

N° d'ordre : 2848

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGENIEUR

par Catherine TARDIN

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Laser et matière dense

**Détection de nano-objets individuels dans des cellules :
Etude de la structure dynamique de la synapse de neurones vivants et développement de
l'imagerie par contraste interférentiel photothermique.**

Soutenue le : 21 septembre 2004

Après avis de :

MM.

D. MARGUET, Directeur de Recherche au CNRS
A. TRILLER, Directeur de Recherche au CNRS

**Rapporteur
Rapporteur**

Devant la commission d'examen formée de :

MM.

D. CHOQUET, Directeur de Recherche au CNRS
B. LOUNIS, Professeur (Université Bordeaux 1)
D. MARGUET, Directeur de Recherche au CNRS
J. PROST, Directeur de Recherche au CNRS
A. TRILLER, Directeur de Recherche au CNRS
J.M. TURLET, Professeur (Université Bordeaux 1)

A mes grands-parents ...

Remerciements :

Ce travail a été réalisé tant au Centre Moléculaire Optique et Hertzienne qu'au laboratoire Physiologie Cellulaire de la Synapse, implantés à Bordeaux. Je remercie en tout premier lieu Claude Ruillère et Christophe Mulle de m'avoir chaleureusement reçue dans leurs laboratoires respectifs à mon entrée en thèse en septembre 2001.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers ceux qui m'ont apporté leur aide dans mon travail pendant ces trois années de thèse. Je remercie plus particulièrement :

Brahim Lounis et Daniel Choquet qui m'ont accueillie dans leurs équipes et ont dirigé ma thèse. Je remercie Brahim pour les connaissances qu'il m'a apportées et la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ma thèse, Daniel pour le temps consacré à me rendre accessible l'univers de la synapse, et pour son enthousiasme face à mes résultats. Je leur fais part à tous deux de ma très grande reconnaissance et les remercie également pour la correction de ce mémoire.

Laurent Cognet qui m'a accompagnée de façon quotidienne dans mon travail. Je le remercie de m'avoir fait bénéficier de ses compétences, et d'avoir relu ce manuscrit.

Françoise Rossignol pour ses cultures de neurones, mais aussi sa gentillesse, et son écoute attentive et bienveillante.

Cécile Bats avec qui j'ai partagé de nombreuses heures de manipulation, chacune à son poste. Je la remercie pour ses multiples services, la patience avec laquelle elle a répondu à mes questions, et pour ses éclats de rire.

Philippe Tamarat, pour sa disponibilité et ses conseils avisés.

Je remercie vivement Didier Marguet (Centre d'immunologie de Marseille), Antoine Triller (Ens ULM) qui ont bien voulu être les rapporteurs de ce mémoire. Je remercie également Jacques Prost (ESPCI), et Jean-Marie Turlet (Bordeaux 1) d'avoir accepté de juger cette thèse.

Je remercie enfin l'ensemble du personnel du C.P.M.O.H. et du laboratoire P.C.S. pour leur aide précieuse.

Enfin je tiens à exprimer ma reconnaissance et mon amitié aux autres étudiants de ces deux groupes, ainsi qu'à l'ensemble des membres du laboratoire P.C.S. dont j'ai apprécié l'esprit convivial.

Sommaire

Abréviations	1
Introduction	3
Chapitre 1	7
L'observation de biomolécules individuelles : du suivi de particules uniques à la détection de molécules individuelles fluorescentes	
I. Suivi de particules uniques	9
A. Principe et dispositif expérimental	9
B. Intérêt et limitations	12
II. L'imagerie de fluorophores individuels	15
A. Introduction	16
1. Contraintes de la microscopie de molécules uniques	16
2. Les sources de fond propres aux systèmes biologiques	16
B. Principaux montages	18
1. Introduction	18
2. Montage en épi-fluorescence	19
3. Montage confocal	24
III. Les marqueurs fluorescents	29
A. Les fluorophores	29
1. Introduction	29
2. Taux de fluorescence	32
3. Le photoblanchiment	35
4. Le marquage des protéines	37
B. Protéines fluorescentes	39
1. Présentation	39
2. Utilisation comme marqueur	41
3. Les mutants de la GFP	41
4. La protéine DsRed et ses mutants	44
C. Nanocristaux semi-conducteurs	45
1. Principe et caractéristiques	45
2. Fonctionnalisation	48
3. Inconvénients	49
IV. Premières applications à la biologie, de la détection de molécules fluorescentes uniques	51
A. Observation de mouvements diffusifs	51
B. Suivi de réactions enzymatiques	52
C. Variation de conformations de protéines	53
D. Premières expériences de molécules uniques <i>in vivo</i>	55
V. Notre réalisation expérimentale de détection de molécules uniques	57
A. Montage et caractéristiques	57
B. Les échantillons	59
1. Marquage des anticorps	59
2. Nettoyage des lamelles	60
3. Préparation des échantillons	61
C. Caractérisation du signal détecté	62
1. Détection du signal émis par un fluorophore individuel	62
2. Etude photophysique du Cy5	65

3.	<i>Anti oxydants</i>	68
Références du chapitre 1		70
Chapitre 2		75
Dynamique des récepteurs du glutamate		
I.	Diffusion de biomolécules dans la membrane	76
A.	Introduction	76
1.	<i>Les membranes</i>	76
2.	<i>Le modèle de mosaïque fluide</i>	77
B.	Les modèles physiques de diffusion	79
1.	<i>Diffusion en l'absence d'obstacles</i>	80
2.	<i>Diffusion en présence d'obstacles</i>	82
3.	<i>La diffusion anormale</i>	84
4.	<i>Le mouvement dirigé</i>	85
C.	Caractérisation expérimentale du mouvement diffusif	86
1.	<i>Suivi de particules ou de molécules uniques</i>	86
2.	<i>Longueur de traces et caractérisation des mouvements</i>	86
II.	Introduction aux récepteurs glutamatergiques	88
A.	Une cellule particulière, le neurone	88
1.	<i>Introduction</i>	88
2.	<i>Description simplifiée</i>	89
3.	<i>Transmission synaptique</i>	90
B.	Mémoire et synapses	93
1.	<i>Vision globale</i>	93
2.	<i>Composition moléculaire des synapses glutamatergiques d'hippocampe</i>	94
3.	<i>LTP et LTD</i>	104
4.	<i>Modèles de trafic des récepteurs AMPA</i>	107
5.	<i>Quelques questions en suspens</i>	109
III.	Mobilité de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA à l'extérieur et à l'intérieur des synapses	113
A.	Dispositif expérimental et méthode d'analyse	113
1.	<i>Montage optique</i>	113
2.	<i>Echantillon biologique</i>	114
3.	<i>Analyse des enregistrements</i>	116
B.	Résultats expérimentaux	117
1.	<i>Validité du protocole</i>	117
2.	<i>Dynamique des GluR2 dans les conditions basales</i>	120
3.	<i>Simulation de phénomènes de plasticité neuronale</i>	126
C.	Discussion	134
1.	<i>Méthode</i>	134
2.	<i>Diffusion des sous unités AMPA et des récepteurs NMDA</i>	135
3.	<i>Endocytose, exocytose et diffusion des récepteurs AMPA</i>	136
4.	<i>Mécanismes de stabilisation des récepteurs AMPA</i>	138
IV.	Stoichiométrie des protéines en molécules uniques	140
A.	Revue des méthodes de mesures, en molécules uniques, du nombre de fluorophores assemblés	140
1.	<i>Distribution des intensités émises par unité de temps</i>	140
2.	<i>Anti-bunching et stoichiométrie</i>	141
B.	Méthodes et résultats préliminaires	142
1.	<i>Introduction</i>	143
2.	<i>Méthode de comptage adoptée et résultats</i>	145
Références du chapitre 2		157

Chapitre 3	163
Imagerie photothermique	
I. Détection de nanoparticules d'or par effet photothermique	165
A. Interaction d'un champ électromagnétique avec une nanoparticule métallique	165
B. Détection de l'effet photothermique	168
1. Principe	168
2. Dispositifs expérimentaux et caractérisation	168
C. Signal détecté dans le montage en transmission	173
1. Température et indice du milieu	173
2. Modélisation du signal détecté	175
D. Comparaison du modèle avec les résultats expérimentaux	177
1. Mesure du déphasage	178
2. Résolution	178
3. Précision de pointé	182
II. Imagerie de systèmes biologiques	183
III. Perspectives et limitations de l'imagerie photothermique en biologie	189
A. Température à la surface de la nanoparticule	189
B. Détection ultra sensible et application	190
C. Suivi de particules uniques en imagerie photothermique	191
<u>Références du chapitre 3</u>	193
Conclusion et perspectives	195
Publications	198

Abréviations

ABP : *AMPA receptor binding protein*

AMPA : *amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate*

CaMKII : protéine kinase II calmoduline-dépendante

CCD : *charge coupled device*

DIC : *differential interference contrast*

FAD : *flavine adenine dinucleotide*

FMN : *flavin mononucleotide*

FRAP : fluorescence récupérée après photo-blanchiment

FRET : *fluorescence resonant energy transfer*

GABA : acide γ amino-butyrrique

GFP : *green fluorescent protein*

GKAP : *guanylyl-kinase-associated-protein*

GPI : *glycosyl-phosphatidyl-inositol*

GRIP : *glutamate receptor interacting protein*

HPLC : *high pressure liquid chromatography*

LTD : *long term depression*

LTP : *long term potentiation*

MAGUK : *membrane-associated guanylate kinase*

mGluR : récepteur métabotrope du glutamate

NAD(P)H : *nicotinamide adenine dinucléotide (phosphate)*

NMDA : *N-méthyl-D-aspartate*

NSF : *N-ethylmaleimide sensitive factor*

PDZ : PSD-95, Dlg, ZO-1

PIC : *photothermal interference contrast*

Abréviations

PICK1 : *protein interacting with C kinase*

PKC : protein kinase C

PPSE : potentiel post-synaptique excitateur

PPSI : potentiel post-synaptique inhibiteur

PSD : *post-synaptic density*

PSD-95 : *post-synaptic density-95*

PVOH : *polyvinyl alcohol*

SNAP : *soluble NSF attachment protein*

SNAP-25 : *synaptosomal novel associated protein* de 25 kDa

SNARE : *SNARE-REceptor*

SPT : *single particle tracking*

TIR : *Total Internal Reflection*

TTX : tétrodotoxine

TMR : tétraméthyl rhodamine

VAMP : *vesicle associated membrane protein*

Introduction

Les êtres vivants sont le centre de phénomènes complexes et interdépendants qui se produisent au niveau moléculaire et se traduisent de façon globale. Afin d'appréhender cette complexité, l'étude des phénomènes biologiques est réalisée tant au niveau de l'individu lors de l'observation des comportements ou des effets cliniques de protocoles expérimentaux, qu'à l'échelle des molécules. Cette dernière approche s'est fortement développée au cours du vingtième siècle avec la mise au point de techniques performantes d'analyses biochimiques et de séquençage de l'ADN, la détermination de la structure des tissus à l'échelle du nanomètre grâce à la microscopie électronique, ou des biomolécules elles-mêmes par des expériences de diffraction aux rayons X. Ces outils expérimentaux donnent accès à des informations majeures, elles n'offrent cependant qu'une vision statique du système biologique. Au cours de ces dernières années une démarche novatrice visant à connaître l'évolution temporelle d'un système biologique à l'échelle de la biomolécule a vu le jour. Ainsi est il devenu possible d'accéder avec plus de précision aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans certains processus biologiques [Weiss 1999] voire de permettre une description mécanique de ces phénomènes [Mehta 1999]. En fait, ce regard nouveau jeté sur les systèmes biologiques a été rendu possible par la mise au point de techniques expérimentales performantes telles que la microscopie de fluorescence de molécule unique réalisée à température ambiante.

La matière est, depuis longtemps, l'objet de recherches visant à accéder à ses caractéristiques au niveau moléculaire. Cependant il a fallu attendre le début des années 80 pour que se développent différentes techniques permettant de visualiser, ou de manipuler, des molécules uniques. Les microscopies à sondes locales, comme la microscopie à effet tunnel [Binnig 1982], ou la microscopie à force atomique [Meyer 1991], ont ainsi émergé et permis l'étude de composés moléculaires présents à la surface de matériaux solides. Cependant, ces méthodes expérimentales, qui tirent profit de l'interaction nanométrique entre une pointe sonde et les molécules de l'échantillon, peuvent perturber le système observé. Au début des années 90 est apparue, avec l'excitation de la fluorescence de molécules uniques réalisée aux températures cryogéniques [Moerner 1989, Orrit 1990], une méthode non intrusive. Cette technique expérimentale a ouvert la voie de la spectroscopie optique de molécules individuelles et, avec elle, des perspectives prometteuses. Non seulement elle donne accès à des phénomènes quantiques [Tamarat 2000], comme par exemple le dégroupement de

photons, mais elle peut aussi être à l'origine des innovations technologiques. Ainsi, les sources déclenchées de photons uniques [Brunel 1999, Kim 1999, Lounis 2000] ont pu être appliquées à la mise en œuvre de procédures de cryptographie quantique [Bennet 1992].

Dès 1994, la microscopie de fluorescence de molécules uniques a pu être réalisée à température ambiante [Nie 1994]. Son caractère peu perturbateur a fait d'elle un outil attrayant pour l'observation, *in vitro* et *in vivo*, de phénomènes biologiques à l'échelle des biomolécules individuelles.

Dans une première partie, nous présenterons les principes, les expériences fondatrices ainsi que notre réalisation expérimentale de la microscopie de fluorescence de molécules uniques, utilisée à température ambiante, pour observer des biomolécules.

Nous avons ainsi pu suivre des récepteurs du glutamate sur toute la surface de neurones vivants d'hippocampe de rats. La circulation des récepteurs du glutamate entre les trois compartiments cellulaires des neurites, que sont les membranes synaptiques, extra-synaptiques, et le cytoplasme, joue un rôle crucial dans l'activité synaptique. Les modèles actuels de mécanismes moléculaires, mis en jeu lors des phénomènes de plasticité synaptique, reposent essentiellement sur des processus d'endo et d'exocytose. Nos résultats, résultant du suivi de l'une des sous-unités des récepteurs du glutamate de type AMPA, appelée GluR2, à la surface de neurones vivants, confirment l'importance des étapes de diffusion latérale de ces récepteurs au cours des processus de plasticité synaptique. Afin de comprendre le mode de régulation des flux de récepteurs entrant ou sortant de la synapse, il serait important de connaître la composition en récepteurs des vésicules d'endo ou d'exocytose voire de la synapse. C'est pourquoi nous avons cherché une méthode permettant de quantifier le nombre de biomolécules fluorescentes assemblées. Nous en détaillerons le principe ainsi que les premiers résultats.

Nous souhaiterions pouvoir étudier les interactions de ces récepteurs avec les protéines d'échafaudage, essentielles à leur stabilisation synaptique, afin d'élucider les mécanismes mis en jeu lors des processus de plasticité synaptique. Or, la durée de suivi des biomolécules en microscopie de molécules uniques est limitée par le photoblanchiment rapide des fluorophores. Pour y remédier, a été développée une nouvelle technique de visualisation, basée sur l'effet photothermique, que nous avons appliquée à l'imagerie de systèmes biologiques. Nous détaillerons les caractéristiques de cette technique qui font d'elle un outil prometteur pour observer des systèmes biologiques *in vivo*.

Références de l'introduction :

- Bennet C.H. ; Quantum cryptography. *Sci. Am.* **267**, 50-57 (1992)
- Binnig G., Rohrer H., Gerber Ch., Weibel E.; *Phys. Rev. Lett.* **49**, 57 (1982)
- Brunel Ch., Lounis B., Tamarat Ph., Orrit M. ; *Phys. Rev. Lett.* **83**, 2722 (1999)
- Kim J., Benson O., Kahn H., Yamamoto Y.; *Nature* **397**, 500 (1999)
- Lounis B., Moerner W.E.; *Nature* **407**, 491 (2000)
- Meyer E., Howald L., Overney R.M., Heinzelmann H., Frommer J., Güntherodt H.-J., Wagner T., Schier H., Roth S.; *Nature* **349**, 398 (1991).
- Moerner W.E., Kador L.; *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535 (1989).
- Nie S., Chiu D.T., Zare R.N.; *Science* **266**, 1018 (1994).
- Orrit M., Bernard J. ; *Phys. Rev. Lett.* **65**, 2716 (1990).
- Tamarat Ph., Maali A., Lounis B., Orrit M. ; *J. Phys. Chem.* **104** (1), 1-16 (2000)

Chapitre 1

L'observation de biomolécules individuelles : du suivi de particules uniques à la détection de molécules individuelles fluorescentes

Les mesures réalisées sur une assemblée de molécules donne comme résultat la valeur moyenne du paramètre considéré. La microscopie de fluorescence de molécules individuelles permet désormais d'accéder non seulement à la valeur moyenne mais aussi à la distribution de cette grandeur. Il est alors possible de distinguer les différentes sous-populations de molécules qui composent le système et d'établir des corrélations statistiques entre les distributions des différentes grandeurs mesurées.

La connaissance de la distribution d'un paramètre traduit l'hétérogénéité du système observé, qui peut venir des molécules elles-mêmes ou de leur interaction avec l'environnement. Les fluorophores jouent, dans ce cas, le rôle de sonde de leur environnement, à l'échelle du nanomètre.

Lorsque l'on souhaite réaliser une mesure d'ensemble sur des molécules subissant des phénomènes dépendant du temps, il est nécessaire de synchroniser les molécules avant de pouvoir effectuer cette mesure. Quand les mesures sont réalisées sur des molécules individuelles, cette obligation disparaît. On peut alors suivre une molécule unique au cours du temps et accéder directement aux fluctuations dynamiques de la grandeur observée.

Dans le domaine de la biologie, l'observation en molécule unique peut apporter des informations inaccessibles par des mesures d'ensemble classiques. Par exemple, nous verrons dans le chapitre 2 que lipides et protéines diffusent dans les membranes cellulaires. Or celles-ci constituent un milieu souvent hétérogène, caractérisé par l'existence de domaines spécifiques. La distribution des coefficients de diffusion des biomolécules donne alors accès à différentes sous-populations, dont les caractéristiques apportent des informations sur le milieu traversé [Schmidt 1995]. Les protéines peuvent interagir avec d'autres protéines, et leurs conformations peuvent évoluer. Ces deux phénomènes se traduisent par des variations de distances inter ou intra-moléculaires, que la microscopie de molécules individuelles a permis de mesurer [Ha 1998]. Les mécanismes moléculaires mettent souvent en jeu des réactions qui dépendent du temps. C'est notamment le cas des réactions enzymatiques dont la cinétique

ainsi que les fluctuations dynamiques ont pu être suivies grâce à la détection de molécules uniques [Funatsu 1995, Lu 1998].

Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord la technique de suivi de particules uniques. En effet, elle constitue une première étape dans l'observation d'un faible nombre de biomolécules dans les systèmes vivants. Nous détaillerons ensuite les différents dispositifs d'imagerie employés pour la détection de molécules uniques, puis nous passerons en revue les fluorophores et les nano-particules utilisés pour marquer les biomolécules, et comparerons leurs caractéristiques photophysiques. Nous exposerons enfin quelques unes des expériences déjà réalisées sur des systèmes biologiques et nous présenterons le dispositif employé dans nos expériences.

I. Suivi de particules uniques

La technique de suivi de particules uniques utilise des biomolécules marquées à l'aide d'une particule, en général une bille de latex de plusieurs centaines de nanomètres ou d'une bille d'or d'une quarantaine de nanomètres, que l'on détecte dans un montage de contraste interférentiel différentiel (DIC) [Françon 1966]. Cette technique de visualisation de particules peut être couplée à la mesure des forces exercées par des biomolécules. Pour cela, la bille de latex liée aux biomolécules est placée dans un piège optique. L'usage de la technique du suivi de particule unique s'est ainsi tout particulièrement développé pour étudier les systèmes biologiques tels que les moteurs moléculaires ou les protéines membranaires liées au cytosquelette [Block 1989, Gelles 1988, Kusumi 1993].

Nous nous intéresserons, par la suite, à la diffusion de protéines membranaires à la surface de neurones (Chapitre 2), pour laquelle cette méthode de suivi de particules uniques a été employée [Meier 2001, Sergé 2002, Borgdorff 2002]. Nous allons décrire le principe du DIC qui sera réemployé dans le troisième chapitre, et les avancées importantes obtenues grâce cette technique. Puis, nous exposerons les raisons qui ont motivé l'utilisation de fluorophores individuels pour enregistrer les déplacements de protéines membranaires à la surface de neurones.

A. Principe et dispositif expérimental

Les particules de latex sont généralement détectées par un dispositif de contraste interférentiel différentiel dont le principe est donné en Figure 1.

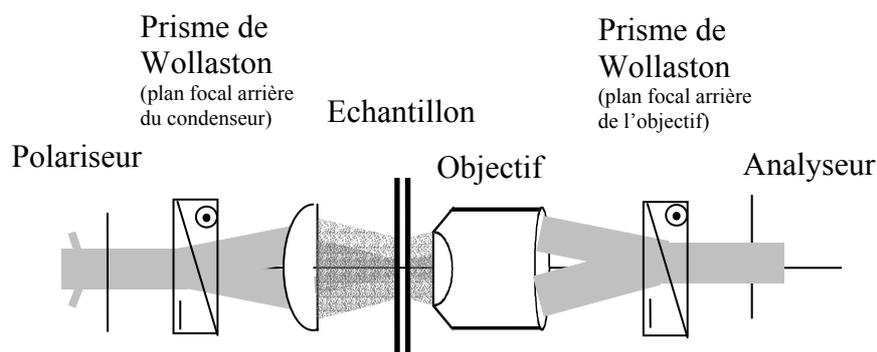


Figure 1: Dispositif de contraste interférentiel (DIC)

Le faisceau incident collimaté est polarisé par passage à travers le polariseur, puis est divisé, par passage à travers un prisme de Wollaston, en deux faisceaux de polarisation perpendiculaires. Les axes du prisme de Wollaston sont à $\pm 45^\circ$ de l'orientation du polariseur.

