

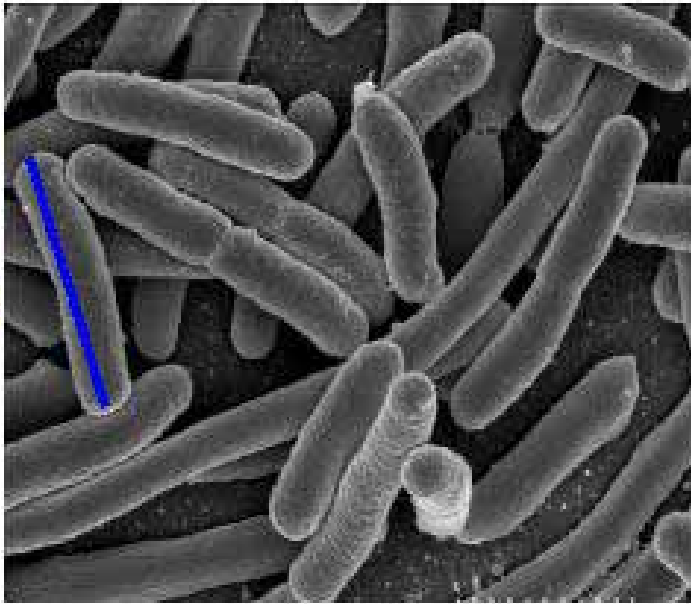
# Utilisation d'un modulateur spatial de lumière (SLM) en microscopie de fluorescence

J. Wong, D. Chatenay, J. Robert

LPS-ENS UMR 8550, 24 rue Lhomond, Paris

# Bactérie *Escherichia Coli*

4  $\mu\text{m}$



Microscopie électronique

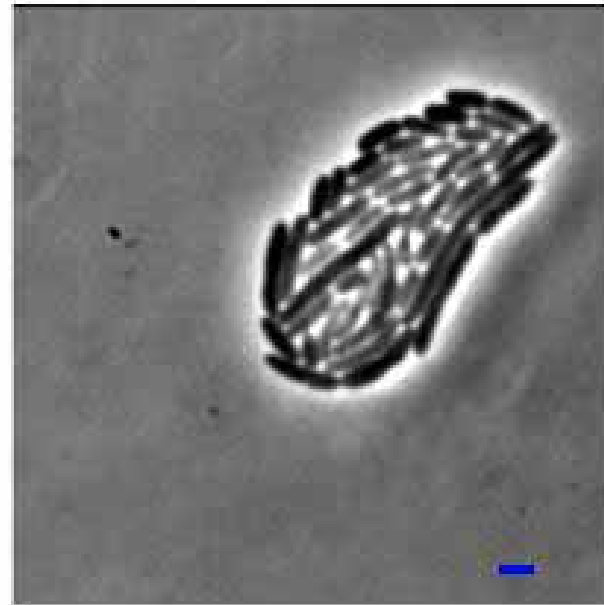
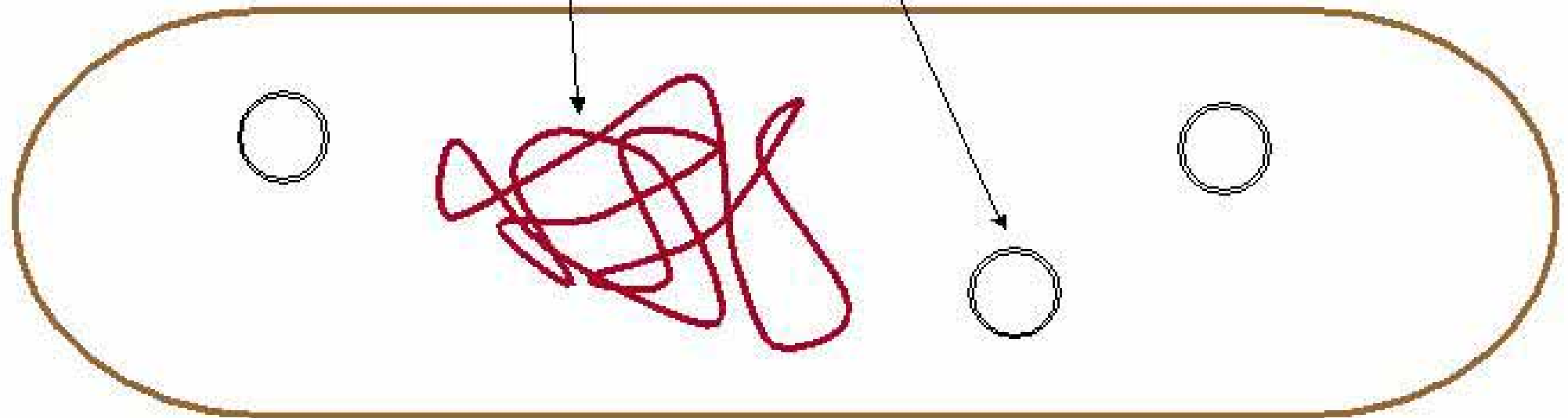


Image en contraste de phase: 1 colonie

# ADN: Chromosome et plasmide

1 chromosome (4 Mpb)

