

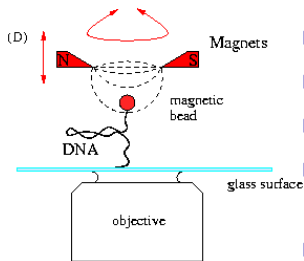
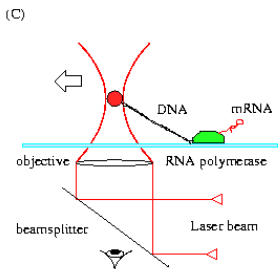
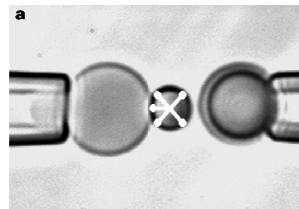
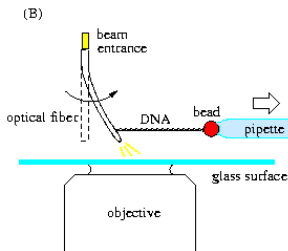
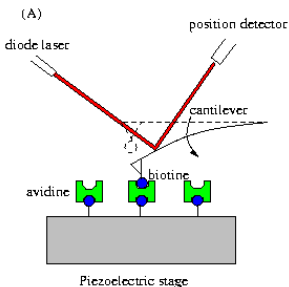
Les outils de la micromanipulation

Timothée Lionnet et Vincent Croquette
<http://pimprenelle.lps.ens.fr/biolps/>

9 avril 2010

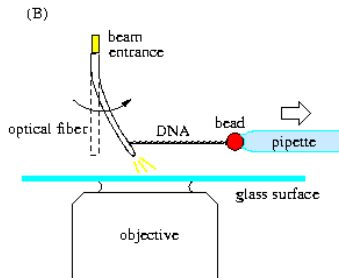
Outline

Différentes méthodes de micromanipulation



- ▶ AFM
- ▶ Fibres élastiques
- ▶ Pincés optiques
- ▶ Pincés magnétiques
- ▶ BFP

Fibres élastiques

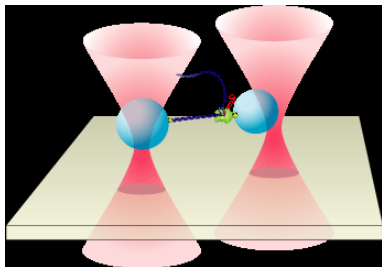


On attache la molécule à une microfibre de verre très éfilée et donc très souple. Quand on déplace cette fibre par une câle piezzoélectrique, la force appliquée à la molécule fait plier la fibre comme une canne à pêche.

La fibre fait 1 à 2 mm de long quelques microns de diamètre.

- FORCE MEASUREMENTS BY MICROMANIPULATION OF A SINGLE ACTIN FILAMENT BY GLASS NEEDLES ; A. Kishino, T. Yanagida, Nature (1988) 334-6177 p.74
- DNA : an extensible molecule. Cluzel P, Lebrun A, Heller C, Lavery R, Viovy JL, Chatenay D, Caron F. Science. (1996) ; 271(5250) :792-4.
- Mechanical separation of the complementary strands of DNA. Essevaz-Roulet B, Bockelmann U, Heslot F. Proc Natl Acad Sci U S A. (1997) ; 94 (22) :11935-40.

Pinces optiques

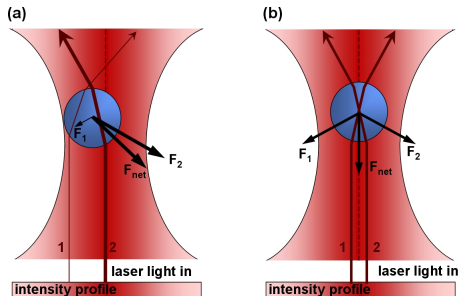


On obtient une pince optique en focalisant un faisceau laser avec un objectif de microscope de grande ouverture. La bille ($n \approx 1.5$) se déplace dans l'eau ($n \approx 1.33$) pour rejoindre le point où le champ électromagnétique est le plus intense.

La force est générée par la déviation des photons : changement de quantité de mouvement. Si on réfléchit un laser sur un miroir (la déflexion est maximale), la force que doit exercer le miroir pour ne pas reculer est de 7 pN pour un laser de 1 mW.