Les deux faisceaux sont focalisés sur l'échantillon par le condenseur. Les deux faisceaux sont ensuite recombinaison dans un second prisme de Wollaston, placé dans le plan focal arrière de l'objectif, et passent à travers l'analyseur orienté à 90° du polariseur. L'intensité résultante est enregistrée par une caméra vidéo.

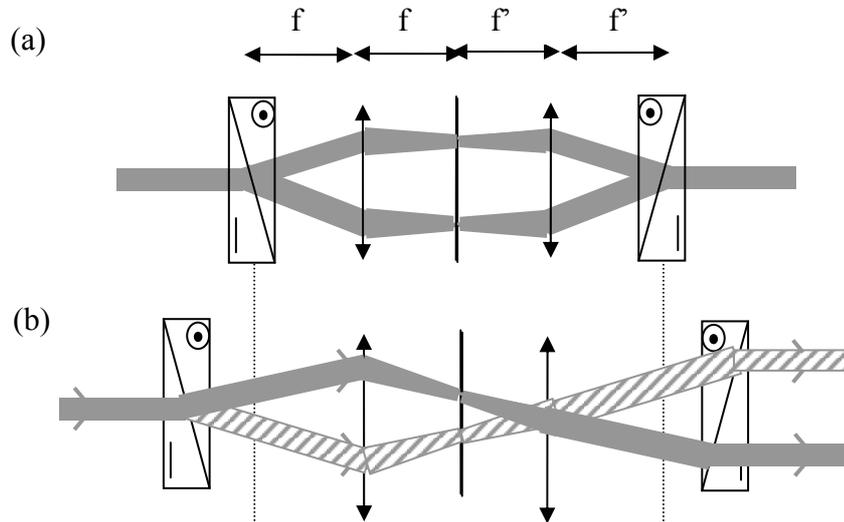


Figure 2: Trajet des faisceaux en fonction de la position relative du prisme de Wollaston par rapport à la lentille de focalisation (la distance de séparation des faisceaux est exagérée pour la compréhension du schéma).

(a) position correcte, (b) mauvaise position

La recombinaison correcte des faisceaux est assurée par le placement des prismes de Wollaston de telle sorte que le lieu de dédoublement ou de recombinaison des faisceaux se trouve dans le plan focal arrière du condenseur et de l'objectif (Figure 2). Lorsque des objectifs de fort grossissement sont employés, leur plan focal arrière étant inaccessible, le prisme de Wollaston est alors remplacé par un prisme de Nomarski (Figure 3). Cela permet la recombinaison des faisceaux en se positionnant à l'arrière du plan focal objet de l'objectif.

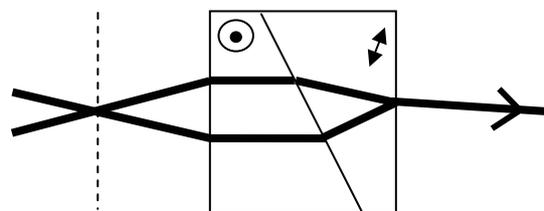


Figure 3: recombinaison des faisceaux à travers un prisme de Nomarski (les flèches désignent les axes optiques ordinaires des milieux biréfringents uniaxes formant le prisme)

Le second Wollaston est réglé de telle façon qu'un déphasage de $\lambda/4$ soit introduit entre les deux faisceaux. Ainsi, le dispositif offre le maximum de sensibilité. L'interférence

de deux faisceaux ayant parcouru le même chemin optique conduit à une intensité finale égale à la moitié de l'intensité initiale du faisceau. En revanche, si une différence de marche apparaît entre les deux fronts d'onde due à des épaisseurs traversées ou des indices du milieu différents, l'intensité du signal interférentiel est soit fortement affaiblie, soit maximale, i.e. proche de l'intensité initiale (Figure 4). L'image obtenue fait ainsi apparaître de forts contrastes correspondants aux contours de l'objet observé.

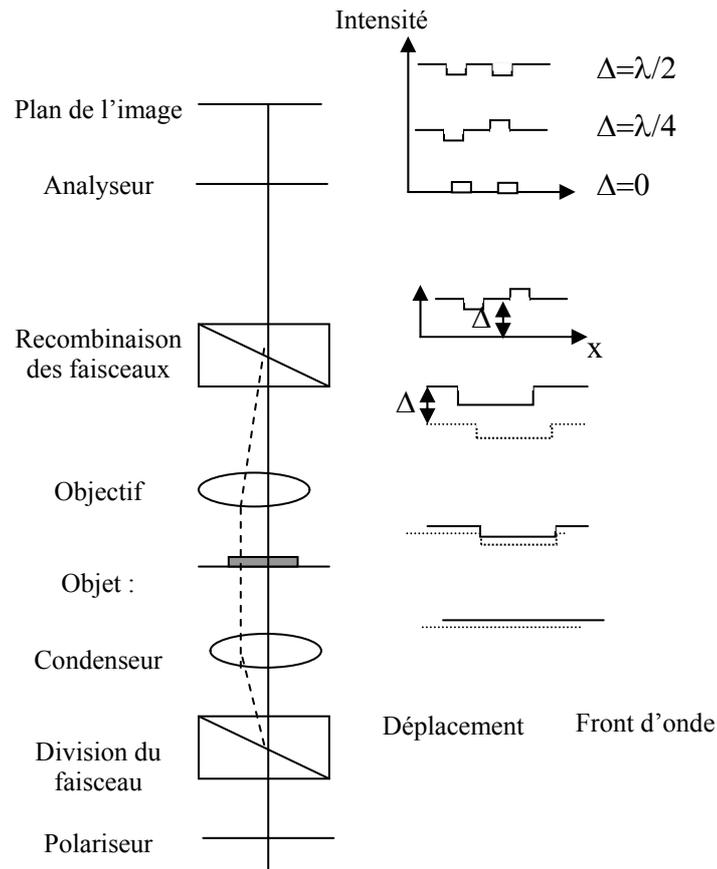


Figure 4: Principe de la détection par contraste interférentiel

Ce même dispositif a permis de visualiser non seulement des billes de latex de 200 nm à 1 μm (Figure 5), mais aussi des particules d'or, dont on détecte le champ qu'elles diffusent, et de diamètre pouvant descendre jusqu'à 40 nm [Sheetz 1989]. Cependant, la section efficace de diffusion des particules d'or diminue fortement avec leur diamètre, comme nous le verrons dans le chapitre 3, aussi n'est-il pas possible de descendre en deçà de 40 nm.

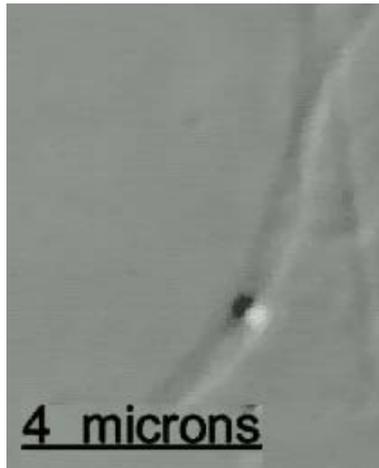


Figure 5: Image DIC de neurones, avec marquage des récepteurs GluR2 par des billes de latex (200 nm)

L'utilisation des particules comme marqueurs biologiques nécessite leur couplage aux biomolécules. Les sphères de latex possèdent à leur surface des groupements sulfates grâce auxquels elles sont couplées aux anticorps anti IgG de souris adéquats, par l'intermédiaire d'une interaction avec des protéines G monomériques (Figure 6). Les colloïdes d'or sont couplés directement par adsorption avec la protéine ou l'anticorps choisi

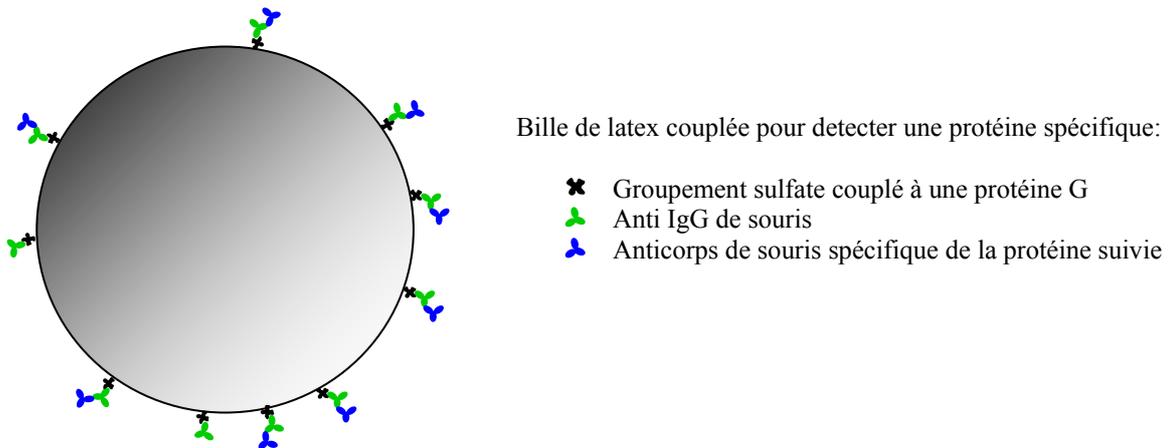


Figure 6: Exemple de couplage d'une bille de latex [Sergé 2002]

B. Intérêt et limitations

La technique de suivi de particules uniques offre la possibilité d'observer le mouvement de biomolécules pendant plusieurs minutes. Malgré les dimensions importantes de la particule, comparées à celles de la biomolécule, et le nombre de biomolécules liées à la particule observée, cette technique a permis de mesurer fidèlement le mouvement diffusif de biomolécules et a fourni de nombreux résultats. Cependant elle présente quelques limitations,

que nous décrivons en nous plaçant dans le contexte de la neurobiologie et du suivi de récepteurs membranaires à la surface de neurones.

Si l'on suppose qu'une particule est liée à une seule protéine membranaire, le mouvement détecté correspond effectivement à celui de la protéine. En effet, la viscosité de la membrane est plus élevée que celle du milieu aqueux environnant, la protéine membranaire diffusera plus lentement que la particule plongée dans l'eau. Le coefficient de diffusion d'une protéine membranaire est de l'ordre de $0.1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ tandis que celui de la particule de diamètre inférieur à 200 nm, diffusant librement dans l'eau, est au moins dix fois plus élevé. Ainsi, la protéine membranaire impose son mouvement à la particule.

En réalité, une particule est souvent liée à plusieurs biomolécules, le mode de marquage rendant difficile le contrôle du nombre d'anticorps présents à la surface des particules. Nous verrons, dans le prochain chapitre (Équation 17, p.81), que le coefficient de diffusion des protéines membranaires varie logarithmiquement avec leur diamètre. Aussi, un petit groupe de biomolécules assemblées et diffusant de façon semblable qui peut être assimilé à une protéine de plus grand diamètre le coefficient de diffusion, a un coefficient de diffusion difficilement distinguable de celui d'une biomolécule isolée. Théoriquement, la mesure du coefficient de diffusion de la particule dépend donc peu du nombre de protéines réellement accrochées sous elle. Des expériences ont été réalisées sur un même système afin de comparer les coefficients de diffusion mesurée par la technique de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) et par la technique de suivi de particule [Lee 1991]. Il apparaît que les mesures de coefficients de diffusion obtenues en suivi de particules uniques sont généralement plus faibles que celle obtenues en FRAP, et que cet effet est d'autant plus marqué que le nombre d'anticorps, liés à la particule, est grand. Cela peut s'expliquer par le fait que la liaison à une seule biomolécule, diffusant plus lentement que le reste des protéines, suffit à imposer son mouvement à la particule, qui est ainsi ralentie.

Le principal inconvénient de cette technique provient de la taille des particules qui varie entre 40 nm et 1 μm et ne permet pas d'accéder à tous les domaines. En particulier la fente synaptique, à laquelle nous nous intéresserons dans le chapitre 2, et qui ne mesure que 20 à 50 nm, ne peut pas être explorée par cette technique. Aussi, nous sommes-nous tournés vers l'utilisation de la microscopie de fluorophores uniques.

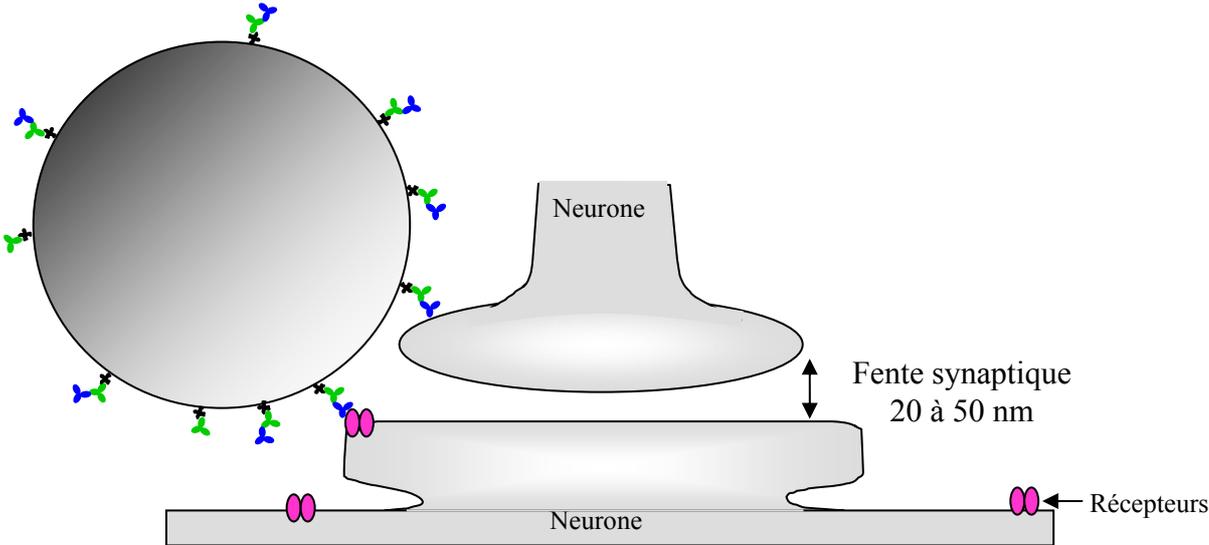


Figure 7: Limitation stérique du suivi de particules uniques

II. L'imagerie de fluorophores individuels

En 1989, W. E. Moerner et L. Kador publient la première détection d'une molécule unique de pentacène dans un cristal de paraterphényle à la température de l'hélium liquide, obtenue par une méthode sophistiquée d'absorption avec une double modulation [Moerner 1989]. Cependant, le rapport signal sur bruit de ces mesures est trop faible pour permettre des études spectroscopiques. Peu après, M. Orrit et J. Bernard montrent l'intérêt de l'excitation de la fluorescence pour la détection de molécules individuelles en phase condensée [Orrit 1990].

Aux températures cryogéniques, il est possible d'observer distinctement les pics spectraux des transitions mises en jeu. En particulier la raie sans phonons voit son intensité croître à mesure que la température diminue. Or elle est caractérisée par une très fine largeur homogène comparée à la largeur de la bande inhomogène qui apparaît lorsqu'un ensemble de molécules est observé. De ce fait, une molécule individuelle peut être isolée spectralement aux températures cryogéniques, à condition toutefois que le nombre de molécules excitées reste inférieur au rapport des largeurs inhomogènes et homogènes. Ces expériences ont ouvert le champ de la spectroscopie optique.

La première observation de molécules uniques à température ambiante a été effectuée en 1993 par une méthode de champ proche optique [Betzig1993]. Cependant la complexité de cette méthode limite son champ d'application. Un grand pas a été franchi, en 1994, avec la réalisation d'une détection de molécules uniques à l'aide d'un système confocal [Nie 1994], puis, en 1995, grâce à des systèmes d'épi-fluorescence [Dickson 1996, Schmidt 1995]. Ces développements ont rendu possible l'application de la méthode de détection de molécules uniques au domaine de la biologie.

Dans cette partie, nous allons montrer en quoi la détection de molécules uniques est délicate, puis nous présenterons les deux montages principaux, utilisés dans cette technique : le microscope confocal et le microscope d'épi-fluorescence.

A. Introduction

1. Contraintes de la microscopie de molécules uniques

L'imagerie de molécule unique est délicate à réaliser pour deux raisons principales. D'une part, le signal détecté doit provenir d'une seule molécule, ce qui impose une préparation particulière de l'échantillon. D'autre part, la puissance émise par une seule molécule est de l'ordre du picowatt, aussi le fond doit-il être réduit afin que le signal, issu de la molécule, domine toutes les sources de fond.

A température ambiante, les largeurs homogènes et inhomogènes sont comparables, il devient impossible d'isoler spectralement un fluorophore. La première contrainte technique consiste donc à préparer des échantillons suffisamment dilués, dans lesquels les molécules sont isolées spatialement. On choisit généralement une concentration des fluorophores inférieure à une molécule par micromètre cube, les systèmes d'imagerie ayant leur résolution limitée par diffraction.

Un fluorophore d'usage courant en molécule unique, tel que le Cy5, émet en moyenne plusieurs centaines de milliers de photons avant d'être photoblanchi. Son taux d'émission peut au mieux atteindre le millier de photons par milliseconde. Seuls quelques pourcents de ces photons sont ensuite détectés par le système d'imagerie. Ces ordres de grandeur font apparaître clairement que toute source supplémentaire de fond ou de bruit peut gêner la détection d'une molécule unique, et voire la rendre impossible.

Les photons, issus de la diffusion Rayleigh du faisceau d'excitation sur les différents éléments optiques du montage ou sur l'échantillon, peuvent être efficacement éliminés grâce à des filtres optiques. Les photons émis à des longueurs d'onde supérieures à celle du faisceau laser seront plus difficiles à éliminer. Ils peuvent provenir d'une fluorescence résiduelle de l'échantillon, ou de la diffusion Raman de la matrice ou de la solution dans laquelle sont insérés les fluorophores.

2. Les sources de fond propres aux systèmes biologiques

Les cellules contiennent naturellement des protéines fluorescentes (Figure 8). Les deux principales familles sont les flavines, telles que la FAD (*flavin adenin dinucleotide*) et les NAD(P)H (*nicotinamide adenine dinucléotide (phosphate)*). Elles possèdent toutes les deux des propriétés oxydoréductrices, qui en font des coenzymes de très nombreuses

II. L'imagerie de fluorophores individuels

réactions d'oxydoréduction se produisant dans les cellules [Fox 1988]. Les flavines absorbent entre 450 nm et 490 nm, et émettent entre 500 et 560 nm, tandis que les NAD(P)H ont un maximum d'absorption aux environs de 360 nm et un maximum d'émission aux environs de 460 nm, avec un décalage vers le bleu d'une vingtaine de nanomètres lorsque les NAD(P)H sont liées à des protéines [Billington 2001]. *In vivo*, les fluorophores émettant à des longueurs d'onde supérieures à 550 nm seront donc privilégiés puisque leur émission peut être parfaitement distinguée, grâce à des filtres optiques, de la fluorescence intrinsèque des cellules biologiques.

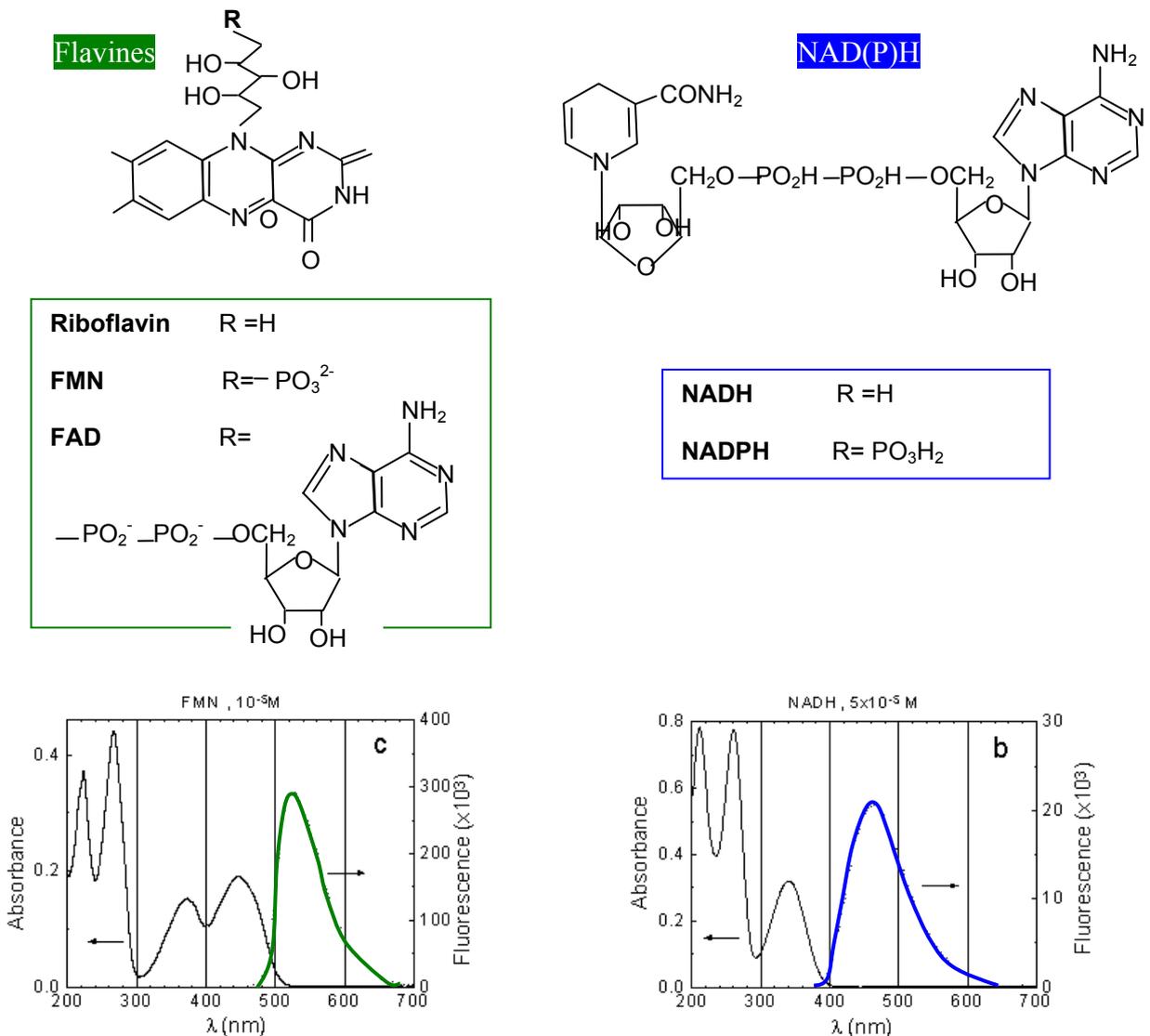


Figure 8: Principaux fluorophores intrinsèques des cellules avec leurs spectres d'absorption et d'émission [Pakalnis 2000]

B. Principaux montages

1. Introduction

a) Dispositif optique

Afin de collecter au mieux le signal émis par une seule molécule, le système optique doit être caractérisé par un rendement de collection élevé. Dans ce but, les microscopes employés utilisent des objectifs à immersion de grande ouverture numérique, typiquement 1,4. Le rendement de collection est de l'ordre de 5 à 10%.