$n$  ( $1 < n < 300$ ) copies de plasmides (entre 2 kpb et 100 kpb)

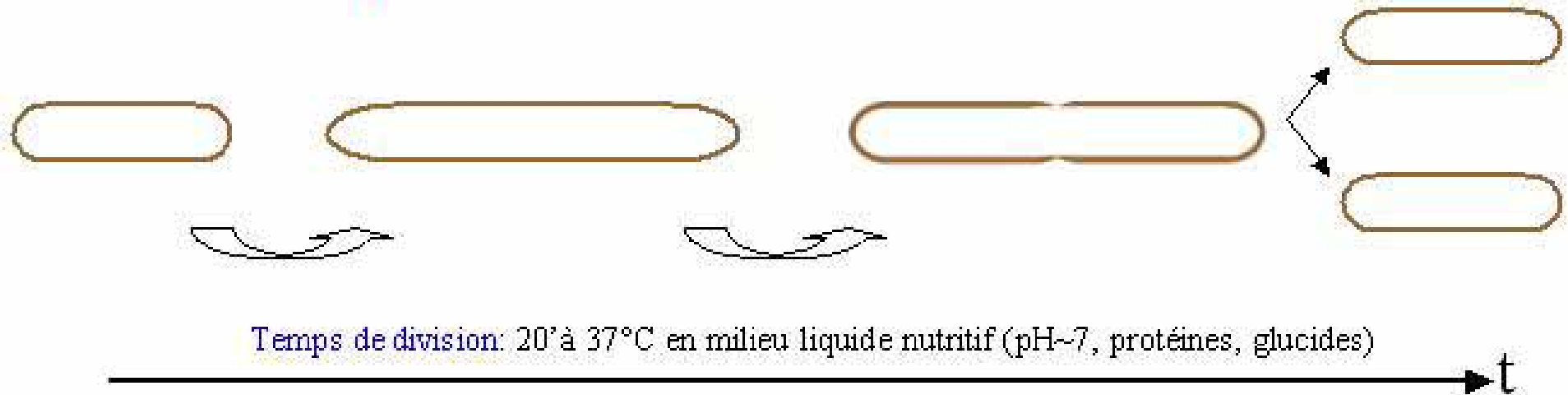


## Plasmide:

- Fragment d'ADN extra-chromosomique
- Code pour son nombre de copie  $n$
- Utilise l'hôte pour se multiplier
- Confère une résistance à la bactérie/milieu (résistance antibiotique, par ex.)
- Association symbiotique plasmide/bactérie

# Culture bactérienne

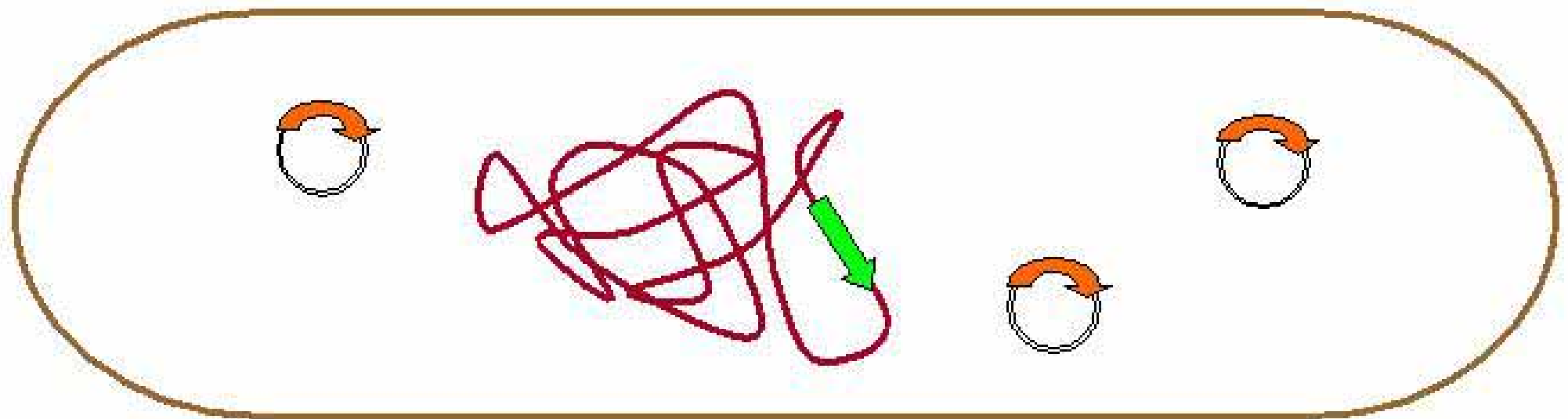
**Croissance par division:** 1 bactérie → 2 bactéries filles génétiquement identiques (clone)  
**Dédoublément, répartition** des constituants (en particulier du chromosome)



**Petits nombres de molécule, caractère stochastique des réactions chimiques**  
dans la bactérie entraînent une certaine variabilité des individus, tous identiques d'un point de vue génétique.