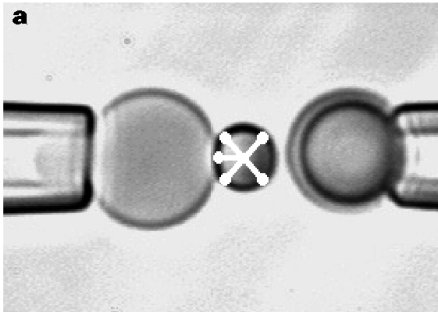
- ACCELERATION AND TRAPPING OF PARTICLES BY RADIATION PRESSURE A. Ashkin, Phys. Rev. Lett. (1970) 24-4 p.156
- APPLICATIONS OF LASER-RADIATION PRESSURE A. Ashkin, Science (1980) 210-4474 p.1081
- Optical trapping. Neuman KC, Block SM. Rev Sci Instrum. 2004 Sep ;75(9) :2787-809.

Génération de force en pinces optiques



Deux types de forces sont générés par la bille : les rayons déviés conduisent à des forces stabilisantes. La réflexion de la lumière sur la surface de la bille pousse celle-ci en dehors du piège.

Biomembrane Force Probe



Le capteur de force est une vésicules ou un globule rouge dont on peut faire varier la tension interne en aspirant par la pipette. piège.

- Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, Nature (1999) 397-6714 p.50

Pinces magnétiques

La relation d'Einstein

Nous dit que chaque degré de liberté voit son énergie moyenne égale à $\frac{1}{2}k_B \cdot T$ avec $k_B = \frac{R}{N_a} = 1.3806210^{-23} \text{ J/K}$.

Si nous mesurons la position x d'un objet, celui-ci est maintenu par une structure ayant une certaine raideur k . La position x présentera des fluctuations δx telles que :

$$\frac{1}{2}k \cdot \langle \delta x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B \cdot T$$

Si nous considérons le dipôle constitué par une résistance R en parallèle avec un condensateur C , ce circuit RC voit à ses bornes des fluctuations de tensions δV telles que :

$$\frac{1}{2}C \cdot \langle \delta V^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B \cdot T$$

- ▶ Attention la relation d'Einstein s'applique dans l'espace réel et suppose que la variable fluctuante ne présente **aucun filtrage** (c'est souvent faux dans une expérience).

Le théorème fluctuation dissipation

Il nous dit qu'on peut décrire les fluctuations d'un système par une perturbation aléatoire f_n appliquée à celui-ci. Dans l'espace de Fourier, f_n est un bruit blanc qui est filtré par la réponse spectrale du système. Ce théorème relie les fluctuations thermodynamiques du système aux éléments dissipatifs qu'il contient, c'est-à-dire que f_n ne dépend que de ses éléments dissipatifs.

Si nous considérons deux exemples : celui du circuit RC et celui d'une micro-bille plongée dans liquide visqueux (de l'eau) et attachée à un ressort. Le théorème fluctuation dissipation nous dit que l'élément responsable des fluctuations est celui qui dissipe l'énergie. En l'occurrence, R pour le circuit RC et le coefficient de friction visqueuse $6\pi\eta.r$ pour la micro-bille.

Ceci peut apparaître en contradiction avec la relation d'Einstein qui nous dit que ces fluctuations sont relié à C et k qui sont les éléments non dissipatifs.

Equation du mouvement :

$$k.x(t) + 6\pi\eta.r\dot{x}(t) = F_L(t)$$

Où la fonction d'autocorrélation de $F_L(t)$ est telle que $\langle F_L(t).F_L(0) \rangle = \delta(t)$ soit $\tilde{F}_L(\omega) = cte..$

Nous cherchons à calculer $F_L(t)$ en utilisant la relation d'Einstein :

$$\frac{1}{2}k. \langle \delta x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B.T$$

. TF de l'équation de mouvement : $k.\tilde{x} + i\omega 6\pi\eta.r\tilde{x} = \tilde{F}_L$

soit $\tilde{x} = \frac{\tilde{F}_L}{k+i\omega 6\pi\eta.r}$ ou encore $\tilde{x}^2 = \frac{\tilde{F}_L^2/k^2}{1+\omega^2/\omega_c^2}$ avec $\omega_c = \frac{k}{6\pi\eta.r}$

Fluctuations de la micro-bille attachée à un ressort...

Théorème de Parseval nous permet de calculer $x^2(t)$:

$$\int_{-\infty}^{\infty} x^2(t) dt = \int_0^{\infty} \tilde{x}^2(\omega) d\omega \quad (\omega \geq 0 \text{ car } x(t) \text{ réel})$$

$$\int_0^{\infty} \frac{F_L^2}{k^2} \frac{1}{1+(\omega/\omega_c)^2} d\omega = \frac{F_L^2}{k^2} \int_0^{\infty} \frac{1}{1+y^2} \omega_c dy. \text{ Avec } y = \frac{\omega}{\omega_c} \text{ et } dy = \frac{d\omega}{\omega_c}.$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} x^2(t) dt = \omega_c \frac{F_L^2}{k^2} [\text{artg}(y)]_0^{\infty} = \frac{\pi}{2} \frac{F_L^2}{k \cdot 6\pi\eta r} = \frac{k_B T}{k}$$

$$\tilde{F}_L^2(\omega) = \frac{2}{\pi} (6\pi\eta r) \cdot k_B T \text{ ou } \tilde{F}_L^2(f) = 4(6\pi\eta r) \cdot k_B T$$

Pour le circuit RC on obtient :

$$\tilde{E}_n^2(\omega) = \frac{2}{\pi} \cdot R \cdot k_B T \text{ ou } \tilde{E}_n^2(f) = 4 \cdot R \cdot k_B T$$

L'équation de gauche est la densité de bruit par pulsation, celle de droite la densité de bruit par Hertz.