Afin de recueillir uniquement la lumière émise par le fluorophore, on tire avantage du décalage existant entre le spectre d'absorption et le spectre d'émission. Le filtrage spectral est réalisé à l'aide de filtres interférentiels à bandes passantes étroites, de l'ordre de 30 à 50 nm, et de miroirs dichroïques. Ceux-ci réfléchissent à 45° le faisceau incident ayant la longueur d'onde d'excitation, et transmettent le rayonnement provenant de l'échantillon.

Comme la section efficace d'absorption d'un fluorophore est proportionnelle au carré de la projection du moment dipolaire de transition du fluorophore sur le champ exciteur, le faisceau d'excitation est généralement polarisé circulairement à l'aide d'une lame $\lambda/4$. De cette façon, tous les fluorophores disposés dans le plan de focalisation absorbent la même quantité d'énergie, et les signaux détectés peuvent être comparés.

b) Caractéristiques du montage

Si l'on s'intéresse maintenant à l'image formée par le système optique, sa qualité est décrite par deux caractéristiques : la résolution, liée à la limite de séparation des images de deux objets, et le contraste, lié au rapport signal sur bruit.

Le signal, enregistré pendant une durée d'acquisition Δt , est entaché du bruit qui a pour origine la fluctuation du nombre de photons émis par la molécule et par le reste de l'échantillon, et du bruit du détecteur.

Comme le processus d'émission est poissonnien, le bruit associé, appelé bruit de photon (*shot noise*), est égal à la racine carré du nombre total de photons détectés, $\sqrt{\eta \Delta t (n_{fluo} + n_{fond})}$, où n_{fluo} et n_{fond} sont les taux d'émission par unité de temps de la molécule observée et du fond, et η le rendement quantique du détecteur.

Le bruit du détecteur comprend :

- le bruit d'obscurité $\sqrt{\Delta t N_0}$, N_0 étant le signal d'obscurité par unité de temps, qui est lu en l'absence de tout signal lumineux,
- le bruit de lecture pour les détecteurs matriciels σ_L .

Finalement, les différents bruits étant indépendants, le rapport signal sur bruit s'écrit :

$$S/B = \eta \Delta t \Gamma_F / \sqrt{\eta \Delta t (n_{fluo} + n_{fond}) + \Delta t N_0 + \sigma_L^2} \quad \text{Équation 1}$$

Ce rapport signal sur bruit peut être augmenté en diminuant n_{fond} , pour cela on peut réduire la concentration des sources parasites, mais aussi le volume du fond excité. Par ailleurs, l'intensité d'excitation doit être choisie inférieure à l'intensité de saturation du fluorophore (équation 9, p 34), sous peine de faire chuter le rapport signal sur bruit.

2. Montage en épi-fluorescence

L'usage de la microscopie d'épi-fluorescence, pour détecter des fluorophores individuels, n'a été possible qu'avec la forte amélioration des performances, des détecteurs matriciels. Leur développement, destiné à améliorer les enregistrements de phénomènes astronomiques, a conduit à l'accroissement de leur rendement quantique, puis à l'augmentation de leur vitesse.

a) Dispositif optique

Un microscope illuminé en épi permet d'éclairer une zone, dont les dimensions peuvent atteindre plusieurs dizaines de micromètres de large (*Figure 9*). L'image est formée sur un détecteur matriciel. Pour cela, le faisceau laser incident est élargi grâce à l'introduction d'une lentille placée de telle sorte qu'elle focalise le faisceau au plan focal arrière de l'objectif. Le diamètre de la zone éclairée peut être modifié en fonction de la focale de la lentille employée.

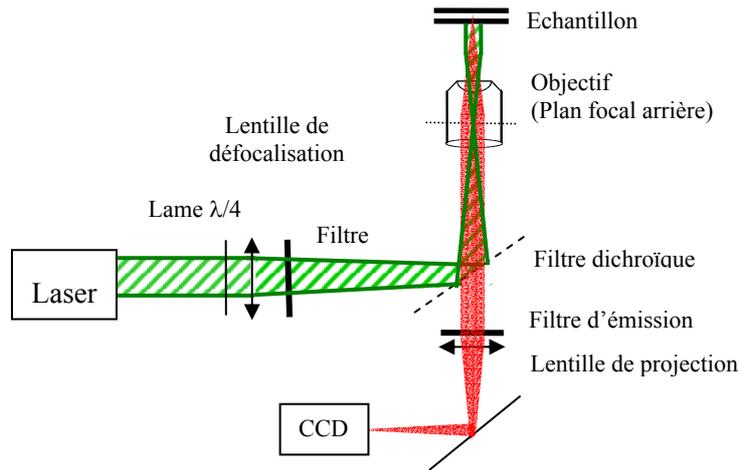


Figure 9 : Microscope illuminé en épi, monté en réflexion.

b) Détecteurs

De façon générale, un détecteur matriciel est une caméra CCD (*Charge Coupled Device*), qui est formée d'une matrice de détecteurs photosensibles, les électrons, créés par les photons incidents et s'accumulant sous chaque électrode.

Les caméras classiques ont une vitesse d'acquisition réduite. En effet, l'enregistrement d'une image ne peut avoir lieu que lorsque l'image précédente a été lue, i.e. lorsque la charge contenue dans chaque pixel a été convertie en signal numérique. Pour remédier à ce problème, est apparue une nouvelle génération de caméras, dites à transfert d'images, dans lesquelles seule la moitié de la matrice est illuminée, l'autre étant utilisée comme zone de stockage avant la conversion analogique numérique. Lorsque celle-ci est effectuée à une fréquence de 1MHz, une image 100×100 pixels est transférée en 10 ms. Ainsi, la limitation en fréquence d'acquisition, qui est due à la seule étape de conversion, disparaît quasiment. En effet, les durées d'acquisition sont de l'ordre de 30 ms pour un fluorophore usuel comme le Cy5. Différents types de caméras utilisent cette technologie à transfert d'image.

L'une des premières caméras, à en avoir disposé, est un détecteur matriciel illuminé par l'avant, auquel a été ajouté un dispositif intensificateur (I-pentamax de Roper Scientific). Le dispositif de transfert de charge étant couplé à un convertisseur analogique numérique rapide, le bruit généré par la caméra est important, d'où l'emploi d'un dispositif intensificateur. Celui-ci est composé d'un tapis de photocathodes, les *microchannel plates*, qui amplifient le nombre d'électrons initialement créés par les photons incidents. Ces électrons frappent ensuite un écran de phosphore qui à son tour émet des photons. Puis, ceux-ci illuminent la face avant de la matrice de détecteurs, qui les détecte. L'image formée

possède généralement un fond irrégulier, dans lequel la structure de l'intensificateur tend à apparaître.

En fait, un gain important en terme de rendement quantique a été atteint avec la mise au point de matrices illuminées par l'arrière, dont les rendements quantiques peuvent atteindre 95 %. Ces dispositifs sont refroidis aux environs de -120°C afin de réduire le bruit de courant d'obscurité.

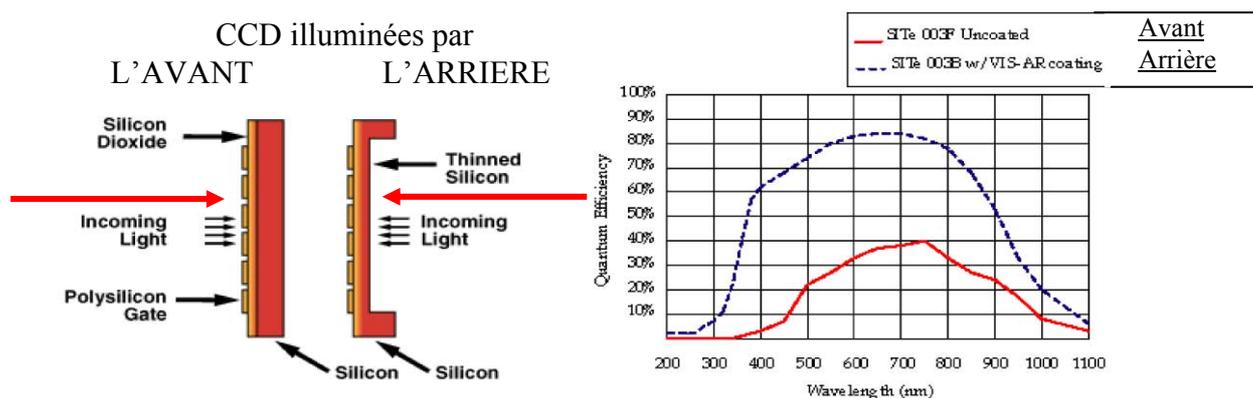


Figure 10: rendement quantique selon le type de détecteur CCD (Roper scientific)

Récemment, sont apparues des caméras CCD alliant la performance d'une matrice illuminée par l'arrière avec le dispositif de transfert d'images (Micromax de Roper Scientific). Elles présentent l'avantage d'enregistrer des images d'une grande homogénéité, avec un rendement quantique d'environ 80%.

Le signal provenant de chaque pixel est tout d'abord entaché du bruit d'obscurité. Il est réduit en abaissant la température du dispositif, c'est pourquoi les caméras disposent d'un module électrique de refroidissement, type module Peltier, ou d'un réservoir d'azote. En fait, pour des enregistrements de très courte durée, comme ceux qui sont réalisés en détection de molécules uniques, le bruit d'obscurité est négligeable devant le bruit de lecture.

Celui-ci augmente avec la fréquence de la conversion analogique numérique. Pour une caméra illuminée par l'arrière à transfert d'images et pour une fréquence de conversion de 1 MHz, il est de l'ordre de 8 électrons par pixel. L'utilisation d'un dispositif amplificateur de gain G , quel qu'il soit, tend à réduire l'importance relative du bruit de lecture dans le rapport signal sur bruit (Équation 2).

$$S/B = G \cdot \eta \Delta t \Gamma_F / \sqrt{G \cdot \eta \Delta t (n_{\text{fluo}} + n_{\text{fond}}) + \sigma_L^2} \quad \text{Équation 2}$$

Ainsi, dernièrement, un nouveau type de caméra, illuminé par l'arrière et à transfert d'images, est apparu, dans lequel une ligne d'amplification a été ajoutée juste avant le registre où se produit la conversion (Cascade de Roper Scientific, iXon d'Andor Technology). En fait, de tels dispositifs ne sont intéressants que si le bruit est dominé par le bruit de lecture du détecteur. En revanche, lorsque le bruit provient essentiellement du fond, le dispositif amplificateur, ne présente pas d'intérêt.

c) Limite de séparation

Lorsque l'échantillon est éclairé uniformément, l'image d'une molécule, formée à travers le système optique, est limitée par la diffraction de Fraunhofer due à l'objectif. Le signal, détecté dans le plan du détecteur, correspond à la tache d'Airy, et a pour expression, en fonction de la distance au centre optique :

$$I(x, y) = \left| \frac{2J_1(\rho_{im}/G)}{\rho_{im}/G} \right|^2 \quad \text{Équation 3}$$

où $J_1(\rho_{im}/G)$ est la fonction de Bessel avec $\rho_{im} = \frac{2\pi n \sin U}{\lambda} \sqrt{(x_{im}^2 + y_{im}^2)}$, $n \sin U = ON$ étant l'ouverture numérique du signal, et G le grandissement de l'ensemble constitué par l'objectif et la lentille de projection (Figure 11).

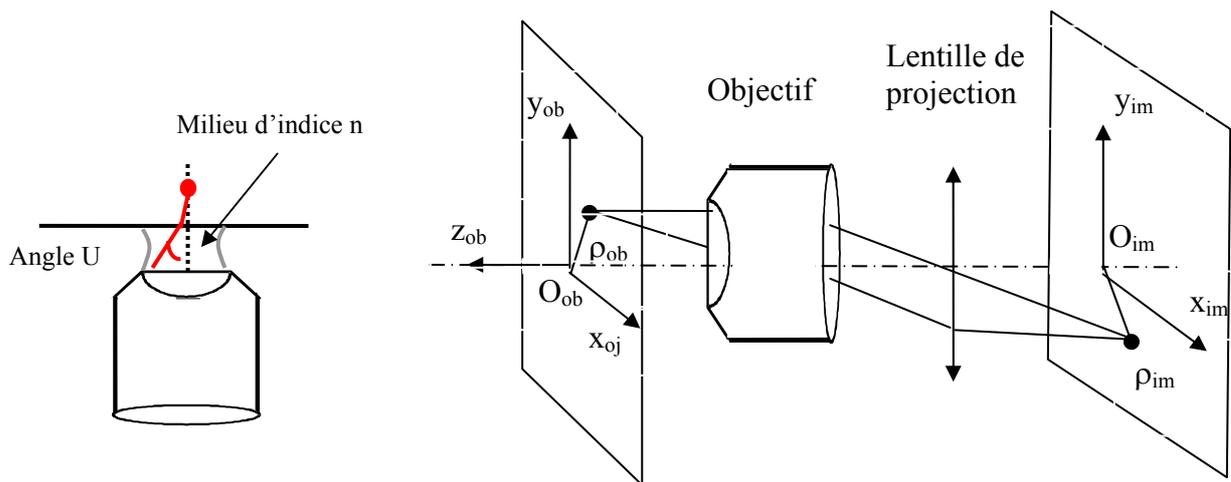


Figure 11: objectif et formation des images dans un microscope d'épi-fluorescence

Nous pouvons déduire, de cette expression, la limite de séparation des images de deux points lumineux incohérents, que sont par exemple deux fluorophores. Pour cela, nous adoptons le critère selon lequel les images ne peuvent être séparées que si elles sont éloignées d'une

distance au moins égale au rayon de la tache de diffraction. Cela correspond à une baisse de 25% de l'intensité totale obtenue. D'après ce critère, deux molécules peuvent être distinguées si elles sont distantes de :

$$\Delta R_C = 1,22 \lambda / 2ON \quad \text{Équation 4}$$

L'intensité d'un objet ponctuel, en fonction de la distance axiale, a pour expression [Wilson 1984]:

$$I(z) = \left(\frac{\sin(Kz_{ob})}{Kz_{ob}} \right)^2 \quad \text{avec } K = n\pi(1 - \cos U) / \lambda \quad \text{Équation 5}$$

d) Ondes évanescentes

Comme nous venons de le voir, l'utilisation du montage en illumination épi classique pour le suivi de molécules uniques requiert des efforts constants pour abaisser toutes les sources de fond, et en particulier la fluorescence parasite. Pour remédier à ce problème, un éclairage en champ large par ondes évanescentes a été développé ou illumination TIR (*Total Internal Reflection*). Le faisceau incident subi une réflexion totale interne à l'entrée dans l'échantillon ; ainsi, l'intensité décroît exponentiellement sur une distance égale à environ 150 nm, à partir de la face d'entrée du faisceau exciteur. Ce dispositif a largement été utilisé car il permet effectivement de réduire le fond de façon importante. Cependant, les fluorophores répartis dans cette épaisseur ne sont pas soumis à la même intensité d'excitation, aussi est-il difficile de comparer les intensités émises par chaque fluorophore. De plus, dans le cas de l'observation de cellules vivantes, seule la membrane en contact avec la lamelle peut être visualisée.

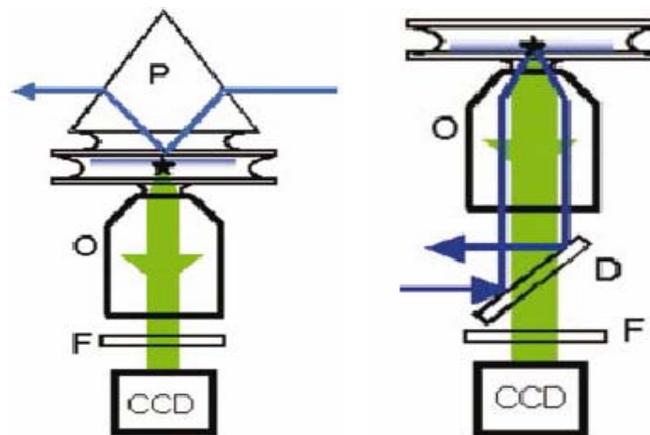


Figure 12: Montage d'épi-fluorescence avec une illumination TIR [Moerner 2003]

3. Montage confocal

a) Dispositif optique

Dans un microscope confocal, l'échantillon est balayé par le faisceau excitateur focalisé à sa surface et seules les molécules excitées dans cette zone sont détectées.

En pratique, la conjugaison de la source excitatrice ponctuelle et du récepteur est assurée par un seul objectif à l'intérieur d'un microscope monté en réflexion. Deux stratégies sont alors envisageables : soit l'objet est mobile, soit le faisceau est dévié (Figure 13). Dans le premier cas, l'objet est fixé sur une translation piézoélectrique qui permet de parcourir des zones d'environ cent micromètres carrés. Dans le deuxième cas, le faisceau est défléchi selon les deux directions latérales par un système déflecteur qui peut être composé d'un modulateur acousto-optique ou de miroirs montés sur des lames galvanométriques. Ces systèmes déflecteurs sont conjugués avec le plan focal arrière d'un objectif, de sorte que le faisceau réfléchi, et par suite la fluorescence, sont ramenés dans une direction fixe indépendante des angles de déflexion.

Le premier système est simple à mettre en œuvre et robuste mais plus lent que le second. En fait, lors de la détection de molécules uniques, la vitesse d'acquisition est limitée par le temps nécessaire à l'obtention d'un signal suffisant, qui est de l'ordre de plusieurs millisecondes, et non par le dispositif de balayage.

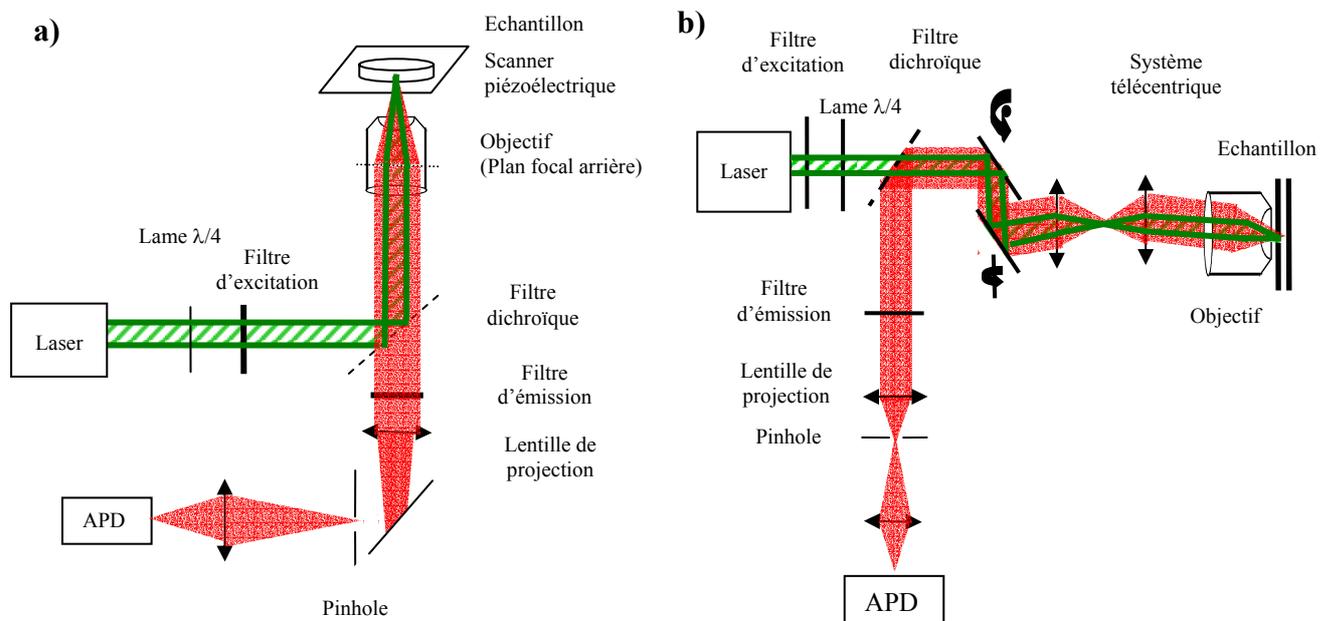


Figure 13 : Montages de microscopie confocale à déplacement de la platine (a), à balayage laser (b)

Les sources de lumières employées sont généralement des lasers dont la puissance atteignant l'échantillon est typiquement de quelques dizaines de microwatts. Ainsi, l'intensité d'excitation ne dépasse pas la dizaine de kilowatts par centimètre carré qui est l'ordre de grandeur de l'intensité de saturation des fluorophores utilisés en molécules uniques.