On veut mesurer la variabilité du nombre de copie de plasmide dans une population isogénique

# Mesure indirecte du nombre de plasmides



Gène protéine fluorescente **mOrange** (ex: 548 nm, em: 562 nm) codée par le plasmide

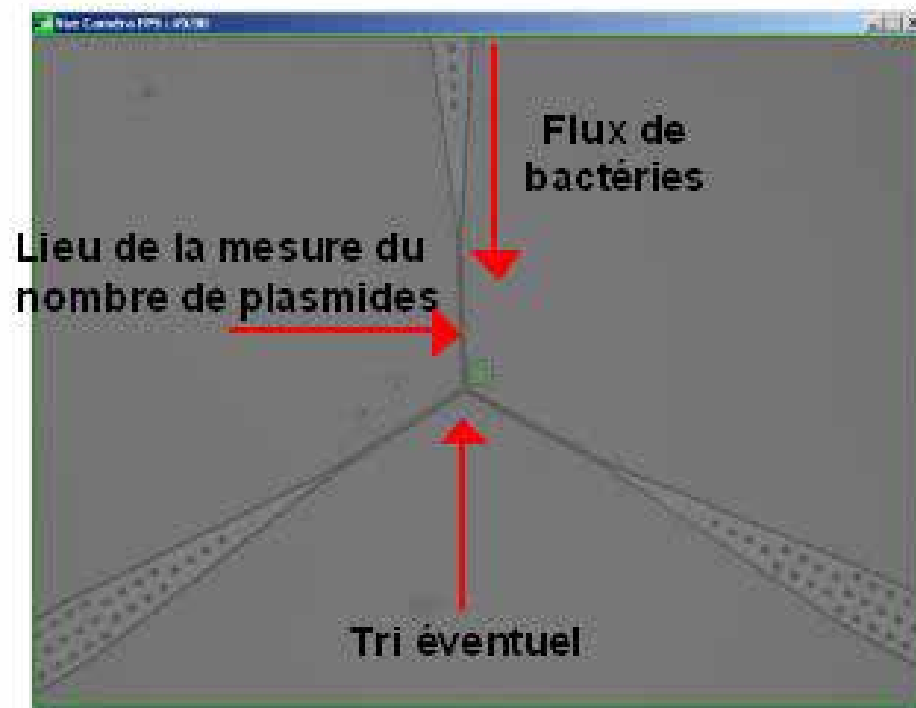
[protéine]  $\propto$  nombre copie plasmide ('ncp')

Intensité fluorescence bactérie  $\propto$  ncp

Référence copie unique sur le chromosome protéine **verte** (ex: 488 nm, em: 505 nm)