Fluctuations de position d'une bille et bruit numérique.

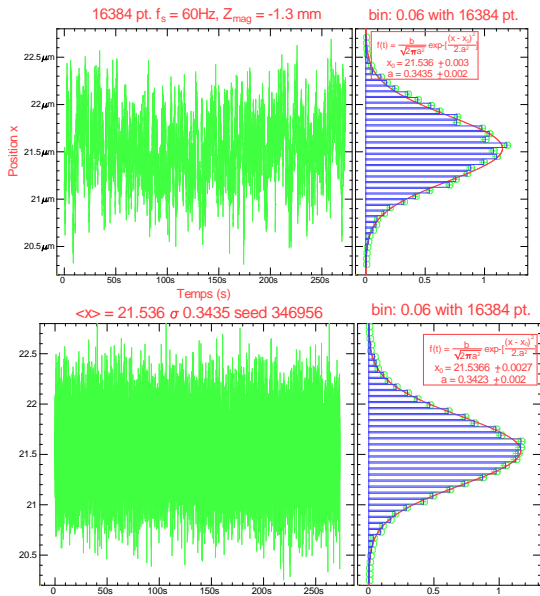


Figure: A gauche, signal expérimental : position $x(t)$ d'une bille soumise à une perturbation brownienne au cours du temps. Ce signal contient 16384 points, il est échantillonné à 60Hz. A droite, histogramme de ce signal indiquant que la distribution des positions est gaussienne. En bas à gauche, signal simulé ayant la même valeur moyenne et le même écart type que le signal expérimental. A droite, histogramme du signal de gauche indiquant que la distribution des positions est gaussienne

Le mouvement de la bille n'est pas un simple bruit.

Pour réduire le bruit d'une expérience on moyenne le signal. Suivant le théorème de la limite centrale, si $x_0(i)$ est le signal original avec $i \in [0, N]$ et $\sigma_0 = 0.34 \mu\text{m}$, notre série moyennée sur k points s'écrit : $x_k(i) = \sum_{ki}^{k(i+1)} x_0(j)/k$ avec $i \in [0, N/k]$, son écart type est noté σ_k .

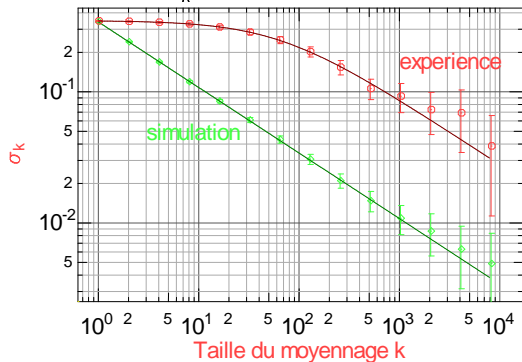


Figure: Evolution de l'écart type en fonction du nombre de points sur lequel est fait le moyennage. Les points correspondent au calcul de l'écart type pour les signaux expérimentaux et simulés. Le trait plein ajusté aux points du signal simulé correspond à $\sigma_k = \sigma_0/\sqrt{k}$.

Fluctuations de positions en fonction de la raideur.

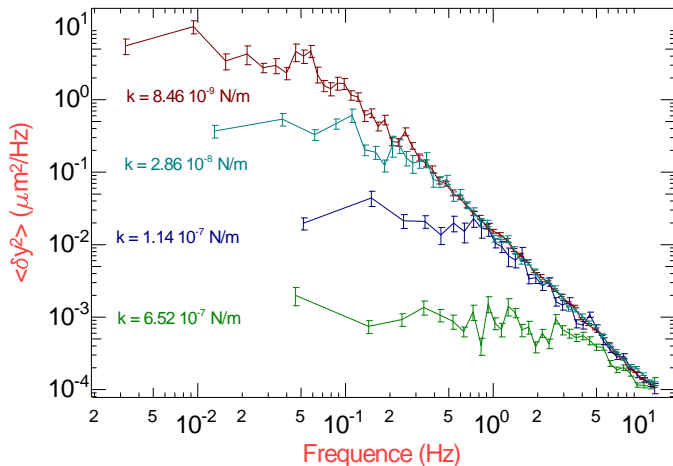


Figure: Fluctuations browniennes de la bille en fonction de la raideur k du ressort. A basses fréquences, l'amplitude des fluctuations est reliée à k . A hautes fréquences, c'est le frottement visqueux qui limitent les fluctuations.