Le détecteur est généralement une photodiode à avalanche (APD) dont la surface de détection est de l'ordre de 100 μm de diamètre. Son rendement quantique peut atteindre 60% dans le visible. Le bruit provenant du détecteur est uniquement le courant d'obscurité, noté N_0 , qui s'élève à 50 coups par seconde, soit moins d'un coup au cours d'une acquisition de durée égale à 10 ms.

b) Limite de séparation

Dans un montage confocal, l'échantillon est éclairé par un faisceau focalisé, qui forme donc une tache d'Airy autour de la molécule. L'intensité détectée provenant d'une molécule est le produit de convolution de la réponse du système optique à un objet ponctuel par le produit de l'intensité d'excitation et de la fonction de répartition spatiale de la molécule, qui se limite à une fonction de Dirac. Ainsi, l'intensité détectée est le carré du signal obtenu en épifluorescence, soit finalement dans le plan de l'échantillon [Wilson 1984]:

$$I(x, y) = \left| \frac{2J_1(\rho_{im}/G)}{\rho_{im}/G} \right|^4 \quad \text{Équation 6}$$

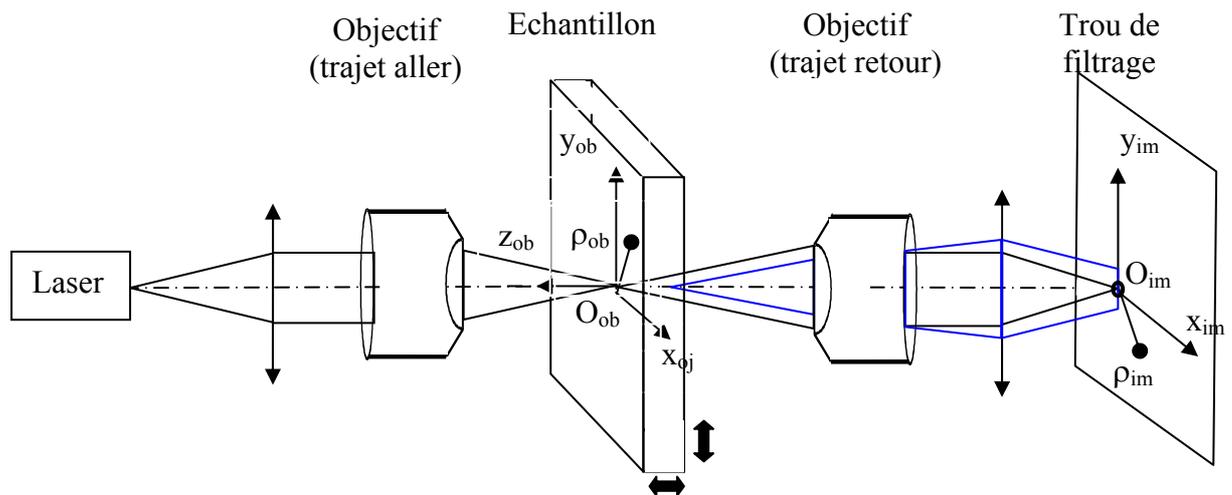


Figure 14: dispositif confocal schématisé ; le système est présenté en mode transmission pour une meilleure lisibilité du schéma.

Le critère défini précédemment a été employé pour la microscopie confocale et conduit à une amélioration de la limite de séparation d'un facteur égal à 1,4 (Figure 15).

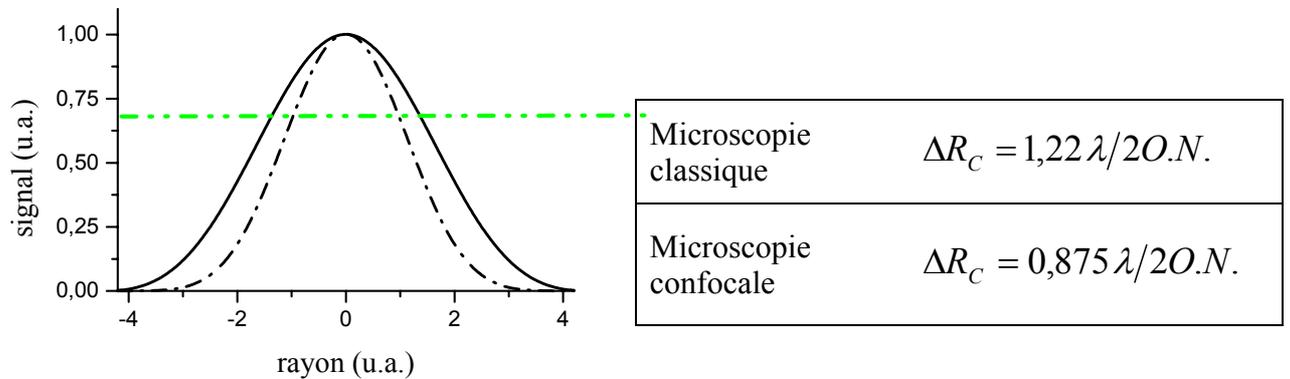


Figure 15 : comparaison des intensités détectées dans un microscope classique (—) et dans un microscope confocal (-.-) [Bouchareine 1997]

L'intensité d'un objet ponctuel en microscopie confocale, en fonction de la distance axiale, est le carré de celle obtenue en microscopie d'épi-fluorescence. La limite de séparation axiale est donc plus élevée qu'en microscopie de champ large (Figure 16). Cette décroissance plus rapide en fonction de z contribue à diminuer la fluorescence détectée provenant du reste de l'échantillon.

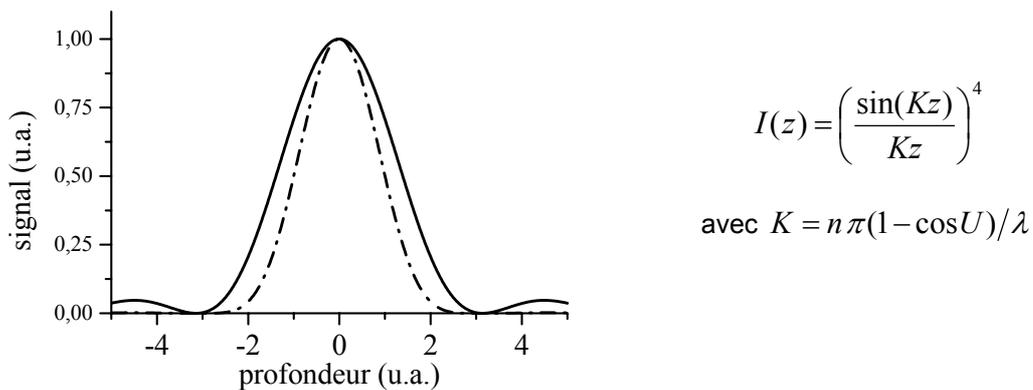


Figure 16 : résolution axiale : graphe représentant le signal détecté en fonction de la position axiale dans un microscope confocal (-.-) et dans un microscope épi (—) ; équation du signal obtenu dans un microscope confocal en fonction de la position axiale [Wilson 1984].

c) Rapport signal sur bruit

Le grand intérêt de la microscopie confocale est qu'elle offre la possibilité de réduire le signal du fond, grâce à l'utilisation de trous de filtrage. Nous allons voir maintenant comment leur taille influence le rapport signal sur bruit.

De façon qualitative, les émetteurs contribuant principalement à l'image sont situés à une profondeur telle que leur émission est collectée avec l'angle maximal permis par l'ouverture de l'objectif, après passage à travers le trou de filtrage placé devant le détecteur. Le diamètre du trou de filtrage étant généralement choisi égal à une fraction de la tache de diffraction, cette profondeur est donnée par l'expression suivante [Bouchareine 1997]:

$$z_l = \frac{\Delta R_c}{k} \frac{1}{n \sin U} \quad \text{Équation 7}$$

Une modélisation possible de l'échantillon consiste à décrire le signal du fluorophore comme provenant d'un objet ponctuel, et le signal du fond comme issu d'un échantillon d'épaisseur donnée et contenant une concentration uniforme de fluorophores [Sandison 1994]. L'intensité collectée sur le détecteur est égale au produit de convolution de la réponse du système optique à un objet ponctuel (PSF), par le produit de la répartition des fluorophores et de l'intensité excitatrice, le tout intégré sur l'épaisseur de l'échantillon et sur la surface du détecteur.

Le calcul numérique du signal du fond en fonction de la profondeur de l'échantillon montre effectivement que le signal du fond sature rapidement avec la profondeur, alors que dans le cas d'un microscope éclairé en champ large, elle croît linéairement avec la profondeur. Ainsi, lorsque un échantillon épais est observé en microscopie confocale seule une épaisseur donnée de l'échantillon, qui dépend de la taille du trou de filtrage, contribue au fond détecté.

En fait, les simulations réalisées par Sandison et al. montrent que la courbe représentant le rapport S/B en fonction de la taille du détecteur passe par un maximum, de l'ordre de 25 μm . pour un objectif $\times 100$. Le choix du trou de filtrage répond donc à deux contraintes : réduire le volume participant au signal de fond détecté tout en conservant un rendement de collection, du signal émis par le fluorophore élevé.

d) Limites d'utilisation

Comme nous venons de le voir la microscopie confocale présente des caractéristiques avantageuses. D'une part, elle est caractérisée par une résolution meilleure que celle du microscope d'épi-fluorescence. D'autre part, elle permet de réduire le volume dont on recueille le signal, et ainsi d'affaiblir le fond. Ainsi, lors de l'imagerie de tissus épais, la technique confocale s'avère essentielle.

Cependant, la microscopie confocale reposant sur une technique de balayage de l'objet, elle n'a d'intérêt que si les fluorophores sont immobilisés ou se déplacent lentement par rapport à la vitesse de balayage, dans le plan de focalisation. En effet, une image de 20 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$

nécessite le balayage de 100×100 zones élémentaires, sur lesquels les signaux sont enregistrés pendant une durée d'au moins 1 ms, compte tenu du faible taux d'émission d'un fluorophore unique. Finalement, l'acquisition d'une image requiert 10 s. Or, entre deux images, une protéine membranaire parcourt en moyenne $1 \mu\text{m}$. Le montage confocal est donc peu approprié au suivi de mouvements diffusifs dans les cellules.

III. Les marqueurs fluorescents

La détection optique d'une protéine précise requiert un marquage le plus spécifique possible, de telle sorte que la fluorescence détectée provienne exclusivement de la protéine d'intérêt. Si l'on étudie un système biologique *in vitro*, la biomolécule d'intérêt peut être fusionnée directement au fluorophore synthétique par une réaction chimique appropriée. Si, maintenant, l'on souhaite repérer une protéine dans son milieu cellulaire, on utilise, selon une méthode d'immunochimie classique, un anticorps dirigé contre elle, dont l'affinité caractérise la spécificité du marquage. Ce sont alors les anticorps qui sont fusionnés aux fluorophores. *In vivo*, un marquage parfaitement spécifique des protéines peut aussi être obtenu en tirant profit des techniques offertes par le génie génétique, et de la découverte de protéines fluorescentes.

Dans cette partie, nous allons présenter les fluorophores, protéines fluorescentes et nanoparticules semi conductrices qui peuvent être employées comme marqueurs de biomolécules, et comparer leurs propriétés photophysiques.

A. Les fluorophores

1. Introduction

Les fluorophores de synthèse classiques tirent leurs propriétés de doubles liaisons alternées dont les électrons peuvent se délocaliser, sur l'espace qu'elles occupent à l'intérieur de la molécule. On considère le cas des fluorophores de type polyène, i.e. ayant une structure linéaire composée de doubles liaisons alternées. Les électrons composant ces doubles liaisons peuvent être décrits dans le cadre du modèle de puits infini. Les électrons se déplacent librement à l'intérieur d'une boîte, dont la largeur (L) est celle de la zone occupée par les doubles liaisons conjuguées. Ainsi les niveaux d'énergie varient comme l'inverse de la largeur de la boîte au carré, soit $E_N = N^2 \hbar^2 \pi^2 / 2m_e L^2$. Les écarts d'énergie entre l'état fondamental et les niveaux excités diminuent lorsque la largeur de la boîte augmente, i.e. les spectres d'absorption et d'émission se déplacent vers le rouge, lorsque la zone de délocalisation s'accroît. Ce principe s'étend aux composés cycliques.

Par exemple, les cyanines sont une famille de fluorophores dont le motif principal est constitué de doubles liaisons alternées. Un exemple concret est donné par les cyanines Cy3 et Cy5 (Amersham Biosciences), qui possèdent respectivement deux et trois doubles liaisons conjuguées, et dont les pics maxima d'émission sont centrés sur 568 nm et 670 nm (Figure

17). De la même façon, les Alexa (Molecular Probes) sont composées d'un nombre plus ou moins grand de cycles benzéniques. La zone de délocalisation des électrons, appartenant aux doubles liaisons conjuguées, est donc plus ou moins étendue.

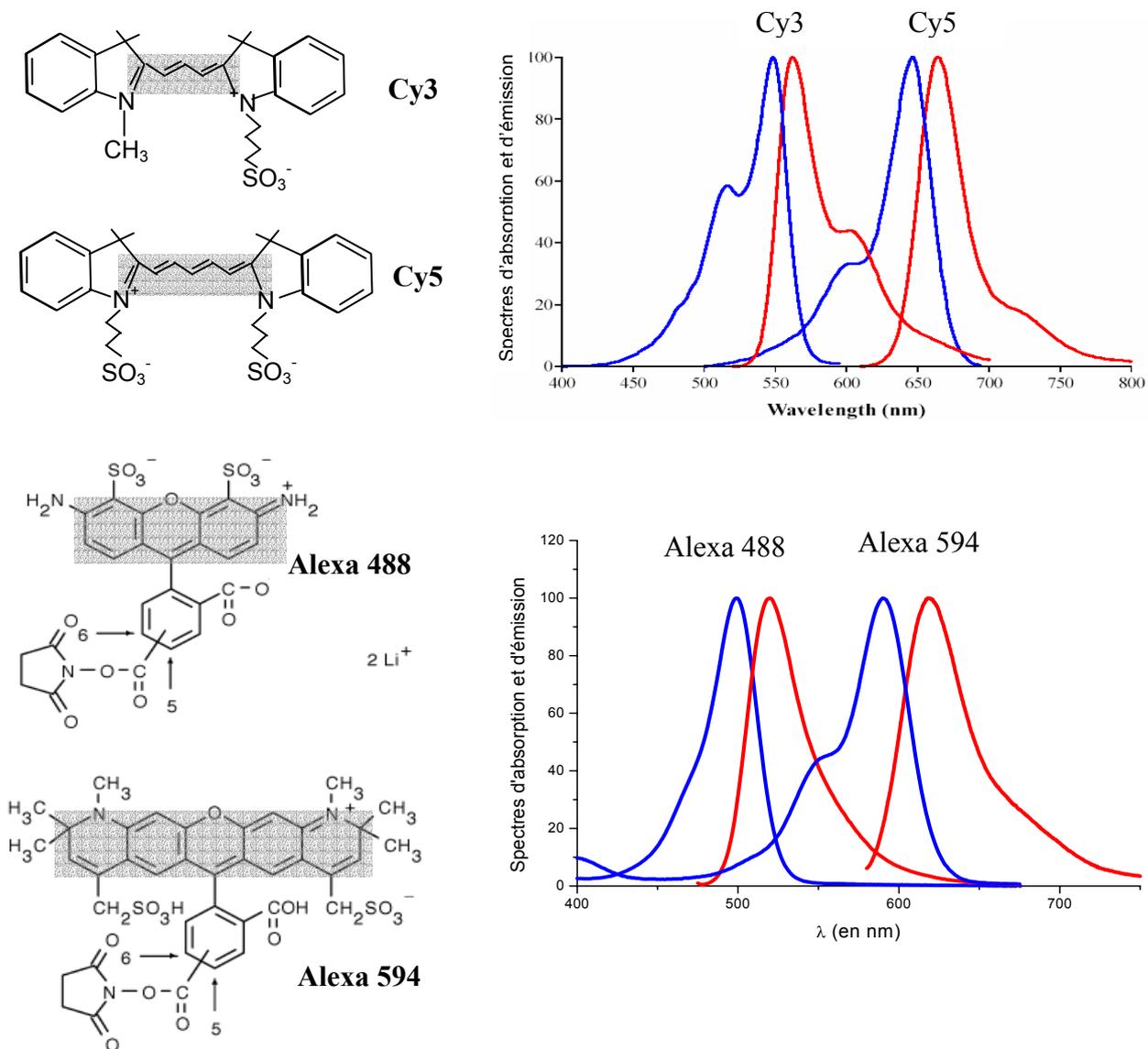


Figure 17: Lien entre la largeur totale des doubles liaisons conjuguées présentes dans les fluorophores, et leurs spectres (Cy3 et Cy5 produit par Amersham Biosciences, Alexa 488 et 597 par Molecular Probes).

Les transitions entre ces différents niveaux d'énergie sont schématisées dans le diagramme de Jablonski (Figure 18). Les électrons participant à la fluorescence sont généralement pairs. Compte tenu de la règle de Pauli, le niveau fondamental a un spin nul, il s'agit d'un état singulet. Les niveaux excités peuvent aussi être de spin nul, ils ont alors notés $S_1, S_2...$ Certains niveaux excités possèdent des états de spin de multiplicité différente comme les états triplets, qui correspondent à trois états de spin, notés $T_1...$ L'état triplet T_1 a une énergie plus faible que S_1 , l'intégrale d'échange ayant une valeur plus faible pour le triplet.

L'existence des transitions dipolaires électriques est régie par des règles de sélection. En particulier, les transitions entre des niveaux d'énergie, correspondant à des états de spin de multiplicités différentes, sont interdites. Théoriquement, il ne peut donc pas exister de transition entre un niveau triplet, et un niveau singulet. En fait, ces transitions se produisent, et donnent lieu à des croisements intersystèmes. Cependant, la durée de vie de telles transitions est très supérieure à la durée de vie de la transition singulet – singulet, qui est de l'ordre de la nanoseconde.

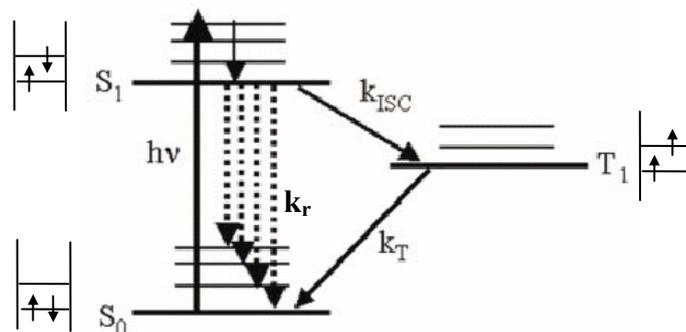


Figure 18: diagramme de Jablonski des niveaux électroniques du fluorophore. On a représenté les deux électrons périphériques du fluorophore et leurs positions dans les niveaux d'énergie pour chaque configuration électronique du système [Moerner 2003].

A chaque configuration électronique, est associée une énergie potentielle correspondant notamment aux mouvements de vibration des noyaux. Ces courbes tracées en fonction d'une coordonnée nucléaire, pour chacun des niveaux électroniques, peuvent avoir des minima situés à des coordonnées nucléaires différentes (Figure 19). Selon le principe de Franck-Condon, la transition électronique a alors lieu entre les niveaux vibroniques pour lesquels les coordonnées nucléaires sont inchangées ; ce peuvent donc être des niveaux non purement électroniques. Ceci est vrai aussi bien lors de l'absorption d'un photon que lors de l'émission.

Le faisceau incident porte le fluorophore dans un des niveaux vibroniques de l'état électronique excité singulet. Il s'en suit une désexcitation rapide, de l'ordre de la picoseconde, vers l'état le plus bas de ce niveau électronique excité. Cette désexcitation correspond à une relaxation vibrationnelle.

Le système peut alors effectuer une transition radiative vers un niveau vibronique de l'état électronique fondamental. Le système peut aussi subir une transition non radiative vers ce même état singulet, lors d'un processus de conversion interne.

Enfin, le fluorophore peut se désexciter en passant à travers un état de multiplicité différente, et donner lieu à une transition non radiative à travers un processus de conversion intersystème.

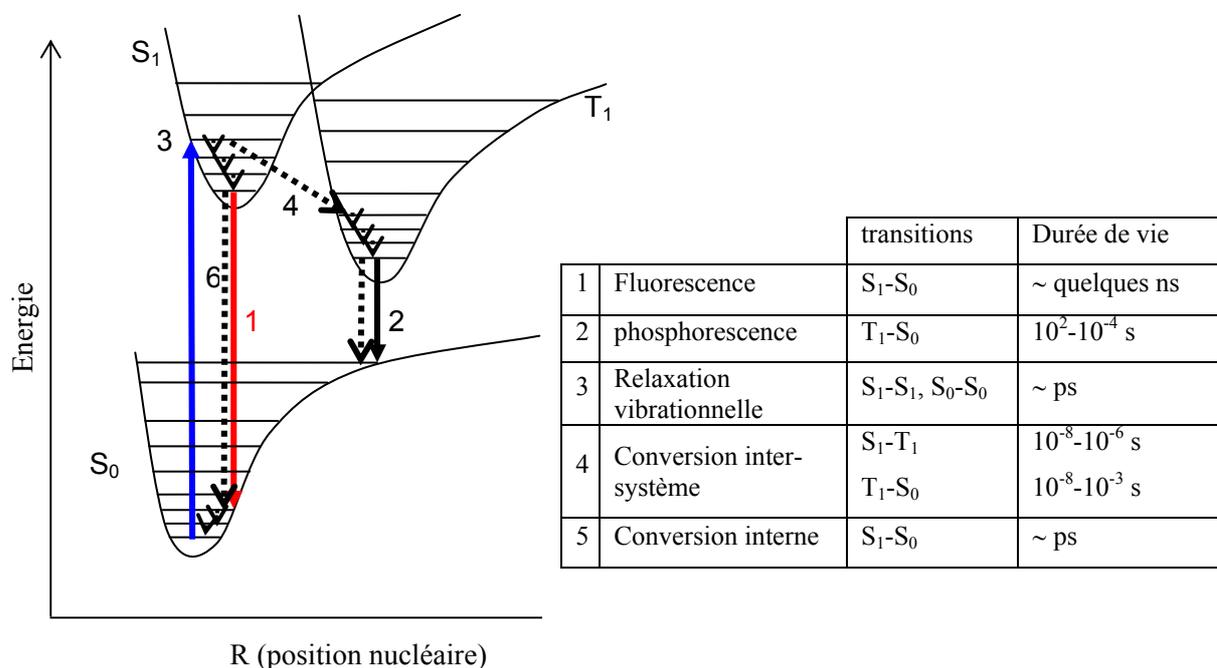


Figure 19: courbe d'énergie potentielle électronique et niveaux vibroniques associés en fonction d'une coordonnée nucléaire

Le spectre d'émission est décalé vers le rouge par rapport au spectre d'absorption. En effet, le décalage des minima des énergies potentielles, conduit à des processus de relaxation vibrationnelle. L'échange d'énergie, qui se produit alors par couplage intermoléculaire avec les molécules de solvant ou de la matrice, donne lieu au décalage des spectres, appelé décalage de Stokes.