# Mesure de l'intensité de fluorescence sur une population bactérienne

Cytomètre à flux: cellule microfluidique, technique de lithographie douce

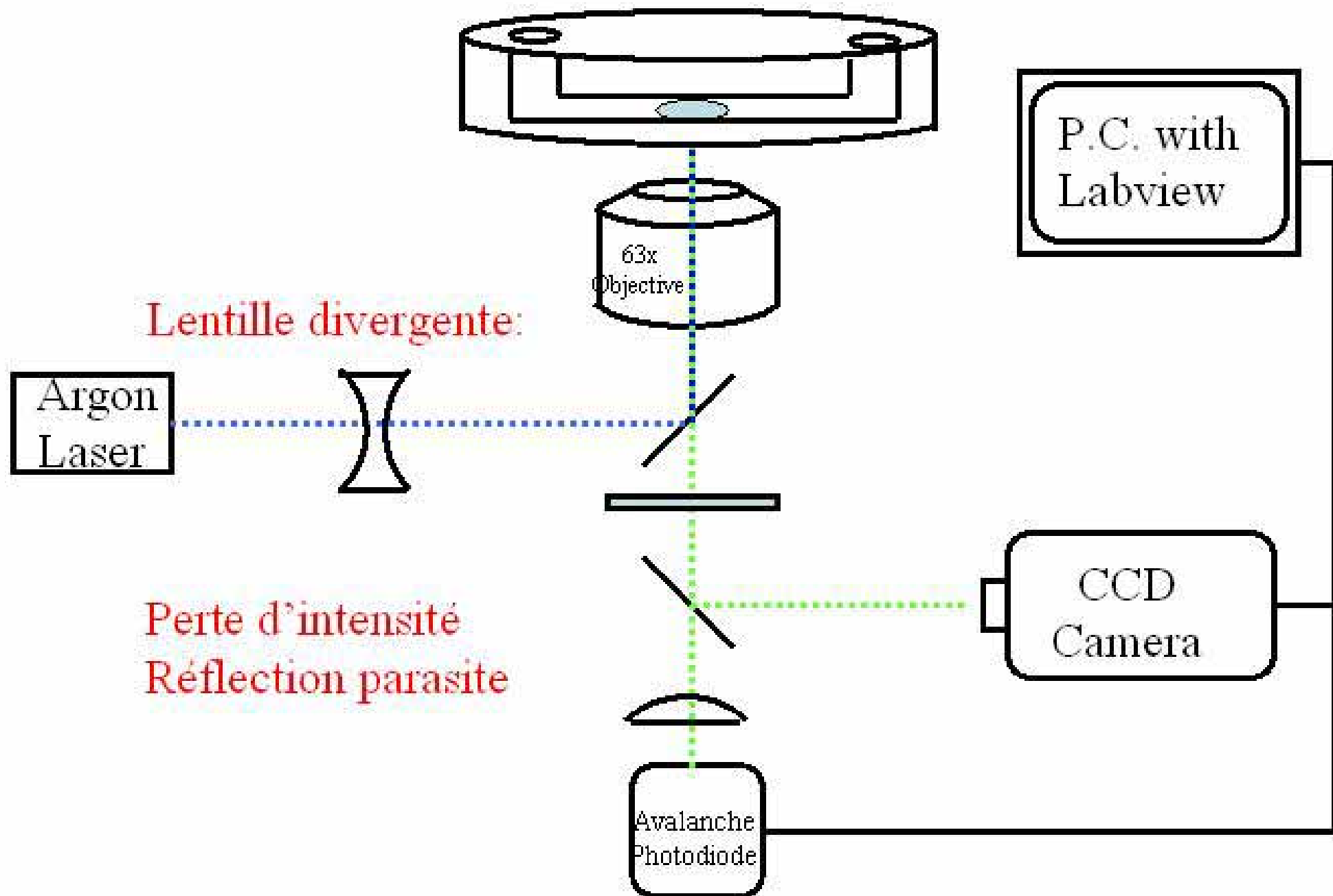


Taille du champs:  $10\mu\text{m}$   
Vitesse des bactéries:  $\sim 1\text{ mm/s}$

# Difficulté de la mesure

Réaliser un éclairage constant en intensité sur le diamètre du canal ( $5\mu\text{m}$ ) pour que la mesure soit indépendante de la position latérale de la bactérie dans le canal.