Force de Langevin en fonction de la raideur.

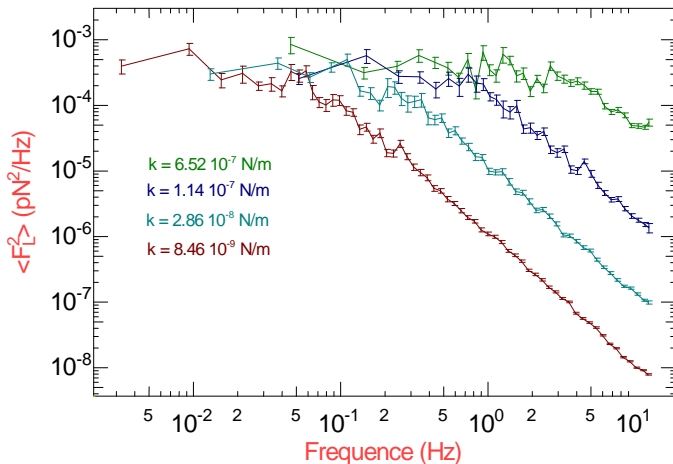


Figure: Force de Langevin déduites des fluctuations de position multipliées par la raideur du ressort k . Comme la force de Langevin ne dépend que des frottements visqueux, celle-ci est indépendante de k . Par contre la bande passante du système dépend de k .

Bruit RMS et bande passante.

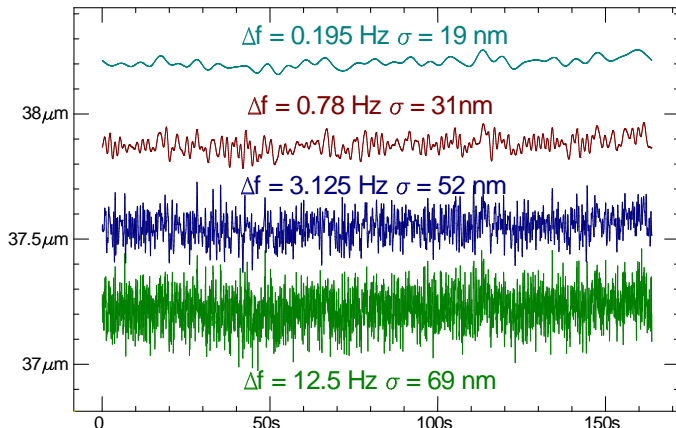


Figure: Relation entre la bande passante Δf d'un signal (ici un mouvement brownien $f_c = 4\text{Hz}$) et ses excursions RMS. On a $\sigma \propto \sqrt{\Delta f}$. Ici un même signal a été représenté avec un filtrage variable (décalé pour plus de clarté).

La force de Langevin F_L ou le bruit de tension au borne d'une résistance E_n sont en fait des densités de bruit dans l'espace de Fourier. Leurs unités sont respectivement des $\text{pN}/\sqrt{\text{Hz}}$ et $\text{nV}/\sqrt{\text{Hz}}$. Pour comparer des bruits expérimentaux il faut comparer leur densité de bruit spectrale. La valeur du bruit RMS (Root Mean Square) dans l'espace directe est souvent trompeuse, les bandes passantes sont rarement les mêmes et ceci est difficile à diagnostiquer sur le signal.

Une façon de comparer les signaux dans l'espace réel est de les filtrer pour assurer qu'ils ont la même bande passante.

Mesure de force en utilisant le mouvement Brownien

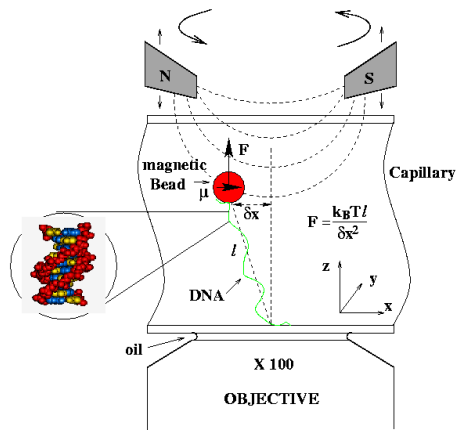


Figure: Principe de la mesure de Force. $\langle x^2 \rangle$ nous permet d'estimer la raideur k . Or $k = F/l$. On peut également mesurer le frottement visqueux en mesurant f_c ou τ_c . C'est une méthode de calibration de force basés uniquement sur des mesures de distances.

Calibration des AFM et des pinces optiques.

Mouvement brownien d'une bille attachée à un ADN