D'un point de vue pratique, nous nous intéressons plus particulièrement à deux caractéristiques des fluorophores qui vont déterminer si elles peuvent être utilisées en détection de molécules uniques. Ce sont leur taux de fluorescence, et leur nombre total de photons émis avant qu'ils ne soient détruits par photoblanchiment.

2. Taux de fluorescence

Aux faibles intensités d'excitation, le nombre de photons émis par unité de temps, ou taux de fluorescence, dépend linéairement de la puissance excitatrice, selon l'expression suivante :

$$n_{Fluo} = \frac{I}{h\nu} * \sigma * \eta \quad \text{Équation 8}$$

où I est la densité surfacique de photons incidents par unité de temps, σ la section efficace du fluorophore, η et le rendement quantique de ce fluorophore.

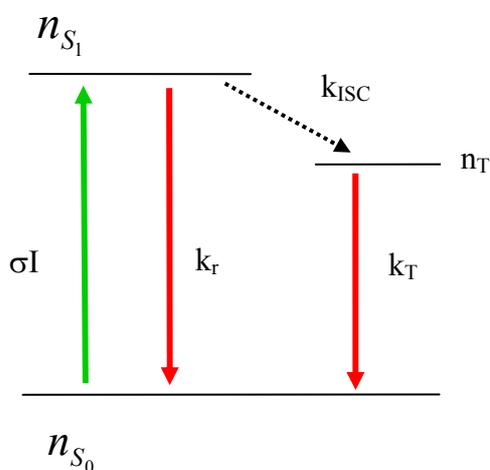
La section efficace, tout d'abord, a pour expression théorique $\sigma = 2\pi(\lambda/2\pi)^2 (k_r/\gamma_{hom})$, où k_r est le taux de la transition radiative, de l'ordre de 10^9 Hz, et γ_{hom} la largeur homogène de la transition. La largeur homogène est en fait la largeur à mi-hauteur de la raie d'absorption. Elle est, à un facteur multiplicatif près, égale à l'inverse de la durée de cohérence optique entre l'état fondamental et l'état excité : $\gamma_{hom} \pi = 1/T_2$. Or l'inverse de ce temps de cohérence est la somme du taux de désexcitation radiative (k_r) et non radiative (k_{nr}) de l'état excité, et du taux de déphasage du dipôle électronique ($1/T_2^*$) : $1/T_2 = \frac{1}{2}(k_r + k_{nr}) + 1/T_2^*$. Le déphasage du dipôle est causé par les fluctuations de la matrice ou du solvant, dans lesquels sont insérés les fluorophore, et par le couplage avec les phonons. Ce taux de déphasage décroît donc avec la température. Ainsi, aux températures cryogéniques, où la largeur homogène d'une molécule aromatique n'est que de 10^9 Hz, sa section efficace est de l'ordre de 10^6 \AA^2 . A température ambiante, la largeur homogène d'un fluorophore est très large, de l'ordre de 10^{15} Hz, et sa section efficace n'est plus que de quelques Å^2 . A température ambiante, la section efficace d'un fluorophore est donc comparable à sa taille.

Expérimentalement, cette grandeur se mesure à partir de la valeur de l'absorbance de la solution contenant le fluorophore. En effet, la loi de Beer-Lambert, qui régit la variation de l'intensité d'un faisceau lumineux traversant une solution de concentration c et d'épaisseur d , conduit aux relations suivantes : $\log(I_0/I) = \varepsilon cd$ et $\ln(I_0/I) = \sigma nd$, où n est le nombre de molécules par cm^3 . Finalement la connaissance du coefficient d'extinction molaire ε d'une molécule fluorescente suffit à déterminer sa section efficace : $\sigma = 3.82 \times 10^{-21} \varepsilon$, exprimée en cm^2 . Par exemple, le fluorophore Cy5 a un coefficient d'extinction molaire de 250000 M.cm^{-1} , i.e. une section efficace d'absorption de 10^{-15} cm^2 .

Une autre grandeur à mesurer est le rendement quantique du fluorophore. Il s'agit de la probabilité pour qu'un photon absorbé conduise à l'émission d'un photon. Le rendement quantique s'écrit alors : $\eta = k_r / (k_r + k_{nr})$. Il s'obtient expérimentalement grâce aux mesures de l'intensité émise par la solution contenant le fluorophore, et d'une solution de référence dont le rendement quantique est connu, les deux solutions étant excitées à la même longueur

d'onde [Lakowicz 1999]. Cependant, cette mesure est délicate, et les valeurs de sections efficaces, données dans la littérature pour un même fluorophore, sont parfois variables. Le solvant peut modifier les taux de transition non radiative, et donc le rendement quantique.

En fait, cette formule du taux de fluorescence (Équation 8, p 33) n'est valable que pour des intensités d'excitations faibles. Aux intensités plus élevées, le taux de fluorescence atteint un plateau, qui traduit un phénomène de saturation. Il est alors nécessaire de résoudre les équations régissant les populations des différents niveaux d'énergie, en régime permanent (Figure 20).



Equations des populations

$$\dot{n}_S = \sigma I n_{S_0} - (k_r + k_{ISC}) n_{S_1}$$

$$\dot{n}_T = k_{ISC} n_{S_1} - k_T n_T$$

$$N = n_{S_0} + n_{S_1} + n_T$$

Taux d'émission n_f :

$$n_{Fluo} = \frac{k_r / (1 + k_{ISC} / k_T)}{1 + I_S / I} \text{ avec } I_S = \frac{(k_r + k_{ISC})}{(1 + k_{ISC} / k_T)} \frac{h\nu}{\sigma} \quad \text{Équation 9}$$

Figure 20: Diagramme de Jablonski d'un système à trois niveaux et calcul du taux de fluorescence associé

Cette expression du taux d'émission traduit bien le phénomène de saturation observé pour le nombre de photons émis par unité de temps aux fortes intensités.

En l'absence de conversion intersystème, le taux de fluorescence atteint la valeur $n_{Fluo} = k_r$ pour des intensités très supérieures à l'intensité de saturation. Si on prend en compte maintenant cette conversion intersystème via l'état triplet, on constate que l'intensité de saturation est modifiée, et que le taux de fluorescence, à l'infini, a pour expression : $n_{Fluo} = k_r / (1 + k_{ISC} / k_T)$. Ce taux d'émission est donc réduit par le passage dans l'état triplet

et ce, d'autant plus que leur taux de passage intersystème k_{ISC} et leur durée de vie du triplet sont élevés. Les molécules destinées à l'observation en molécule unique doivent être suffisamment brillantes, aussi sont-elles choisies de telle sorte ces grandeurs soient faibles.

Lorsque la durée de vie du triplet est plus importante que les durées d'acquisition de la fluorescence, le signal observé clignote. Le phénomène de clignotement a été observé pour nombre de molécules. La mesure des T_{OFF} , pendant lequel la molécule cesse d'émettre, permet d'obtenir le temps moyen de la transition non radiative mise en jeu, qui est souvent attribuée à l'état triplet de la molécule [Ha 1997].

L'émission spontanée correspond à une émission aléatoire de photons caractérisée par le taux de fluorescence moyen par unité de temps, noté n_{Fluo} . Le nombre de photon émis pendant une durée t suit donc une distribution poissonnienne (Équation 10). De plus, lorsque la durée d'enregistrement est grande par rapport à n_{Fluo}^{-1} , le nombre de photons émis est correctement approximée par une fonction gaussienne, ce dont nous nous servirons lors de l'analyse des intensités mesurées.

$$proba(N_{photons}) = \exp(-n_{Fluo} t) \frac{(n_{Fluo} t)^{N_{photons}}}{N_{photons}!} \quad \text{Équation 10}$$

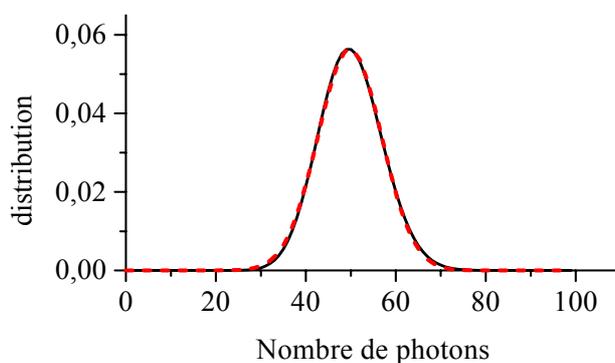


Figure 21: Distribution du nombre de photons émis spontanément par un fluorophore (—), ajustée par une fonction gaussienne (..)

3. Le photoblanchiment

L'emploi des fluorophores est limité par leur photoblanchiment qui se produit après environ 10^5 cycles de fluorescence. Bien que ce phénomène crucial pour la détection de molécules uniques soit abondamment étudié, ses mécanismes restent mal connus.

Lors de son photoblanchiment, un fluorophore porté dans un état excité subit une réaction photochimique qui le convertit en une espèce non fluorescente. Généralement, le photoblanchiment met en jeu un grand nombre d'états [Zondervan 2004]. A très forte intensité notamment, les fluorophores peuvent atteindre des niveaux triplets supérieurs via une excitation à plusieurs photons où ils sont chimiquement extrêmement réactifs. Cet effet rend très défavorable l'utilisation de l'excitation à deux photons pour l'observation de molécules uniques [Sanchez 1997, Blab 2001].

Pour caractériser ce phénomène, on a défini une grandeur appelée rendement de photoblanchiment. Il s'agit de la fraction de molécules photoblanchies par photon absorbé, soit encore l'inverse du nombre moyen de photons absorbés par une molécule. La valeur de cette grandeur est déterminante pour le choix d'un fluorophore. Cependant, le nombre de photons absorbés est difficile à évaluer, d'où des grandeurs variables trouvées dans la littérature pour un même fluorophore.

Le photoblanchiment d'un fluorophore dépend des espèces présentes dans le solvant. En particulier, le dioxygène dissous a une action bien connue. Le photoblanchiment dû au dioxygène est attribué principalement à un processus d'annihilation triplet-triplet entre la molécule fluorescente et le dioxygène. Il se forme alors un oxygène singulet très instable qui oxyde le fluorophore revenu dans son état singulet fondamental.

En première approximation, la cinétique du photoblanchiment peut alors être considérée comme étant monoexponentielle, et caractérisée par un temps moyen τ_{bl} . Cette photodestruction dépend de l'énergie d'excitation, et ainsi la durée moyenne de photoblanchiment diminue jusqu'à atteindre un plateau avec l'intensité d'excitation. Pour décrire cette saturation du photoblanchiment, on peut modéliser le processus dans le cadre d'un système à plusieurs niveaux excités qui peuplent le niveau correspondant aux molécules photodétruites. Le taux de photoblanchiment prend alors une forme semblable à celle du taux de fluorescence, à savoir $1/\tau_{bl} = (1/\tau_{bl}^{\infty})/(1 + I_S/I)$ [Harms 2001a].

Afin de réduire le taux de photoblanchiment, la stratégie la plus couramment employée est de réduire la concentration de dioxygène dissous à proximité des molécules. Pour cela différentes méthodes ont été mises en œuvre, soit en faisant circuler un gaz inerte dans l'échantillon, tel que l'argon ou de l'azote [Deschenes 2001], soit en ajoutant un mélange d'antioxydants enzymatiques, principalement de la catalase et du glucose oxydase,

dans le milieu [Harada 1990, Yasuda 1998, Ha 2001]. Ces stratégies ont effectivement conduit à l'appauvrissement en dioxygène dissous, et à des durées caractéristiques de photoblanchiment supérieures de 1 à 2 ordres, cependant le phénomène n'est pas totalement supprimé. En fait, ces méthodes ne sont utilisables que pour des expériences *in vitro*, car les recettes d'antioxydants contiennent des composés hautement toxiques pour les cellules, comme notamment le β -mercaptoéthanol.

4. Le marquage des protéines

De façon courante, les protéines possèdent des acides aminés de type lysine, dont le groupement amine primaire possède un caractère nucléophile. La lysine réagit avec des composés tels que les esters *succinimidyliques* ; pour laquelle la réaction est optimale pour un pH aux environs de 8,5 (Figure 22). En deçà, le groupement amine est protoné et donc dépourvu de caractère nucléophile, et au-delà il y a compétition avec la réaction d'hydrolyse inverse.

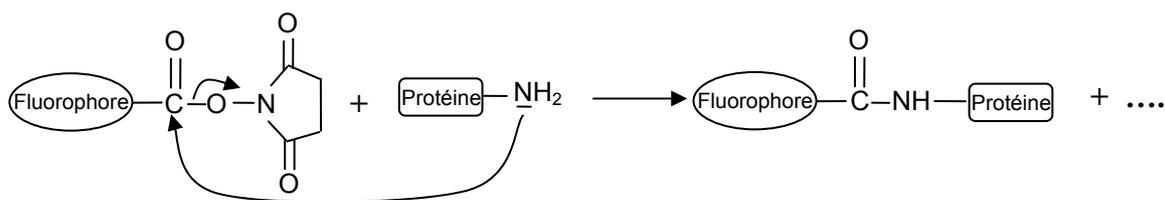


Figure 22 : Liaison covalente d'un fluorophore marqué d'un ester succinimidyl avec une amine primaire de la protéine

Les amines primaires des protéines peuvent aussi réagir avec d'autres composés comme les isothiocyanates, ou les *chlorides sulfonyl*.

Les protéines peuvent contenir un groupement thiol qui est aussi pourvu d'un caractère nucléophile, d'ailleurs plus fort que celui des amines. Ce groupement thiol est caractéristique de la cystéine, acide aminé beaucoup moins abondant dans les protéines que les groupements amines primaires. Les protéines sont parfois modifiées génétiquement de façon à supprimer des cystéines trop nombreuses sur la protéine, ou à ajouter sélectivement à un endroit précis de la protéine une cystéine [Vale 1996, Ha 1998]. Ce marquage permet donc un contrôle plus important sur le nombre et la position des fluorophores. Le marquage spécifique des cystéines peut se faire notamment grâce aux *maleimides*, à des pH faiblement basique pour que la réaction n'ait pas lieu avec les amines primaires de la protéine (Figure 23).

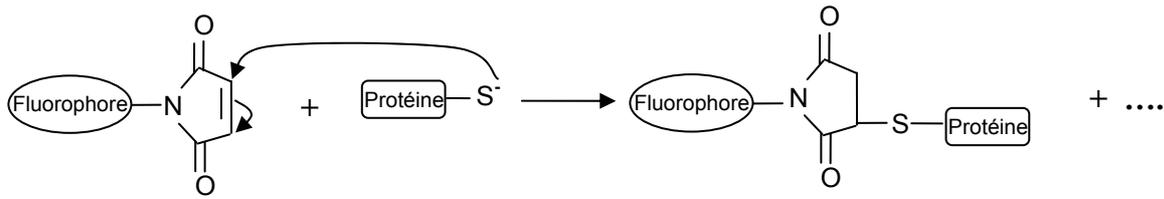


Figure 23: Liaison covalente d'un fluorophore marqué d'un maleimide avec un thiol d'une cystéine appartenant à la protéine

Séparer les protéines, marqués ou pas, des fluorophores n'ayant pas réagi se fait généralement à l'aide de colonnes d'exclusion choisies de telle sorte que les fluorophores de petite dimension soient piégés à l'intérieur des billes d'agaroses remplissant la colonne. Finalement, les protéines constituent la première fraction écoulee par gravité hors de la colonne, et les fluorophores n'ayant pas réagi la seconde.

Une stratégie originale a été réalisée afin de marquer la protéine d'intérêt, directement et dans son environnement cellulaire, à l'aide de fluorophores de synthèse. La première étape de cette technique consiste à modifier génétiquement la protéine que l'on souhaite détecter. Le plasmide ainsi construit est introduit dans les cellules, où les protéines modifiées s'expriment. La seconde étape consiste à incuber les cellules avec des fluorophores spécifiquement synthétisés pour se lier à la protéine modifiée [Cornish 1994].

Ainsi, l'ajout dans la protéine de la séquence d'acides aminés CCXXCC rend celle-ci réactive au composé FLASH-EDT₂ (Figure 24). Cette méthode est d'autant plus intéressante que le marquage de la protéine par ce fluorophore est réversible [Griffin 1998]. Un composé analogue à FLASH-EDT₂, appelé ReAsH, a été élaboré qui est, de plus, capable de réagir avec la DAB, et donc d'être détecté en microscopie électronique [Gaietta 2002].

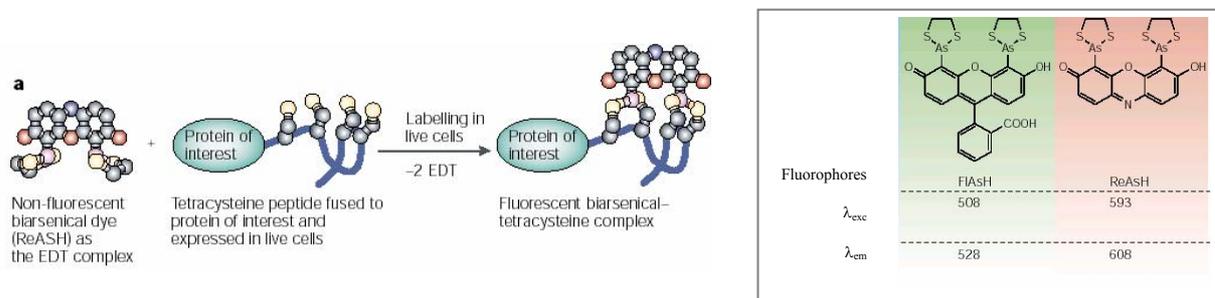


Figure 24 : Marquage spécifique utilisant les fluorophores à base d'arsenic développés par l'équipe de Tsien [Zhang 2002].

Récemment, un autre groupe a mis en œuvre cette stratégie de marquage en associant des protéines, auxquelles ont été ajoutées par modifications génétiques des séquences d'histidines, et des fluorophores commerciaux, fusionnés avec un résidu chélateur d'ions nickel [Guignet 2004]. Ce marquage est aussi réversible, et présente l'avantage d'utiliser des produits commerciaux.

B. Protéines fluorescentes

Généralement les protéines ne sont pas fluorescentes, car aucun acide aminé isolé n'absorbe dans le visible. Les acides aminés possédant un cycle benzénique, comme la phénylalanine, la tyrosine et la tryptophane, absorbent dans les UV, aux environs de 280nm. Il existe naturellement quelques protéines fluorescentes comme les cofacteurs d'enzyme que sont les NAD ou les FAD. Cependant, leurs propriétés photophysiques étant fortement dépendantes de leur liaison aux protéines, elles ne peuvent pas constituer des marqueurs fiables. En revanche, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, leur présence dans les cellules n'est pas négligeable puisqu'elles sont une source de fond important.

La GFP présente le grand avantage de permettre un marquage parfaitement spécifique de la protéine d'intérêt lorsque la protéine fluorescente est fusionnée, par génie génétique, à cette protéine.

1. Présentation

La protéine GFP, Green Fluorescent Protein, issue de la méduse *Aequorea* a été découverte par le groupe de Shimomura en 1962 [Shimomura 1962]. Il a cependant fallu attendre 1992 pour que son gène soit cloné [Prasher 1992], et 1994 pour qu'il soit transfecté dans des cellules de différentes espèces où la GFP conserve son caractère fluorescent [Chalfie 1994, Inouye 1994]. Sa structure cristallographique a été résolue en 1996 [Ormo 1996, Yank 1996].



Figure 25: Structure cristallographique de la GFP [Zhang 2002]

La GFP forme un cylindre creux, de 4nm de hauteur pour un diamètre de 3 nm, composé de 11 feuillets β à l'intérieur desquels se trouve une hélice α contenant le chromophore (Figure 25). Celui-ci est constitué par la succession de trois acides aminés : la serine (65), la tyrosine (66) et la glycine (67), qui ont subi des modifications post-transcriptionnelles. En effet, cet enchaînement d'acides aminés ne forme un chromophore qu'après s'être cyclisé, et avoir subi une α,β -déshydrogénation sur la tyrosine 66 [Cody 1993].

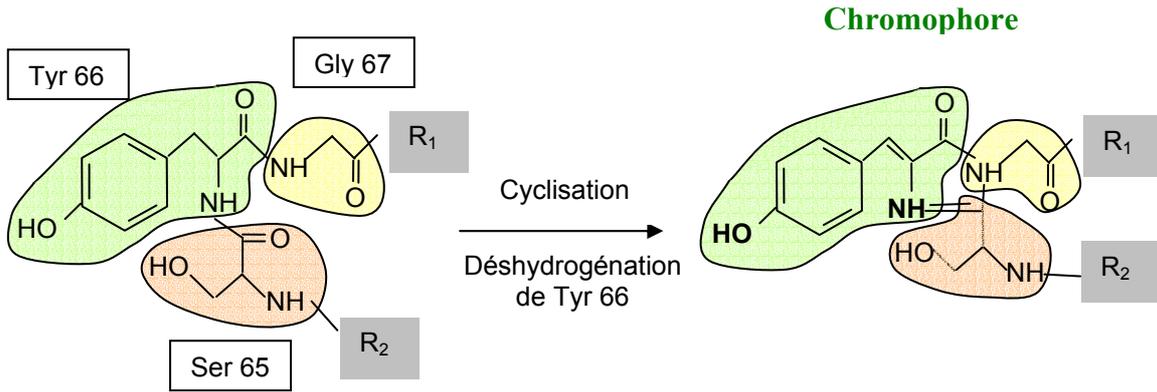


Figure 26: Formation du chromophore de la protéine GFP.

R_1 et R_2 représentent le reste des acides aminés composant la protéine. Les groupements en gras peuvent exister sous leur forme protonée ou non protonée.