# 1<sup>er</sup> version du montage





# Montage actuel

# Détail des éléments optiques

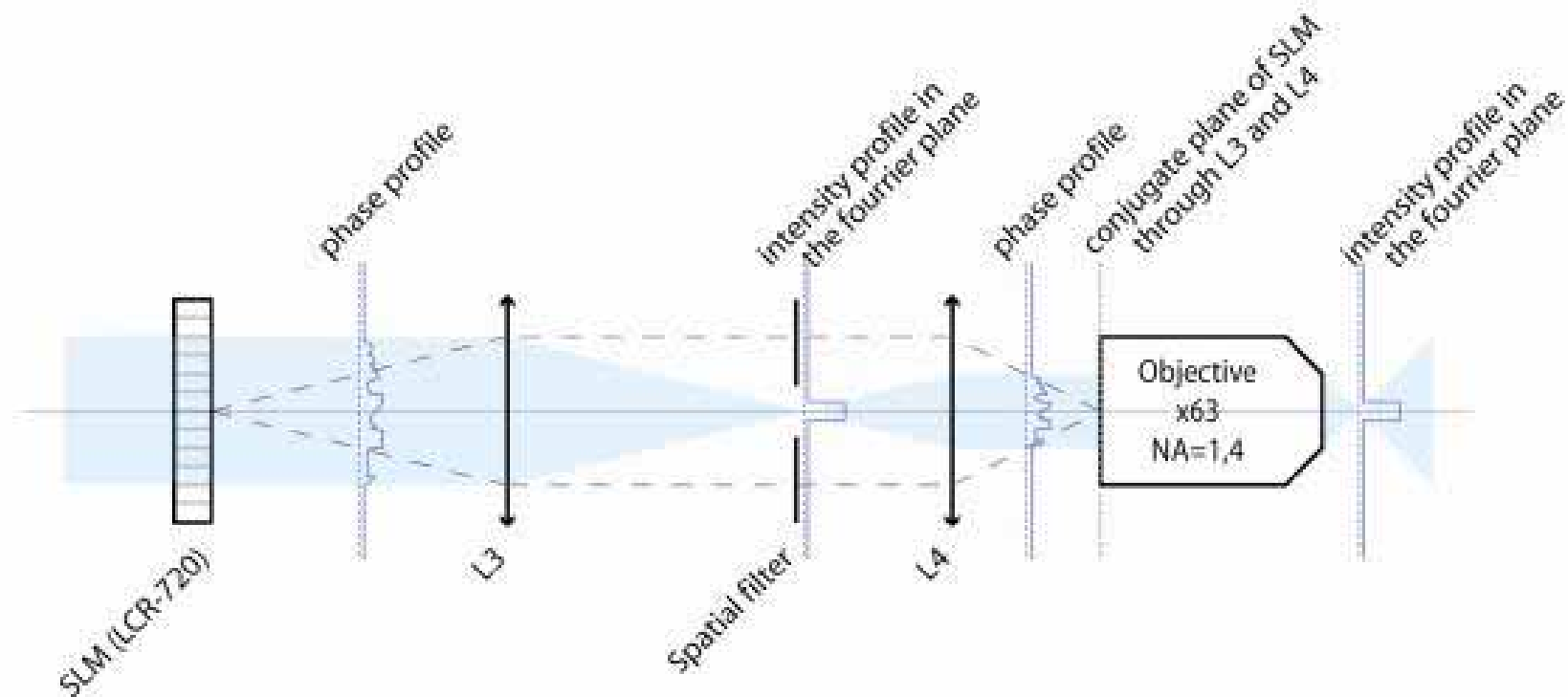
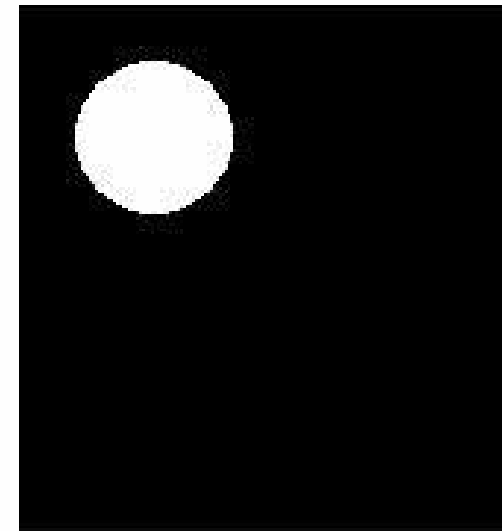
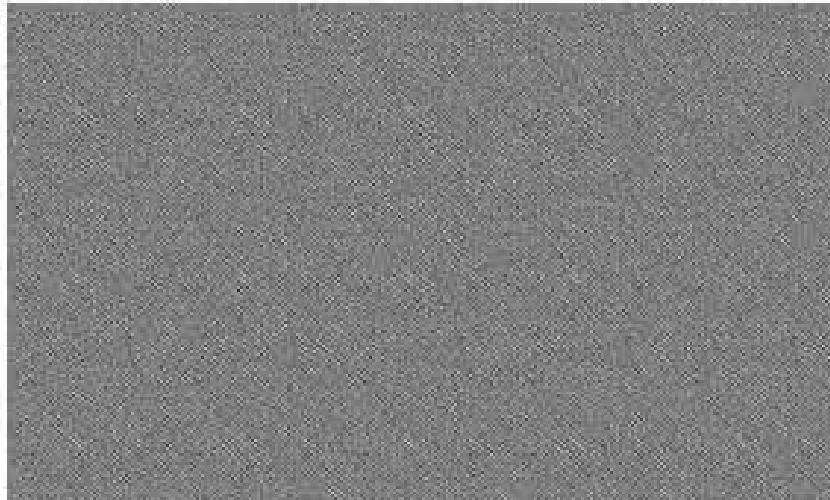
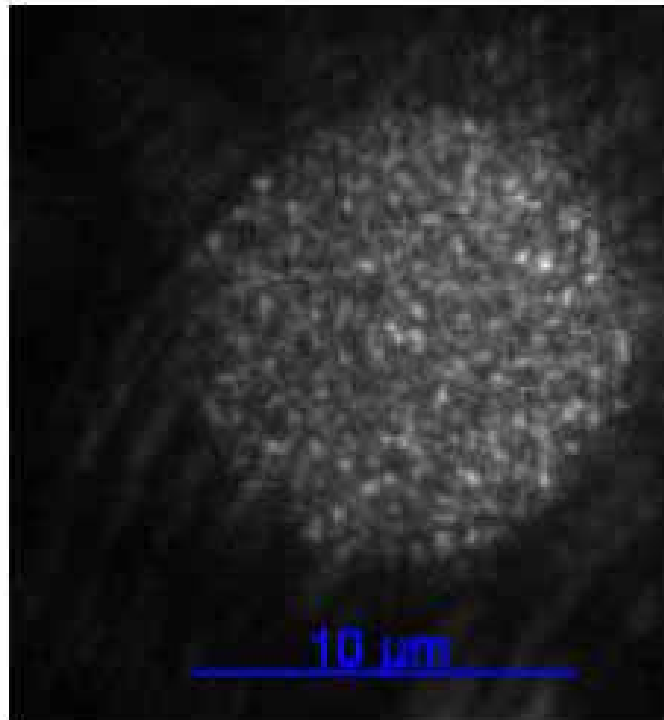


Image affichée sur le SLM (gauche)  
et sa transformée de Fourier (droite)

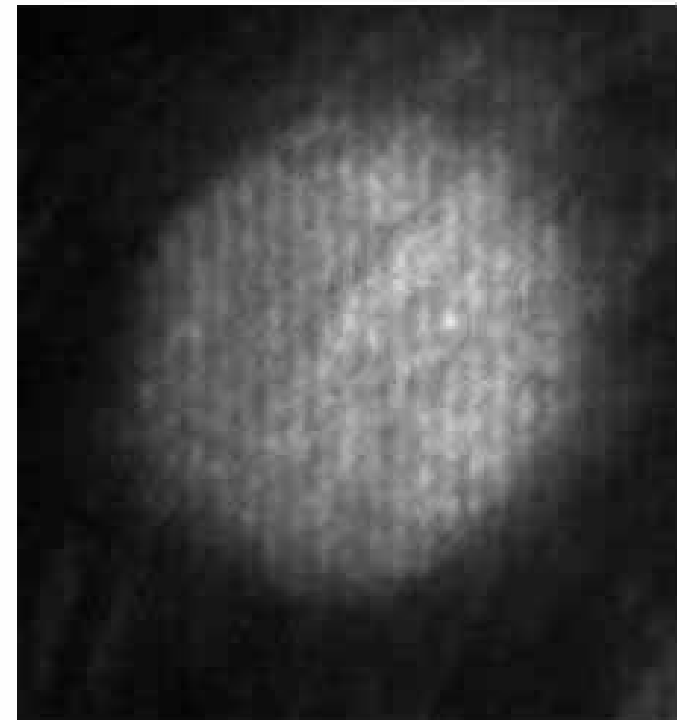


# Signal Moyenné

Image de la tache d'excitation:



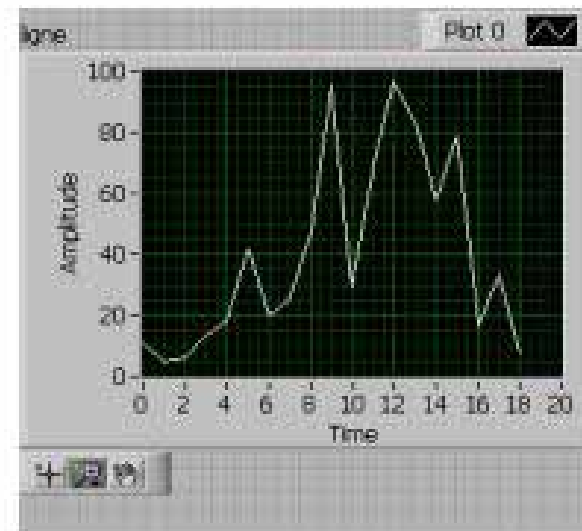
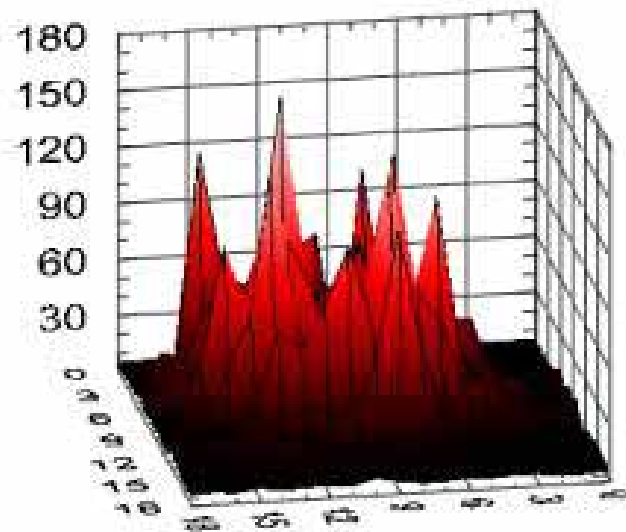
H.P. "off"



H.P. "on"

Freq.=1 kHz, amplitude~100μm

# Intensité de fluorescence d'une bille 100 nm déplacée dans le champ d'excitation H.P. "off"

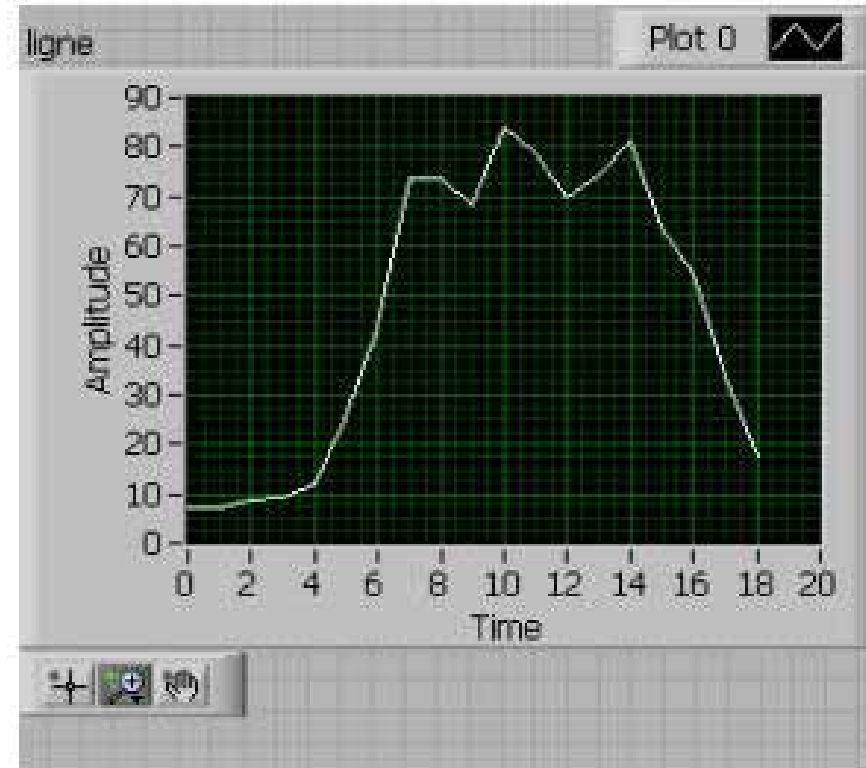
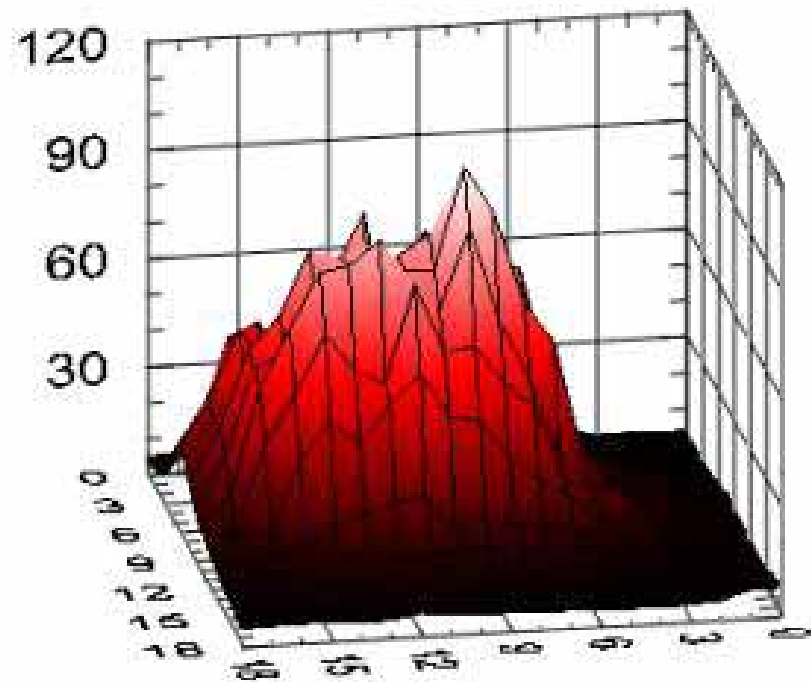


