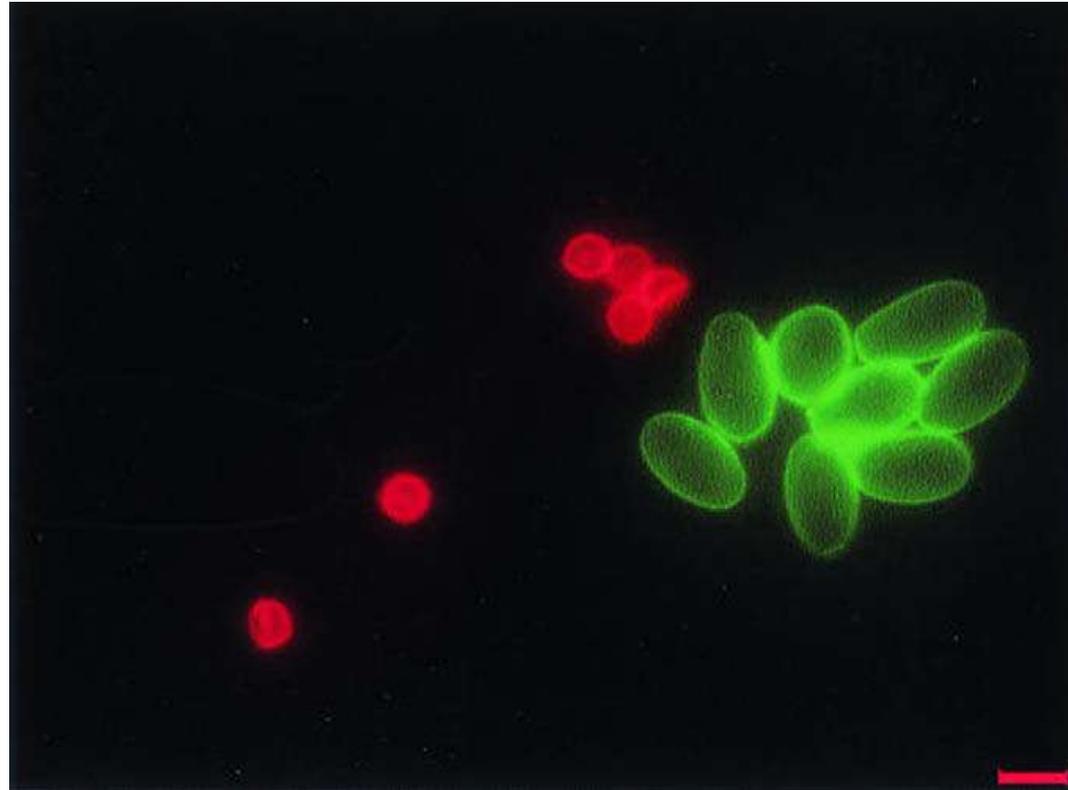
Résistance au photoblanchiment



Large gamme de spectre accessible en excitant dans le domaine UV

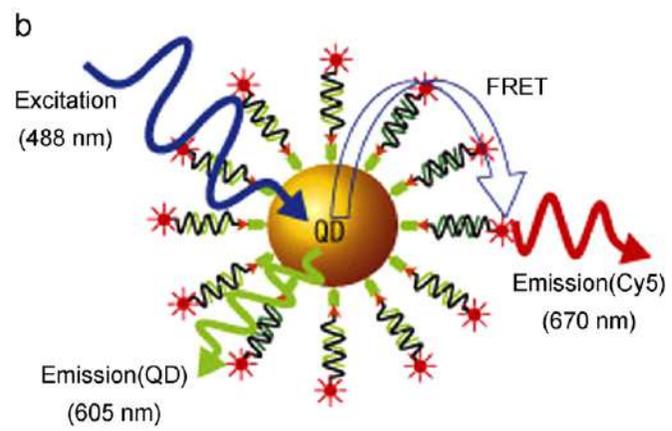
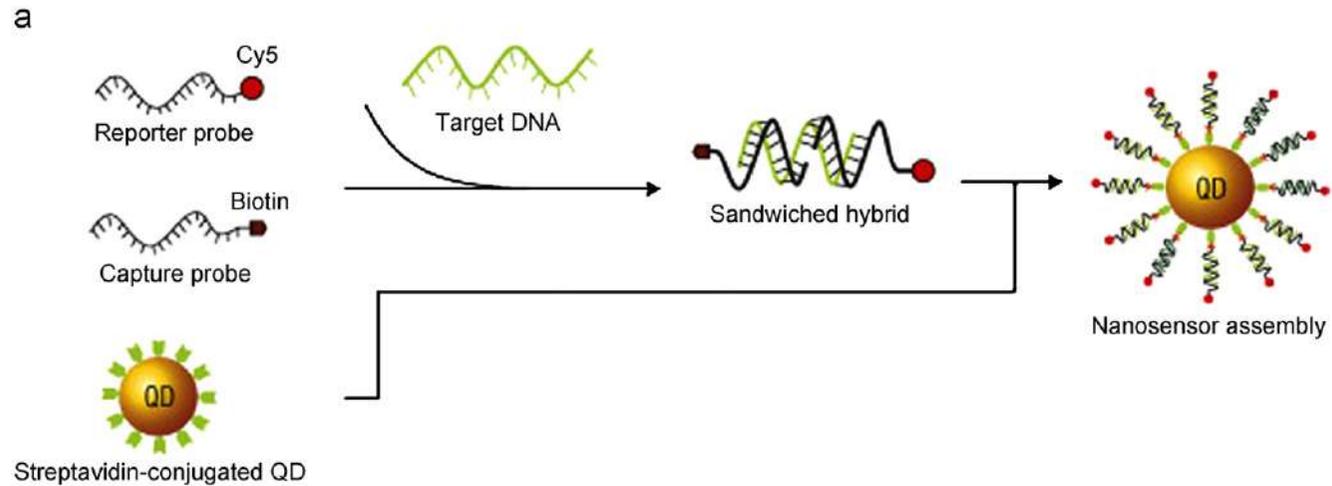


Quantum dots: détection des pathogènes



Dual-color image of QD 605-labeled *C. parvum* (red) and QD 565-labeled *G. lamblia* (green).

# Quantum dots: nanosensor



# Bon courage



## LIENS UTILES 🙌

### Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