Le chromophore existe sous quatre formes, qui correspondent aux formes protonées ou non des groupements $-NH-$ et $-OH$, en gras dans la Figure 26. La protéine GFP sauvage possède deux maxima dans son spectre d'absorption, qui ont été attribuées aux formes anioniques et neutres, et un seul pic d'émission [Chalfie 1994]. Cependant, la correspondance entre ces quatre formes et ses deux niveaux d'énergie reste controversée [Voityuk 1997].

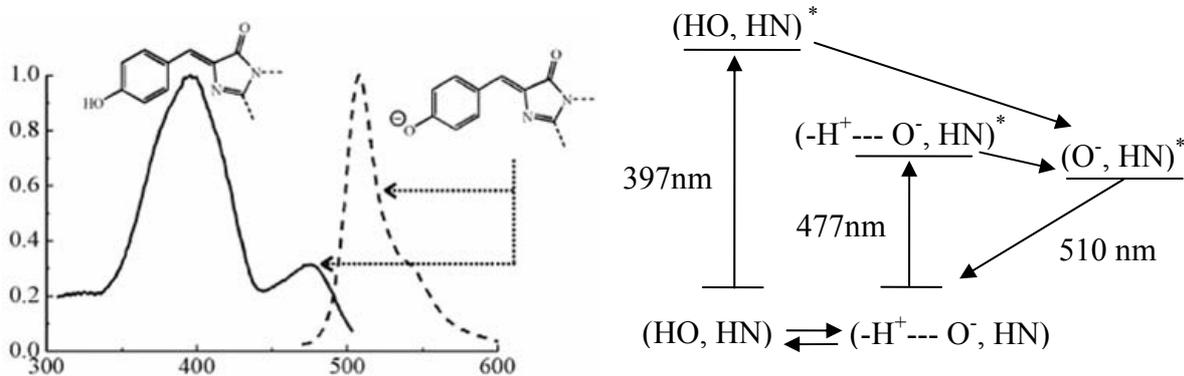


Figure 27: Spectre d'absorption et d'émission de GFP sauvage (a) ; transitions mises en jeu (b) [Tsien 1998].

2. Utilisation comme marqueur

L'utilisation d'une protéine autofluorescente comme la GFP a lieu grâce à la fusion de son gène avec celui codant pour la protéine d'intérêt, le tout étant inséré dans un plasmide qui pourra être introduit dans les cellules. Les protéines exprimées sont des chimères dont on doit vérifier que les fonctions de la protéine d'intérêt sont préservées. De ce fait, la GFP et ses variantes sont souvent introduites aux extrémités N- et C- terminales de la protéine d'intérêt. Cependant, les GFP ayant leurs extrémités proches l'une de l'autre, elles ont pu être insérées dans une boucle à l'intérieur de protéines [Siegel 1997].

Le marquage grâce à l'ajout à l'intérieur de la cellule du gène codant pour une protéine chimère, fusion de la protéine d'intérêt et de la protéine fluorescente, peut néanmoins perturber le fonctionnement de la cellule. En effet, le promoteur utilisé dans le plasmide codant pour la chimère induit une synthèse massive de la protéine d'intérêt ce qui peut modifier les équilibres entre les protéines et donc les mécanismes moléculaires en jeu.

3. Les mutants de la GFP

a) Variants spectraux

Différentes mutations ont été réalisées sur le gène de la GFP de façon à faire varier la taille de la zone de délocalisation des électrons, et ainsi obtenir des protéines fluorescentes ayant des spectres décalés par rapport à celui de la GFP. Pour cela, des modifications génétiques ont été effectuées sur les acides aminés formant le chromophore, mais aussi sur des acides aminés extérieurs proche spatialement de celui-ci.

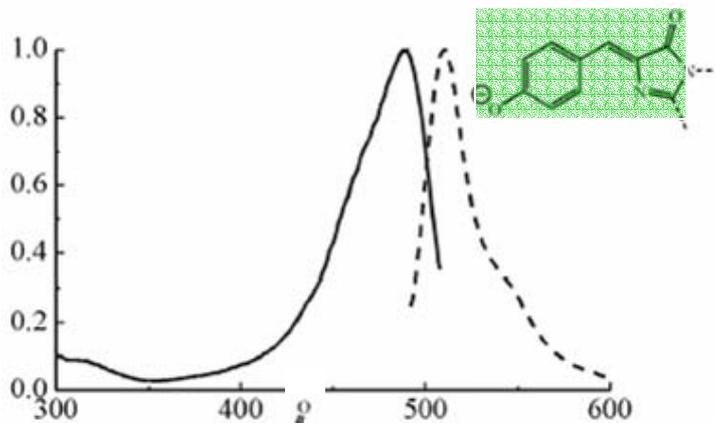


Figure 28: spectres d'absorption et d'émission de la GFP S65T [Tsien 1998].

A l'intérieur du chromophore une première mutation a été réalisée sur la serine 65 à laquelle a été substituée la thréonine. Cette mutation produit un chromophore dont la forme stable est

anionique, et qui a ainsi un seul pic d'absorption autour de 477 nm (Figure 28); ce chromophore peut ainsi être excité aisément par la raie 488 nm de l'argon. Des mutations de la tyrosine 66 ont aussi été réalisées de façon à réduire la taille de la zone de délocalisation des électrons. Elle conduit à des variantes de la GFP dont l'absorption et l'émission sont décalées vers le bleu. Pour cela la tyrosine 66 a été remplacée soit par la tryptophane, soit par l'histidine (Figure 29) [Tsien 1998].

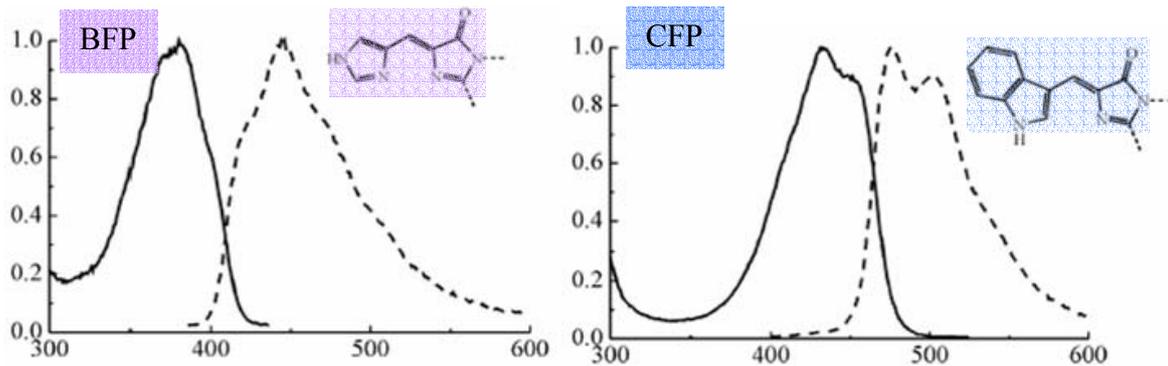


Figure 29: spectres d'absorption et d'émission de la CFP et de la BFP, mutants décalés vers le bleu de la GFP [Tsien 1998].

Le chromophore est voisin de plusieurs acides aminés formant les feuillets β ; en particulier, la thréonine 203 est située à quelques angstroms de du groupement $-OH$ précédemment évoqué. Le mutant YFP a donc été conçu en favorisant la forme anionique par la mutation S65T, et en introduisant à la place de la thréonine 203 un groupement polarisable (Figure 30). Ainsi une interaction $\pi-\pi$ est-elle possible entre le doublet de l'ion phénolate $-O^-$ et les groupes aromatiques de la phénylalanine, ou de la tyrosine que l'on substitue à la thréonine 203, agrandissant la zone de délocalisation des électrons. Il en résulte un chromophore dont les pics d'absorption et d'émission sont décalés vers le rouge d'une vingtaine de nanomètres.

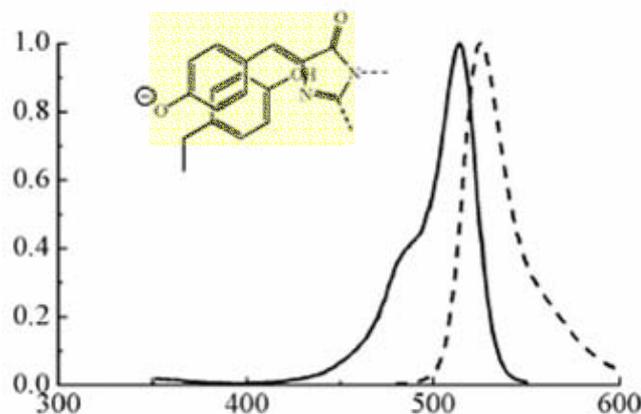


Figure 30: spectres d'absorption et d'émission de la YFP, mutant décalé vers le rouge de la GFP [Tsien 1998].

Récemment, une nouvelle mutation de la GFP a permis de créer une GFP photoactivable. La GFP sauvage a sa structure, et par suite son spectre d'absorption, modifiés par une photoactivation à 413 nm. En effet, le pic majeur d'absorption aux environs de 400 nm et le pic mineur aux environs de 480 nm voient leur importance relative inversée après photoactivation. La substitution de l'histidine à la thréonine 203 a permis de faire disparaître, avant la photoactivation, le pic mineur de l'absorption situé à 480 nm. Ainsi la protéine GFP photoactivable n'est excitée à 488 nm que si elle a été préalablement photoactivée à 413 nm [Patterson 2002].

Nom	Mutations	λ_{exc}	$\lambda_{ém}$
eGFP GFP PA	F64L,S65T	488 nm	507-509 nm
YFP	S65G, S72A, T203F ou T203Y	512 nm	522 nm
citrine	S65G, V68L, Q69M, S72A, T203Y	514 nm	527 nm
eCFP	F64L, S65T, Y66W, N146L, M153T, V163A	452 nm	505 nm
eBFP	F64L, Y66H, Y145F	380-383 nm	440-447 nm

Tableau 1: Mutants de la GFP sauvage les plus utilisées.

b) Mutants sensibles au pH

A priori, le chromophore est protégé du solvant par le cylindre qui l'entoure, la GFP sauvage a ainsi un pKa voisin de 4.5. Le rendement de fluorescence est affecté pour des pH inférieurs au pKa. Physiologiquement, le pH n'atteint pas de telles valeurs puisque l'on estime que le pH varie de 6.5, dans les compartiments de recyclage, à 5-5.5 dans les lysosomes [Mukherjee 1997]. Les mutants de la GFP peuvent avoir des pKa plus élevés qui les rendent vulnérables au pH. Par exemple, la YFP a un pKa de 6.1 ; une variante de la YFP, appelée citrine, a donc été créée dont le pKa est plus faible de l'ordre de 5.7. De plus, la citrine s'avèrerait plus résistante au photoblanchiment [Griesbeck 2001]. D'autres stratégies de mutation ont été adoptées afin d'élever le pKa et transformer ces variantes de la GFP en détecteur de pH. La diminution du rendement de fluorescence semble résulter de la protonation de l'ion phénolate ; or, celui-ci établit une liaison hydrogène, avec l'histidine 148, qui disparaît à un pH inférieur au pKa comme le montre la structure cristallographique obtenue dans deux conditions de pH extrêmes [Elslinger 1999]. Cette liaison hydrogène protège l'ion phénolate d'une interaction avec le solvant. Des mutations de l'histidine ont donc été effectuées en lui

substituant successivement une glutamine qui établit une liaison hydrogène mais ne possède pas de propriétés acido-basiques comme l'histidine, et une glycine qui supprime toute liaison hydrogène. Finalement, la YFP H148Q a un pKa aux environs de 7.5 tandis que la YFP H148G aux environs de 8.

c) Inconvénients de la GFP et de ses variantes

Excitées à 488 nm, les GFP clignent de façon importante, ce qui a été attribué à l'existence d'états sombres constitués par un état intermédiaire peuplé à partir de la forme anionique, et par la forme neutre dont la probabilité de peuplement est plus faible mais correspond à des durées de vie plus longues [Dickson 1997]. L'autre inconvénient de la GFP et de ses variantes réside dans leur photoblanchiment rapide (tableau 2).

De plus, ses protéines fluorescentes émettent à des longueurs d'onde où l'autofluorescence des cellules est maximale (Figure 31), puisqu'aucun mutant de la GFP, émettant au-delà de 550 nm avec un bon rendement, n'a été créé.

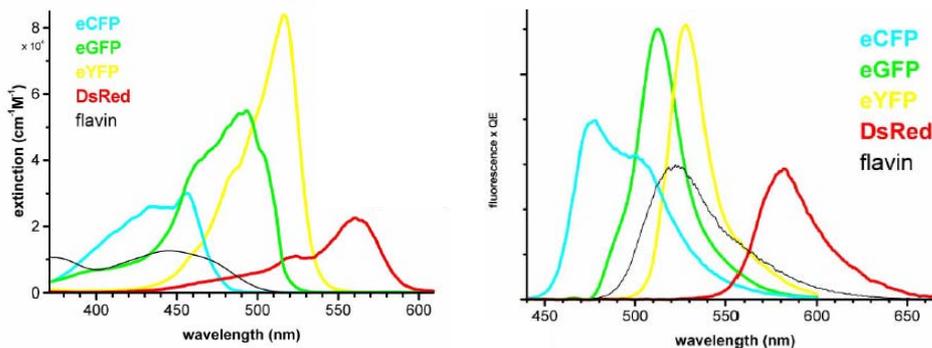


Figure 31: spectres d'absorption et d'émission de protéines fluorescente [Harms 2001a]

4. La protéine DsRed et ses mutants

Depuis sa découverte en 1999, la DsRed, protéine issue du corail *Discosoma*, suscite un grand intérêt [Matz 1999]. En effet, son maximum d'émission se situant à 583 nm, elle pourrait remplacer la GFP et servir de marqueur fluorescent aux grandes longueurs d'onde. Elle possède un rendement quantique élevé, puisqu'il dépasse 70 %, et émet un nombre total de photons légèrement supérieur à celui émis par la GFP [Lounis 2001].

Cependant, la DsRed est une protéine tétramérique même à de très faibles concentrations ce qui peut gravement perturber le système biologique en induisant des agrégations artificielles. De plus, son temps de maturation est long, puisqu'une dizaine d'heures sont nécessaires à la protéine nouvellement synthétisée pour acquérir sa structure tridimensionnelle finale. Or, la

DsRed n'atteint ses caractéristiques photophysiques optimales que lorsqu'elle est arrivée à maturité.

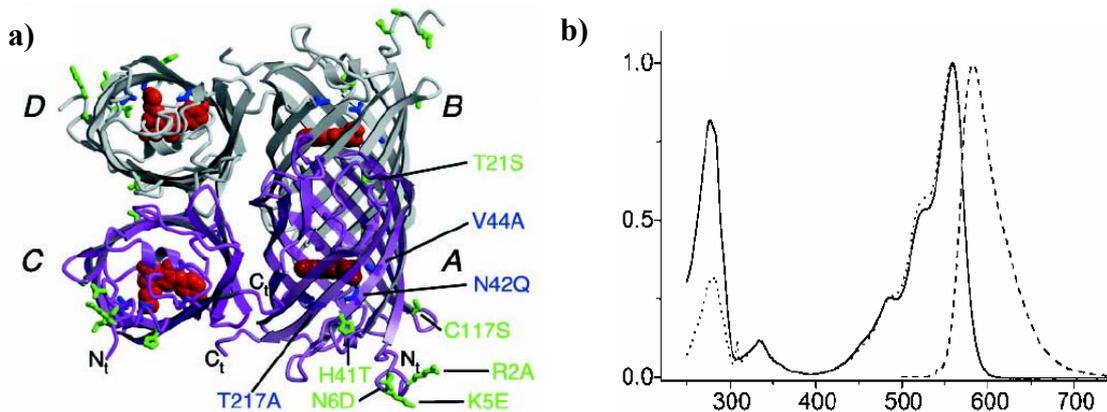


Figure 32: structure cristallographique de la DsRed (a), et ses spectres d'absorption et d'émission (b) [Campbell 2002].

Afin d'utiliser la DsRed comme marqueur biologique, des modifications génétiques ont été effectuées, et un mutant monomérique de la DsRed a pu être obtenu [Campbell 2002]. Si cette protéine monomérique mature plus rapidement, soit en moins d'une heure, elle est caractérisée par un rendement de fluorescence très affaibli puisqu'il n'atteint plus que 25%.

A ce jour, la DsRed a été détectée au niveau de la molécule unique, seulement *in vitro*. Elle ne constitue pas aujourd'hui un marqueur biologique idéal, mais reste un grand espoir pour son utilisation *in vivo* dans la détection de molécule unique.

C. Nanocristaux semi-conducteurs

Un nouveau type de marqueurs biologiques est apparu ces dernières années, ce sont les nanoparticules de semi conducteur. Celles composées de CdSe, notamment, émettent dans le visible. Ces nanoparticules tirent leurs propriétés de leur taille nanoscopique. Leurs caractéristiques spectrales peuvent ainsi être ajustées en modifiant leurs dimensions. Les applications de ces nanocristaux sont très larges.

1. Principe et caractéristiques

Un cristal semi-conducteur voit ses propriétés physiques radicalement modifiées lorsque ses dimensions sont réduites à quelques nanomètres. En effet, si un semi-conducteur de taille macroscopique présente un spectre d'énergie continu, un cristal semi-conducteur sphérique de taille nanométrique est caractérisé par des niveaux discrets d'énergie.

Sous l'action de la lumière est créée une paire électron-trou qui interagit pour former un exciton. L'énergie de l'exciton fait intervenir l'énergie cinétique, le potentiel de confinement supposé constant à l'intérieur de la particule et infini à l'extérieur, et un terme d'interaction coulombienne entre l'électron et le trou. Lorsque les cristaux de semi-conducteur ont une taille inférieure au diamètre de Bohr (11,2 nm pour le CdSe), l'exciton est dans un régime de confinement fort, i.e. le terme d'interaction coulombienne est négligeable devant les autres termes. Les niveaux d'énergie de l'électron et du trou sont alors ceux d'une particule libre enfermée dans une boîte quantique sphérique. Dans cette approximation, l'écart d'énergie entre le niveau fondamental et les niveaux excités augmente de façon inversement proportionnelle à la dimension de la particule [Brus 1984]. L'exciton a alors des niveaux d'énergie discrets et il peut être assimilé à une pseudo molécule, d'où son appellation de quantum dot ou « point quantique ».

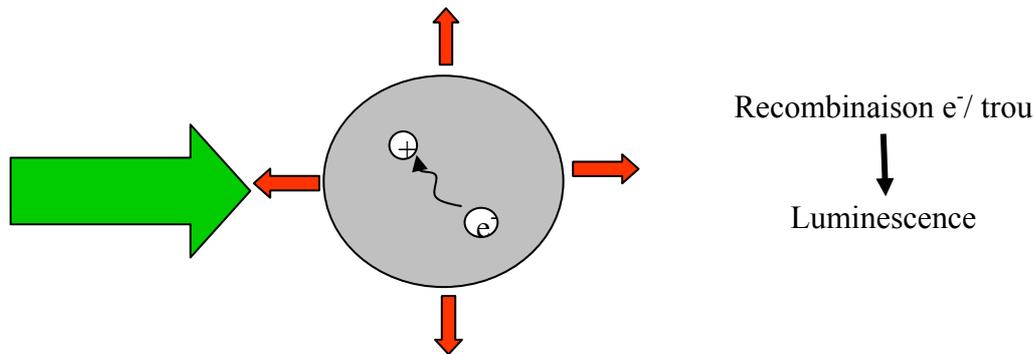


Figure 33: luminescence d'une nanoparticule semiconductrice

A température ambiante, un photon d'énergie supérieure à l'énergie de gap du semi-conducteur crée un exciton qui est porté ainsi à un niveau excité supérieur. De là, il relaxe non radiativement par couplage intermoléculaire vers le premier état excité. Il y a ensuite recombinaison de l'électron et du trou, ce qui génère un photon par luminescence. Ceci explique le décalage de Stokes entre ces deux spectres, et l'étalement du pic d'émission, de largeur environ égale à 30 nm, comparée au spectre d'absorption qui est très large.

En fait, un modèle plus sophistiqué est nécessaire pour interpréter la durée de transition radiative égale à 20 ns, alors que la durée attendue pour la recombinaison de l'exciton n'est que de quelques nanosecondes.

La durée de vie de la transition radiative d'un quantum dot étant supérieure à celle des fluorophores, une sélection temporelle de la luminescence a été mise en œuvre grâce à une détection déclenchée dans le temps. Elle a permis de visualiser les nanoparticules avec un abaissement significatif du fond [Dahan 2001].

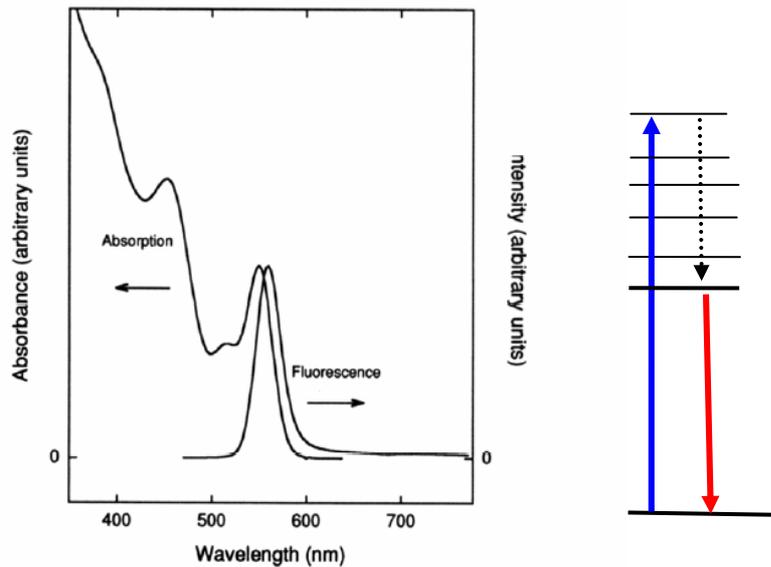


Figure 34: (a) spectre d'absorption et d'émission d'un cristal de CdSe de 3.5 nm [Murray 1993].
 (b) Modèle des niveaux d'énergie mis en jeu dans la luminescence des quantum dot.