Intensité mesurée par la diode à avalanche

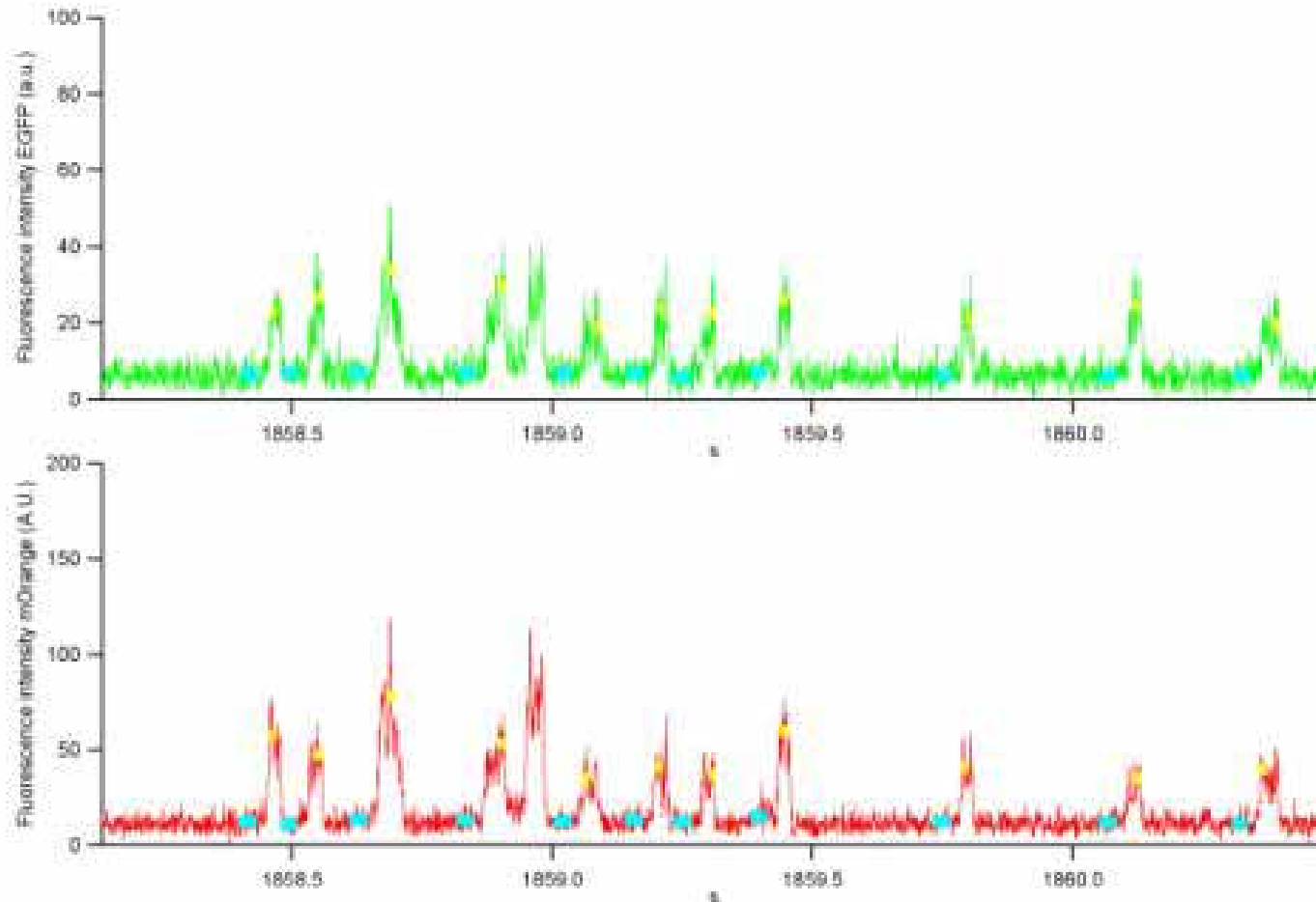
Représentation de la surface d'excitation et d'une ligne particulière

Temps d'acq.: 100 ms/point, pas de 1 $\mu$ m

# Même expérience H.P. "on"

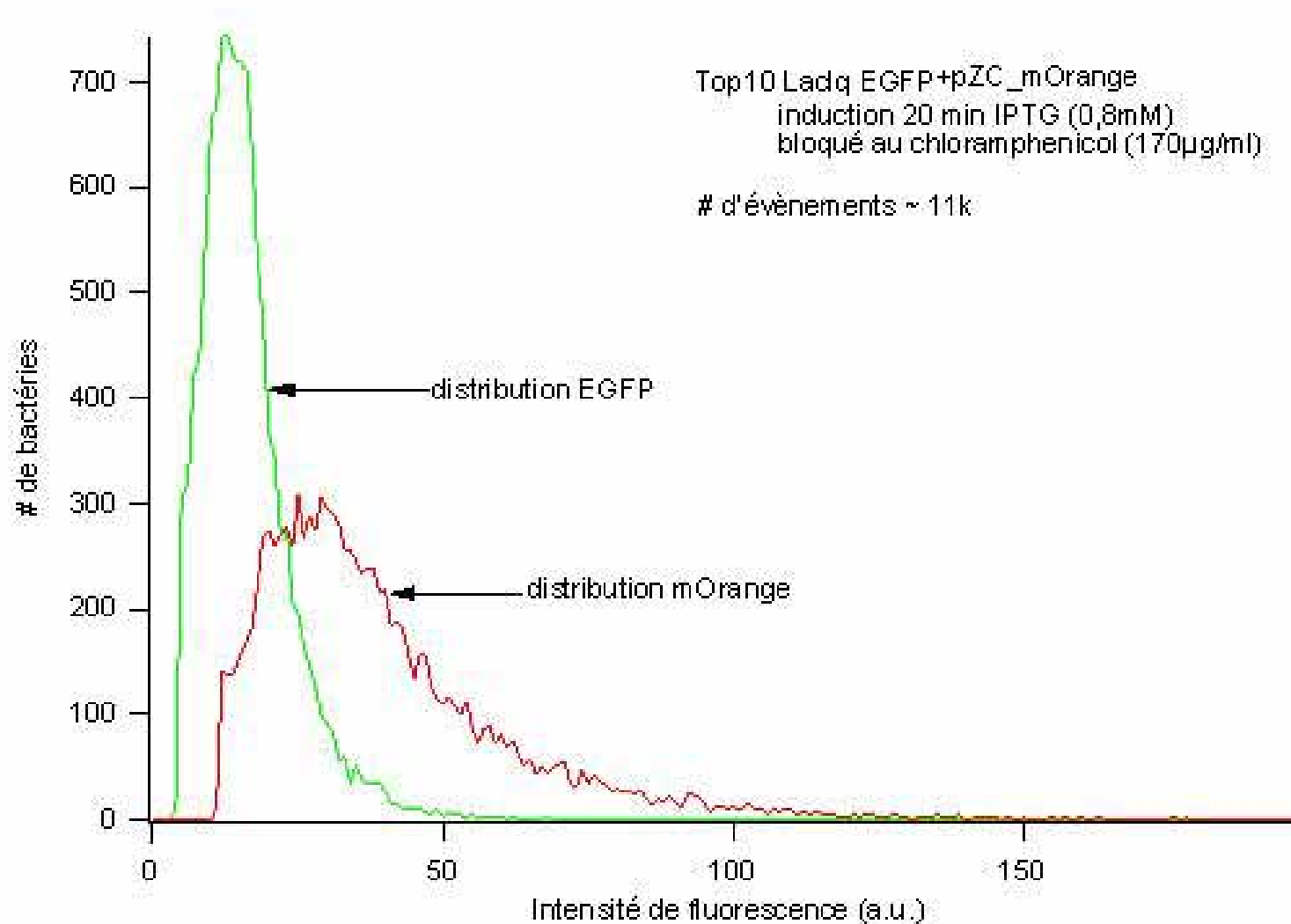


# Mesures avec des bactéries qui défilent dans le microcanal



Intensité de fluorescence en fonction  
du temps

# Résultats préliminaires





# Conclusion

- Le SLM permet de réaliser un faisceau d'excitation "à façon".
- Ce dispositif introduit des inhomogénéités d'intensité ponctuels (grains).
- Nous avons amélioré le pattern d'excitation en balayant avec le faisceau laser incident la surface du dispositif.