Pour tirer profit des propriétés remarquables des quantum dots, il s'est avéré crucial de pouvoir synthétiser des particules parfaitement monodispersés tant du point de vue de leur taille, que de leur forme et de leur état de surface. En 1993, le groupe de Bawendi a mis au point une technique de synthèse réalisée dans un solvant organique qui remplit ses conditions, la dispersion en taille de leurs échantillons étant notamment inférieure à 5%. [Murray 1993].

Cependant, le rendement quantique de luminescence de ces échantillons ne dépasse pas 10%. La faiblesse de ce rendement est due à un état de surface mal contrôlé. Afin de préserver le confinement de l'exciton à l'intérieur du nanocristal, celui-ci est enrobé d'un matériau dont l'énergie de gap est supérieure à celle du CdSe [Hines 1996]. Il s'agit généralement de ZnS, dont le paramètre de maille est voisin de celui du CdSe. La passivation des quantum dots s'avère optimale pour une épaisseur de ZnS comprise entre une et deux couches atomiques, le rendement quantique atteint alors 50% [Dabbousi 1997]. Le ZnS n'ayant pas une maille cristalline exactement identique à celle du CdSe, l'ajout d'un plus grand nombre de couches conduit à la formation de défauts dans cet enrobage de ZnS qui ouvrent de nouvelles voies non radiatives, et contribuent à l'affaiblissement du rendement quantique de la particule.

Les nanoparticules ainsi synthétisées comprennent un cœur cristallin de CdSe de 2 à 6 nm de diamètre et une couche de ZnS d'environ 0.5 nm d'épaisseur, sur laquelle viennent s'adsorber les molécules organiques, résidus de la milieu réactionnel. L'adsorption de ces molécules, appelées de façon abrégée TOPO, rend les nanocristaux parfaitement solubles et stables dans des solvants organiques.

Les principaux attraits des quantum dots, en tant que marqueurs biologiques, résident dans leur relativement grande résistance au photoblanchiment, leurs rendements quantiques élevés, et des sections efficaces comparables à celles de bons fluorophores. Leur spectre d'absorption est très large contrairement à leur spectre d'émission ; qui est inchangé quelque soit la longueur d'onde d'excitation à l'intérieur de la bande d'absorption. Les quantum dots permettent ainsi un marquage multicolore et simultané de différentes espèces contenues dans des cellules, avec une seule longueur d'onde d'excitation employée.

L'étape préalable à l'utilisation de ces particules semi conductrices comme marqueur biologique est donc de les rendre biofonctionnelles.

2. Fonctionnalisation

Ce nouvel emploi des nanocristaux requiert tout d'abord leurs solubilisation dans l'eau, voire dans un milieu salin. Ils doivent aussi présenter une adsorption non spécifique réduite, ainsi que des propriétés optiques stables au cours du temps. Plusieurs stratégies ont alors été envisagées [Chan 2002].

La première a consisté à établir une liaison thiol entre les atomes de zinc de la couche extérieure et l'acide mercaptoacétique [Chan 1998]. Les nanocristaux sont alors entourés de molécules dont les extrémités sont des groupement carboxyliques, qui assurent à la fois la dispersion des particules grâce aux interactions répulsives des ions carboxylates et la conjugaison avec des biomolécules. Cependant, la dispersion n'est réalisée que pour des pH faiblement acides voire basiques, et pour un nombre faible de liaisons afin de conserver le maximum d'ions carboxylates. Cette méthode de fonctionnalisation est aisée à mettre en œuvre, mais les particules formées se révèlent peu stables.

Une deuxième approche a consisté à remplacer les molécules de TOPO par des silanes de formules $\text{Si}(\text{OH})_3(\text{SH})$ [Bruchez 1998, Gerion 2001]. Ces silanes forment à la surface de la particule une couche polymérisée que l'on peut faire croître avant d'ajouter dans une troisième couche des groupements phosphates empêchant l'agrégation mais aussi des groupements thiols ou amines, qui vont permettre la bioconjugaison. Ces particules ont un rendement quantique pouvant atteindre 20%. Si cette méthode permet la production de nanocristaux fonctionnels pour la biologie grâce à l'ajout d'une couche de 1 à 5 nm d'épaisseur, elle reste longue et difficile à mettre en œuvre, et n'empêche pas complètement l'adsorption non spécifique. De plus, le contact de l'échantillon avec du silicium extérieur, comme celui présent dans le verre, déstabilise la couche de polymère.

Une autre stratégie a consisté à encapsuler les particules dans un mélange de polymères, connu pour former des micelles de structure proche de celle des lipoprotéines et de diamètre intérieur de l'ordre de 3 nm [Dubertret 2002]. Ces particules ont à leur surface un épais tapis de n-poly(éthylène glycol) phosphatidyléthanolamine (PEG-PE) qui s'adsorbent peu aux biomolécules, et qui peut être remplacé en partie par une forme de PEG-PE possédant un groupe amine. Ces nanocristaux fonctionnalisés mesurent entre 10 et 15 nm de diamètre, et leur rendement quantique est supérieur à 20% en milieu aqueux. Ils semblent stables puisqu'ils restent non agrégés durant plusieurs mois même en milieu salin.

Il est aujourd'hui possible d'acheter des quantum dots enrobés de polymères couplés à des streptavidines, qui possèdent chacune quatre sites d'affinité pour la protéine biotine, ou à des anticorps secondaires (Figure 35). Ces nano semi-conducteurs permettent des marquages relativement spécifiques et efficaces, notamment des protéines membranaires [Wu 2003].

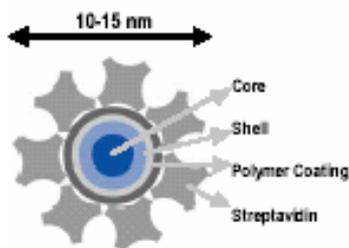


Figure 35: quantum dot fonctionnalisé (commercialisé par Quantum Dot Corporation)

3. Inconvénients

Les nanocristaux semi-conducteurs sont aujourd'hui les marqueurs les plus performants qui existent du point de vue de leur résistance au photoblanchiment. Cependant, ils présentent quelques inconvénients.

Leur taille d'une quinzaine de nanomètres ne peut pas être négligée dans certaines applications. De plus, les nanocristaux semi-conducteurs clignotent de façon très importante (Figure 36) [Nirmal 1996], ce qui rend plus délicat le suivi de biomolécules, mais aussi l'utilisation du signal émis pour suivre des processus dépendants du temps.

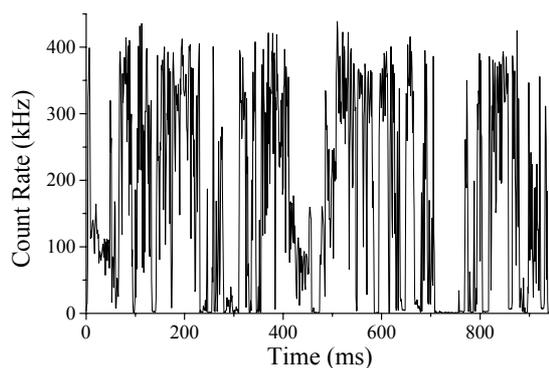


Figure 36: trace temporelle de l'émission par un nanocristal semi-conducteur [Nirmal 1996]

Les caractéristiques photophysiques des marqueurs présentés précédemment sont rassemblées dans le Tableau 2.

Fluorophore	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	η (eau)	Durée de vie (ns)	I_s (kW.cm ⁻²)	$n_{\text{Fluo } \infty}$ (kcoups.ms ⁻¹)	N_{max} (10 ⁶ photons)
Cy3	532	568	0.14	~1			
Cy5	630	670	0.18	~1	2.2±1	2.3±0.3	0.67±0.11
eGFP	488	512	0.6	3.2	13±3	2.9±0.2	0.14±0.05
eYFP	514	527	0.6	3.7	9±2	3.1±0.3	0.14±0.05
DsRed	532	582	0.7	2.8	~50	18±2	~0.2
Qdot585	<560	585	0.2	~20	~50	~60	~100

Tableau 2 : caractéristiques photophysiques de plusieurs fluoreophores ou protéines autofluorescentes mesurées au cours des dernières années [Schmidt, Lounis, Chan 2002]

IV. Premières applications à la biologie, de la détection de molécules fluorescentes uniques

Dès que l'observation de molécules individuelles, en microscopie de fluorescence, a pu être réalisée, à température ambiante [Nie 1994], plusieurs équipes s'en sont emparées pour l'appliquer à des systèmes biologiques. Les expériences ont porté exclusivement sur des systèmes *in vitro* jusqu'en 2000.

Dans cette partie, nous allons présenter les premières expériences de molécules uniques réalisées en biologie. Elles ont concerné une grande variété de systèmes biologiques, et différents types de grandeurs mesurées. Ces premiers essais nous intéressent d'autant plus, qu'ils ont permis d'établir la validité de cette technique pour la mesure de différentes caractéristiques.

Cette méthode permet une localisation spatiale des molécules fluorescentes, d'où son application dans des problèmes de diffusion. Elle a aussi été utilisée pour suivre des réactions enzymatiques ainsi que des modifications de conformation de protéines. Enfin, des expériences *in vivo* ont pu être réalisées, offrant des perspectives nouvelles à cette technique.

A. Observation de mouvements diffusifs

Les premiers suivis de protéines fluorescentes ont été réalisés sur des gels de polyacrylamide formant des pores d'une dizaine de nanomètre dans lesquels des fluorophores (Nile Red), puis des anticorps, fusionnés avec des fluorophores Cy5, ont été insérés [Dickson 1996]. Cette expérience a prouvé la possibilité d'utiliser de tels gels pour immobiliser des biomolécules, et observer les fluorophores couplés.

A la même époque, le mouvement latéral de lipides, dans une bicouche lipidique artificielle, a pu être enregistré [Schmidt 1995, 1996]. Les lipides, fusionnés au fluorophore tétraméthyl rhodamine TMR, ont été détectés avec un rapport signal sur bruit bien supérieur à 10 ; ils ont ainsi été localisés avec une précision de 30nm. Il a été possible de suivre ces lipides sur plusieurs centaines de nanomètres, à des intervalles de temps de 10 ms. Les constantes de diffusion, des lipides, mesurées en molécules uniques sont en bon accord avec celle obtenues en FRAP. La détection de molécules individuelles fluorescentes fournit donc une mesure correcte des coefficients de diffusion. De plus, elle a mis en évidence les hétérogénéités de la membrane artificielle.

Les groupes étudiant les moteurs moléculaires ont, dès 1995, mis en pratique cette nouvelle méthode expérimentale. Elle a permis de mesurer la vitesse de glissement d'un filament d'actine, marquée par de la TMR, sur des moteurs moléculaires, fixés sur des lamelles de verre [Sase 1995]. La détection en molécule unique de la kinésine a notamment confirmé la capacité de ce moteur à se déplacer sur des microtubules, immobilisés ici sur des lamelles [Vale 1996].

Plus récemment, la localisation de fluorophores, fusionnés à différents sites de la myosine V, a pu être réalisée avec une précision de 1.5 nm [Yildiz 2003]. Ces résultats ont été acquis grâce à une très forte augmentation du rapport signal sur bruit, qui provient de l'éclairage TIR, de l'accumulation des données pendant une durée relativement longue de 500 ms, et surtout à l'ajout d'antioxydants. Ce dispositif performant a permis de déterminer le pas élémentaire effectué par ce moteur, et de trancher entre les modèles proposés pour décrire l'avancée du moteur sur un filament d'actine.

B. Suivi de réactions enzymatiques

Dans tous les moteurs moléculaires, l'énergie nécessaire à leur déplacement est fournie par l'hydrolyse de l'ATP. La première réaction enzymatique à avoir été suivie est justement cette réaction d'hydrolyse de l'ATP effectuée par la myosine, qui permet à ce moteur de se déplacer le long de l'actine [Funatsu 1995]. Lorsque la réaction d'hydrolyse s'effectue, l'ATP se lie à la tête de la myosine et se détache une fois la réaction terminée. La tête de la myosine est fusionnée avec le fluorophore Cy5 tandis que l'ATP est marquée avec un Cy3. Un système d'illumination par réflexion interne, qui permet une excitation sélective des premières centaines de nanomètres, a été employé. En début de réaction, le Cy5 rentre dans la zone excitée et fluoresce. Expérimentalement, on enregistre la durée totale de fluorescence des ATP colocalisées avec les têtes de myosine. La réaction suit une loi exponentielle, caractérisée par un taux qui est de l'ordre de grandeur de celui mesuré en biochimie. Cette expérience valide ainsi l'utilisation de la technique de molécule unique pour l'étude de réactions enzymatiques.

Ces mesures de durées de liaisons de l'ATP avec un autre moteur moléculaire ont ensuite été couplées avec une mesure des forces exercées par ce moteur sur un filament d'actine [Ishima 1998]. L'ATP, marqué par un fluorophore, est imagé. Des billes de latex sont attachées aux extrémités d'un filament d'actine et placées dans deux pièges optiques. De cette façon, elles maintiennent le filament d'actine à la surface de la lamelle. De plus, leur

déplacement, par rapport aux centres des pièges optiques, permet d'accéder à la force exercée par le moteur sur l'actine. Ainsi est-il apparu que la force n'était pas exercée simultanément à la liaison de l'ATP mais qu'elle s'exerçait après plusieurs millisecondes. Cette expérience sophistiquée a donc mis en évidence une corrélation inattendue existant entre l'hydrolyse de l'ATP et l'avancée du moteur. Celui-ci acquiert une conformation relativement stable, qui constitue un stockage de l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP, avant de se déplacer.

Une autre étude majeure de réactions enzymatiques a mis en jeu des protéines autofluorescentes [Lu 1998]. La FAD est un coenzyme fluorescent dans sa forme oxydée, qui catalyse l'oxydation du cholestérol. Elle passe alors transitoirement sous sa forme réduite qui est non fluorescente. Les mesures ont été réalisées sur des molécules immobilisées dans un gel d'agarose dans lequel elles ne sont pas contraintes. De plus, il a été vérifié que les FAD, dans ce même système et en l'absence de substrat, ne clignotent pas. Finalement, sont enregistrés les durées de fluorescence et les temps d'extinction entre deux périodes d'émission, ce qui permet la construction des distributions de ces deux temps pour chaque enzyme FAD. Il en résulte que la réaction enzymatique est une réaction en plusieurs étapes. Sur l'une des étapes de cette réaction a pu être mis en évidence le désordre statique existant entre plusieurs FAD, expliqué en particulier par des dommages protéolytiques opérés sur l'enzyme. En fait, il existe aussi un désordre dynamique dans cette même étape. Peut-être est-il causé par les modifications de conformations adoptées par l'enzyme, auquel est associée la FAD, qui se produiraient sur des temps longs devant celui de la réaction de catalyse. Ainsi la réaction d'oxydation du cholestérol est-elle mieux connue du point de vue de son mécanisme réactionnel sur des durées de l'ordre de quelques millisecondes.

C. Variation de conformations de protéines

Les conformations adoptées par une protéine sont suivies grâce aux mesures obtenues en FRET (*fluorescence resonant energy transfer*) au niveau de la molécule individuelle, qui traduit l'interaction entre les moments dipolaires de transition des fluorophores, et donne donc des indications sur des distances de séparation de l'ordre de quelques nanomètres. Finalement, ces signaux apportent des indications sur la distance séparant deux biomolécules ou deux parties d'un même objet, à l'échelle de quelques nanomètres (Figure 37).

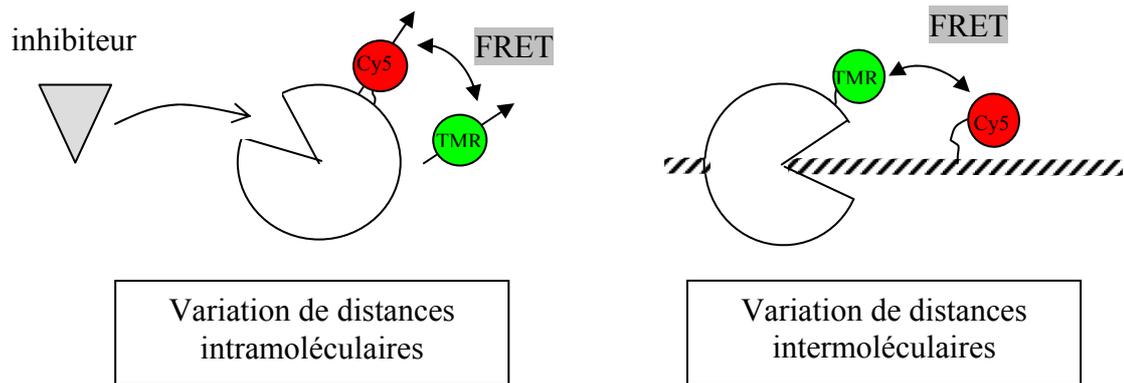


Figure 37: Principe des expériences de FRET réalisées par Ha et al [Ha 1999].

La nucléase *staphylococcal*, qui catalyse l'hydrolyse de l'ADN et de l'ARN en mononucléotides a ainsi été l'objet d'une étude portant sur la variation de distance intramoléculaires, la TMR et la Cy5 étant fixées à deux endroits distincts de la protéine [Ha 1999]. Il apparaît que la présence d'un inhibiteur allonge cette durée sur laquelle le signal FRET autocorrélé varie. Cette étude s'est aussi intéressée aux variations de distances entre l'enzyme et l'ADN, dont elle catalyse la dégradation. La mesure des durées, durant lesquelles un signal FRET entre les deux fluorophores apparaît, confirme que le mécanisme de clivage se produit continûment de l'extrémité 3' à l'extrémité 5' de l'ADN.

Le FRET est théoriquement un outil puissant pour déterminer des variations de distances, cependant son utilisation requiert certaines précautions. L'efficacité de transfert d'énergie par fluorescence dépend, en particulier, des orientations dipolaires des moments dipolaires de transitions. Il faut donc les évaluer avant de calculer les distances à partir du signal FRET.

Une expérience récente a mis en évidence des variations de distance de l'ordre de quelques Angstroms [Yang 2003]. En effet, le système observé est une réductase qui catalyse la réduction de la FAD, à laquelle elle est liée, par la NADH (p.16). La catalyse correspond à un échange d'électrons entre deux structures moléculaires, dont le taux est sensible aux variations de distance à l'échelle de l'Angstrom. Finalement, cet échange d'électrons se traduit par une modification de la durée de vie de fluorescence de la FAD. Ces expériences ont pu mettre en évidence les fluctuations dynamiques des distances séparant la réductase de la FAD de quelques dixièmes de millisecondes à plusieurs secondes, et remonter aux caractéristiques du potentiel d'interaction entre la réductase et la FAD. Cependant, si cette expérience permet de remonter à des variations de distances de l'ordre de l'Angstrom, c'est

qu'elle met en jeu un phénomène particulier, à savoir l'échange d'électrons, qui n'existe pas de façon courante entre deux fluorophores, elle n'est donc pas généralisable.

D. Premières expériences de molécules uniques *in vivo*

Il est difficile de visualiser des systèmes vivants. D'une part, les cellules autofluorescent, ce qui augmente notablement le bruit des images. D'autre part, il s'avère impossible d'avoir recours à des anti-oxydants pour réduire le taux de photoblanchiment, ces anti-oxydants étant généralement toxiques pour les cellules. Les premières publications rapportant des expériences de molécule unique réalisées sur des cellules vivantes sont parues au début de l'année 2000.

L'une de ces expériences a consisté à localiser en trois dimensions, avec une résolution de l'ordre de 40 nm et un rapport signal sur bruit de douze, des canaux voltages dépendants présents à la surface de cellules de Jurkat [Schütz 2000a]. Ces canaux ont été marqués à l'aide d'un peptide inhibiteur, fusionné avec Cy5, qui a une grande affinité pour ces canaux. On a pu ainsi mesurer la densité surfacique de ces canaux, sur ces cellules, grâce à la détection de molécules uniques. La valeur trouvée semble en bon accord avec celle mesurée en biochimie. Ce même groupe a étudié les diffusions de deux types de lipides fusionnés avec un fluorophore Cy5, et mis en évidence l'existence de microdomaines dans les membranes cellulaires [Schütz 2000b].

Une autre expérience a porté sur les récepteurs à EGF présents dans des lignées cellulaires de carcinomes humains, éclairées en ondes évanescentes [Sako 2000]. Les récepteurs sont repérés grâce à des anticorps, soit par leur agoniste, les deux étant fusionnés avec des Cy5. Ces mesures ont mis en évidence que la présence du ligand induisait, après plus de 30s, une modification de la distribution des intensités traduisant une augmentation du nombre de récepteurs dimérisés. De plus, les récepteurs présentant une intensité plus élevée ont été trouvés colocalisés avec un marquage par anticorps caractérisant la phosphorylation des récepteurs. En conclusion, ces expériences de molécules uniques ont confirmé des hypothèses biologiques et ont initié un suivi de la transduction du signal. Cependant, il est à noter que les mesures considérées sont les intensités des fluorophores marquant les récepteurs de la surface apicale. Or, compte tenu du mode d'illumination, la mesure des intensités collectées n'est plus une mesure fiable, et il est peut-être risqué d'affirmer la possibilité d'observer davantage que l'agrégation des récepteurs.

Plusieurs expériences ont prouvé que la détection de molécules uniques de protéines fluorescentes, telles que la YFP, était réalisable *in vivo* [Harms 2001a, 2001b]. Ainsi des lipides marqués des YFP purifiées ont été suivis lors de leur diffusion membranaire. Puis, des protéines membranaires, fusionnées par génie génétique à une YFP, ont été exprimées et détectées à la surface de cellules vivantes. Il est ainsi apparu leur tendance à s'agréger.

De plus, la détection de molécules uniques a permis de mettre en évidence les différents mouvements d'un virus (AAV) le conduisant à entrer dans les cellules, sa diffusion libre dans le cytoplasme et le noyau, mais aussi son mouvement dirigé attribué à sa liaison avec un moteur moléculaire [Seisenberger 2001].

Ces données expérimentales prouvent la validité de l'observation en molécules uniques, ses capacités novatrices. Elles témoignent aussi de la difficulté de sa réalisation, avec en particulier des efforts portés sur le système optique afin d'éliminer au maximum les sources de fond, mais aussi des essais visant à allonger la vie des fluorophores grâce à l'utilisation d'antioxydants.

V. Notre réalisation expérimentale de détection de molécules uniques

Nos expériences portent à la fois sur le suivi de protéines membranaires à la surface de neurones vivants, et sur l'observation *in vitro* de protéines fluorescentes en vue d'une réalisation *in vivo*. Nous avons donc employé un microscope d'épi-fluorescence.

Nous présenterons tout d'abord le montage expérimental employé, puis le mode de préparation des échantillons. Enfin, nous détaillerons la caractérisation d'un signal émis par une molécule unique, ainsi que les essais préliminaires qui ont été réalisés concernant la comparaison des propriétés photophysiques de deux fluorophores et l'utilisation de différents anti-oxydants.

A. Montage et caractéristiques

Le microscope inversé (Olympus IX70) est muni d'un objectif plan apo à immersion dans l'huile, de grandissement $\times 100$, et d'ouverture numérique O.N.=1,4. La lentille de défocalisation, placée à l'entrée du microscope, permet d'illuminer une zone de 20 μm de diamètre. Notre montage permet l'illumination de l'échantillon à l'aide de deux lasers. Le faisceau issu du laser Hélium Néon est réglé grâce aux miroirs M1 et M0, avant d'être dirigé sur l'échantillon grâce au miroir galvanométrique MG achromatique. Le faisceau issu du laser argon est aligné sur le faisceau HeNe grâce aux miroirs M2 et M3. La sélection de la longueur d'onde utilisée, provenant du laser Argon, a pu être réalisée grâce à la dispersion du faisceau à travers un prisme et à l'utilisation d'un diaphragme.

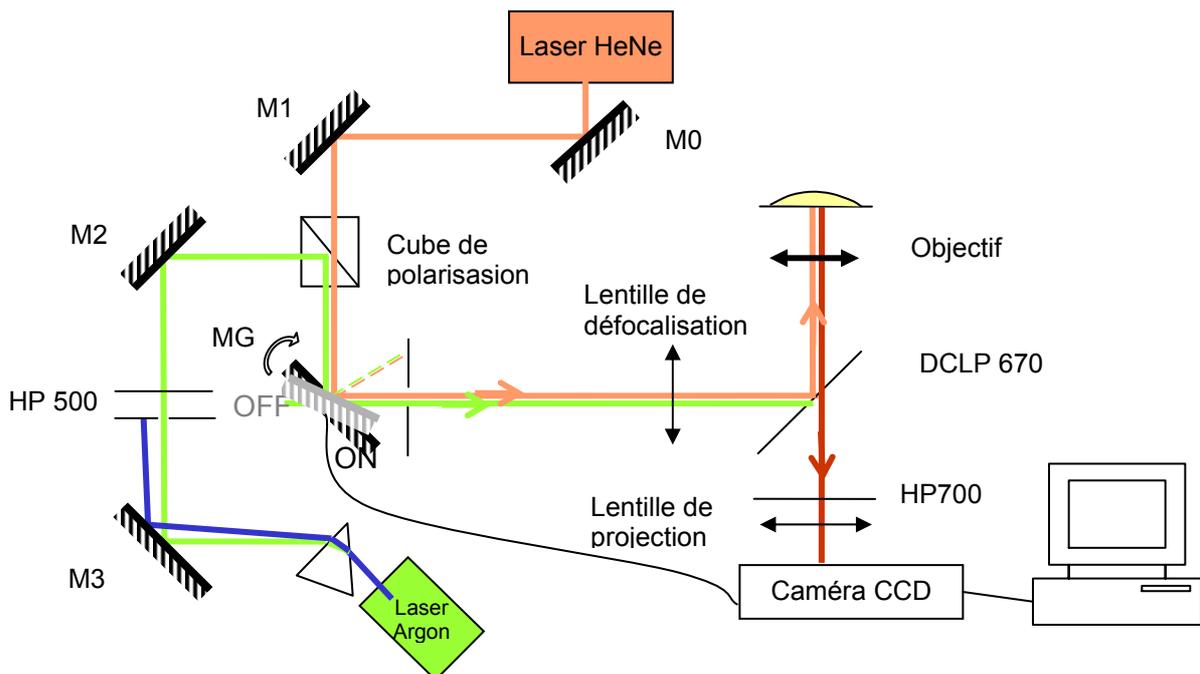


Figure 38: Montage expérimental utilisé

L'obturateur protégeant la matrice des détecteurs des caméras a été supprimé et remplacé par un miroir galvanométrique achromatique. L'orientation du miroir galvanométrique est commandée par la caméra, ainsi l'échantillon est illuminé uniquement durant l'acquisition de l'image. De plus, le miroir galvanométrique dirige le faisceau en seulement quelques dizaines de microsecondes, permettant ainsi d'illuminer les échantillons durant plusieurs millisecondes.

Nous avons utilisé essentiellement une caméra intensifiée (Pentamax, Roper Scientific) dont le rendement quantique est d'environ 40%, puis, pour les expériences décrites dans le chapitre 2 IV, une caméra illuminée par l'arrière (Micromax, Roper Scientific) de rendement quantique d'environ 70%. Ces caméras sont à transfert de charge, et elles sont refroidies à $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lors de l'enregistrement *in vivo*, qui requiert une durée d'acquisition de 30 ms, les images sont enregistrées de façon continue. Dans ce cas, le miroir galvanométrique n'est pas utile.

La détection des fluorophores Cy5 nécessite un jeu de filtres sélectifs (DCLP 650/ HQ 675/50, Chroma Technology), qui permettent de recueillir le maximum de signal provenant du fluorophore (

Figure 39).

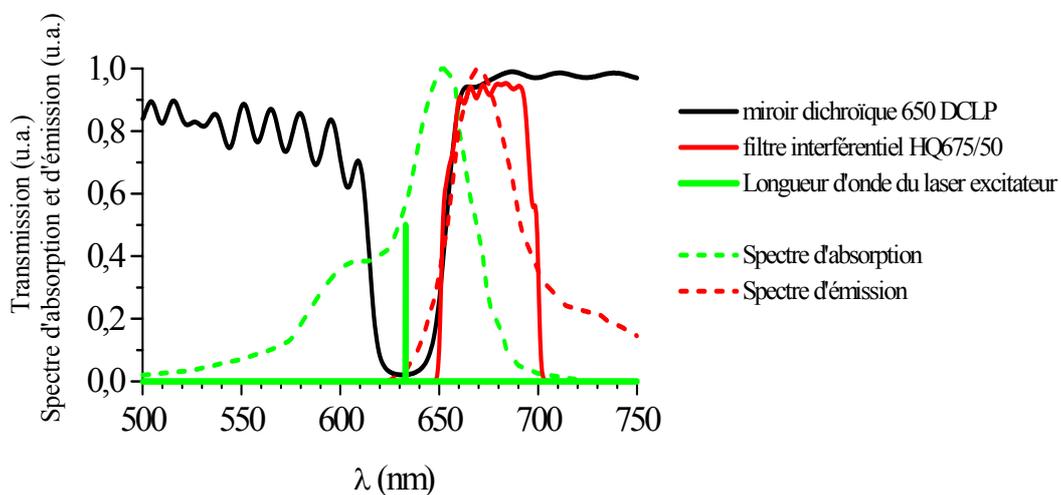


Figure 39 : Jeu de filtres utilisés pour le Cy5 accompagné des spectres d'absorption et d'émission du fluorophore

Nous pouvons évaluer le rendement de détection de notre dispositif optique grâce à la connaissance du rendement quantique de la caméra η_{quant} , du facteur de transmission du

dispositif T_{opt} , et de la fraction d'angle solide $\frac{\delta\Omega}{\Omega}$ collectée par l'objectif. Le rendement de détection est donc égal à :

$$\eta = \frac{\delta\Omega}{\Omega} \eta_{quant} T_{opt} \quad \text{Équation 11}$$

Pour un objectif d'ouverture numérique égal à 1.4, on a $\delta\Omega/\Omega \approx 0.3$. Le facteur de transmission pour la détection d'une molécule de Cy5 est environ égale à $T_{opt} \approx 0.5$. Finalement le rendement de détection obtenu avec la caméra pentamax est de l'ordre de 6%, et celui obtenu avec la caméra micromax est d'environ 10%.

B. Les échantillons

1. Marquage des anticorps

Les anticorps sont fusionnés aux fluorophores Cy5 (Amersham Biosciences), munis d'un groupement d'acide succinimidyle.

Dans un tube contenant un barreau aimanté, et placé sur un agitateur magnétique, à 20°C, nous versons la solution de protéines de volume $V_{PROTEINE}$, puis le tampon de volume $V_{PROTEINE}/10$ (1M sodium carbonate, pH=9.3), et enfin la solution de fluorophores V_{DYE} , les fluorophores ayant été préalablement dilués dans 100 μ L de PBS. Les volumes respectifs de fluorophores et d'anticorps sont déterminés à partir des indications données par le producteur (Tableau 3). Un ajustement peut être effectué à partir du résultat d'un marquage test, réalisé au préalable sur de la BSA. L'efficacité du marquage dépend notamment de la concentration des protéines que l'on souhaite marquer. Le mélange est laissé, à l'agitation dans l'obscurité, pendant environ 30 min.

	IgG	Cy5 ou 3	BSA	D/P
MW (g.mol^{-1})	145000		66000	
Amersham	1 mg ie $6.9 \cdot 10^{-9}$ mol	1 tube dilué dans 100 μ L de PBS		4 à 12 si $C_{protéine} > 1 \text{ mg.mL}^{-1}$
	$6.9 \cdot 10^{-9}$ mol ie 1 mg	1/5 tube ie 20 μ L	$6.9 \cdot 10^{-9}$ mol ie 0.46 mg	0.8 à 2.4 si $C_{protéine} \sim 0.5 \text{ mg.mL}^{-1}$, D/P~1

Tableau 3: indications d'Amersham Biosciences pour le marquage de protéines avec des Cy5 ou Cy3

Nous versons ensuite jusqu'à 200 μL de ce mélange en haut d'une colonne rincée (colonnes d'exclusion Bio-Spin P30 de BioRad) dont le tampon PBS s'est écoulé, et qui est posée sur un tube collecteur. Dès que le mélange a été absorbé par le gel, nous ajoutons 500 μL de PBS. Deux bandes apparaissent et nous recueillons la première fraction contenant les protéines fusionnées, puis la seconde contenant les fluorophores libres.

Nous mesurons ensuite au spectrophotomètre les absorbances à 288 nm et à 630 nm, longueur d'onde du maximum d'absorption du Cy5, pour en déduire les concentrations en anticorps et en fluorophores, et finalement le degré de marquage.

Le degré de marquage correspond à la moyenne du nombre de fluorophores fusionnés par protéines. En considérant que le marquage se produit de façon aléatoire, la proportion d'anticorps marqués par 1 ou plus fluorophore peut se calculer à partir de la distribution poissonnienne dont la valeur moyenne est égale au degré de marquage. Nous avons mesuré un taux de marquage de 0.6 (respectivement 1), ce qui correspond à 55% (37%) d'anticorps non fusionnés, 33% (37%) fusionnés à un Cy5, et 10% (18%) à deux Cy5. Notre marquage, dont le taux est inférieur ou égal à 1, nous fournit donc une majorité d'anticorps marqués qui ne sont fusionnés qu'à un seul fluorophore.

2. Nettoyage des lamelles

Au cours des expériences menées sur des neurones en culture, il n'est pas indispensable de procéder à un nettoyage rigoureux de la surface des lamelles, puisque nous observons les protéines se déplaçant sur la membrane de neurones, et non à la surface de la lamelle. Celles-ci sont donc choisies et traitées uniquement dans le but de permettre aux neurones de se développer.

En revanche, les lamelles (Fisherbrand) utilisées pour observer les multimères *in vitro* subissent un lavage rigoureux. Rangées sur un portoir en céramique, elles sont plongées, pendant 15 min, dans du détergent RBS dilué à 2% dans de l'eau ultrapure, et porté aux environs de 55°C. Elles sont ensuite rincées dans un bécher d'eau ultrapure et agité par un barreau magnétique durant 2 min, l'opération est répétée trois fois. Puis elles sont plongées dans une solution 1 :1 de méthanol de qualité spectrophotométrique et d'eau ultrapure et, saturée en hydroxyde de potassium, pendant 10 min au moins, avant d'être rincées comme précédemment. Elles sont alors plongées dans de l'acide sulfurique pur pendant 10 min, et rincées à nouveau. Enfin, les lamelles sont rincées une à une avec du méthanol de qualité

spectrophotométrique, séchées sous un flux d'argon ultrapur, puis stockées sur du papier optique dans des boîtes de Petri. Une autre méthode de nettoyage consiste à introduire les lamelles quelques secondes dans un bain d'acide sulfochromique, avant d'être rincées et séchées par un flux de gaz inerte ultrapur.

3. Préparation des échantillons

Afin d'immobiliser les fluorophores ou protéines fluorescentes lors d'expériences *in vitro*, on utilise soit des gels d'acrylamide, soit des gels d'agarose, dont les pores mesurent respectivement quelques nanomètres, et une centaine de nanomètres. Ces gels sont préparés à l'aide d'eau ultrapure dont on retire les cycles aromatiques restants, qui constituent d'éventuelles sources de fond, en ajoutant du charbon activé pendant plusieurs heures. Cette eau est filtrée juste avant son utilisation.

La dimension des pores d'un gel d'acrylamide diminue lorsque le pourcentage en masse du mélange acrylamide/ bis acrylamide (T%) par rapport au reste de la préparation croît, et elle est minimale pour une fraction en masse de bis acrylamide par rapport à l'ensemble acrylamide/bis acrylamide (C%), égale à 5%. Les gels d'acrylamide à T=15% sont obtenus en mélangeant 188 μL d'acrylamide/ bis acrylamide à C=3,3% (BioRad, rapport acrylamide/ bis acrylamide 29/1, stock 40%) avec 1% de catalyseur, soit 5 μL de Temed, avec 304 μL de solution contenant les fluorophores, et enfin avec 0.15% de l'initiateur de la réaction de polymérisation, soit 3.3% d'ammonium peroxodisulfate (Prolabo, solution stock 20%). Une goutte de 10 μL de gel est immédiatement versée entre les lamelles, la polymérisation étant quasi instantanée à l'ajout de l'initiateur.

Les gels d'agarose à 2% sont préparés en versant 100 mg d'agarose, à basse température de fusion, dans 5 mL d'eau ultrapure portée à 80°C, avec une concentration 1× de PBS, pendant environ 1h. L'agarose est répartie dans des tubes eppendorf et stockés à -20°C. Avant d'être utilisé, l'agarose est porté à 70°C, puis refroidi jusqu'à 37°C. La solution de protéines peut alors être incorporée dans une proportion maximale de 1/20. Une goutte de 10 μL d'agarose est versée sur une lamelle nettoyée, et recouverte par une seconde lamelle propre sur laquelle on presse, l'agarose forme alors une couche mince.

Au cours de nos expériences sur cellules vivantes, quelques modifications ont dû être apportées aux protocoles classiquement employés. Nous avons, par exemple, supprimé l'usage d'un milieu de culture contenant un indicateur coloré de pH, appelé rouge de phénol, et nous avons dû cesser d'utiliser du sérum de veau ou de cheval. Par ailleurs, la transfection des cellules, effectuée grâce à des molécules lipophiles qui enrobent l'ADN et lui permettent

ainsi de traverser la membrane, peut aussi produire des débris très fluorescents. C'est notamment le cas du Fugène, dont l'utilisation doit être suivie par un changement du milieu avant l'observation en molécule unique. En revanche, un autre agent de transfection, nommé Lipofectamine 2000, ne présente pas cet inconvénient.

C. Caractérisation du signal détecté

1. Détection du signal émis par un fluorophore individuel

a) Signature

L'émission d'un fluorophore individuel se caractérise par une extinction brutale (Figure 40). Nous nous sommes donc servis de cette signature pour sélectionner les signaux détectés avant l'analyse.

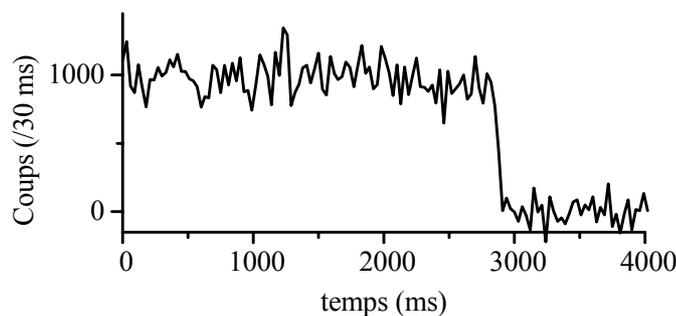


Figure 40: trace temporelle de l'émission d'un fluorophore (Cy5) unique

b) Diverses méthodes de localisation des molécules

Un effort particulier a été fourni concernant le traitement des images, afin d'accroître la précision sur la mesure de la position et du déplacement de la molécule suivie ; plusieurs méthodes de localisation sont employées. Une première méthode consiste à calculer la position de l'objet en pondérant la position par l'intensité de chaque pixel, les coordonnées sont alors celle du centre de masse de l'image. Cette méthode nécessite de fixer un seuil en deçà duquel les intensités sont rejetées afin qu'un fond important ne perturbe pas le calcul. Dans une seconde démarche, on procède à l'ajustement non-linéaire d'une fonction gaussienne sur le signal détecté [Schmidt 1995]. En effet, la fonction d'Airy présente très peu de différences avec la fonction gaussienne ; compte tenu du bruit et de la discrétisation de l'image, on peut donc assimiler fonction d'Airy et fonction gaussienne, plus aisée à manier

numériquement (Figure 41). Cette démarche ne s'applique qu'à la détection d'un point source, comme par exemple un fluorophore, mais pas à la détection d'une particule de dimension supérieure à la longueur d'onde. Une troisième méthode consiste à calculer la fonction de corrélation entre la matrice des intensités enregistrées et un masque qui reproduit la forme attendue du signal [Gelles 1988].

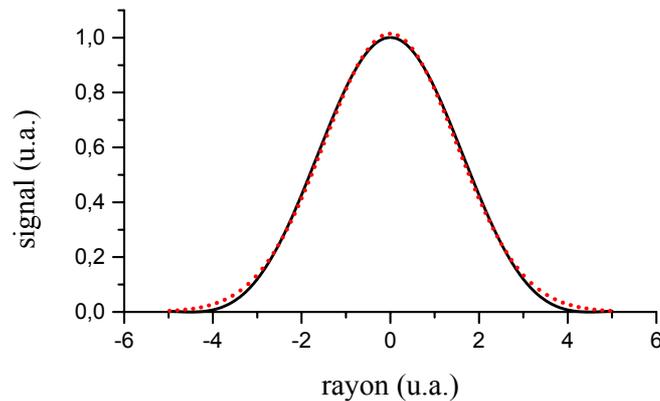


Figure 41: comparaison fonction d'Airy (-) et approximation gaussienne (...)

La comparaison de ces techniques réalisée à partir de simulations montre la supériorité de l'ajustement gaussien pour la détection de molécules uniques [Cheezum 2001]. En effet, lorsque l'on souhaite mesurer le déplacement effectué par une molécule entre deux images successives, avec une précision fixée, c'est l'analyse par ajustement gaussien qui permet d'y accéder avec la plus faible valeur du rapport signal sur bruit. De plus, cette précision est indépendante de la distance parcourue, de même que l'erreur systématique. Cependant, il apparaît que la précision dépend de façon très importante du rapport signal sur bruit, en particulier lorsque celui-ci est inférieur à 10. Quand ce rapport est inférieur à 4, l'ajustement gaussien lui-même ne suffit plus à calculer les déplacements avec une précision correcte.

De plus, la précision de pointé dépend de la taille des pixels de la CCD. Des simulations ont ainsi montré qu'elle était optimale pour des pixels ayant une dimension comparable à la largeur de la tache de diffraction [Thompson 2002]

c) Méthode employée

L'analyse des enregistrements vidéo est réalisée à l'aide d'un programme écrit sous MATLAB [Schmidt 1995]. Elle consiste tout d'abord à soustraire un fond que l'on suppose être assimilable à une fonction gaussienne de grande dimension. Puis, un masque gaussien,

dont la largeur initiale est fixée au voisinage de 370 nm, est appliqué à chaque image pour réaliser un ajustement non linéaire sur les pics d'émission des fluorophores. L'analyse autorise la détection de signaux dépassant suffisamment du bruit de fond selon un paramètre déterminé par l'utilisateur après des essais préalables sur des images avec fluorophores et sans. Les pics détectés sont ensuite sélectionnés à l'aide de critères tels que la largeur du pic, autorisée à varier entre 240 nm et 660 nm (Figure 42), et la hauteur maximale du signal. Les pics conservés sont employés par exemple pour calculer la distribution des intensités détectées par unité de temps, ou pour reconstruire les traces des molécules suivies, après avoir testé la probabilité que des pics détectés dans deux images successives puissent être connectés pour former la trace d'une molécule [Schmidt 1995]. Les traces sont arrêtées dès le premier ou le second clignotement pour le suivi de molécules ; en revanche, cette restriction est supprimée quand nous mesurons le nombre total de coups émis par fluorophore immobilisé.

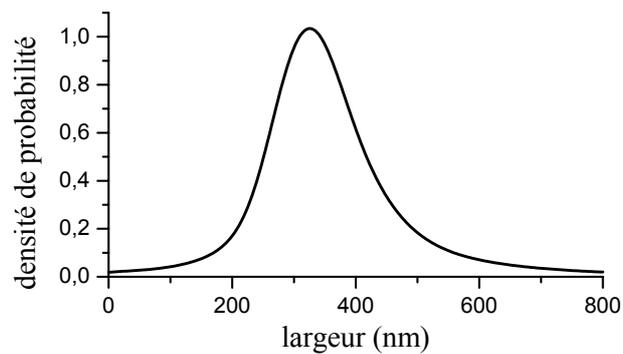


Figure 42 : distribution des largeurs des pics sélectionnés

Avec la caméra intensifiée, l'émission d'une Cy5, pendant 30 ms, a donné une moyenne de 600 coups détectés. Le rapport signal sur bruit obtenu, lors de la détection de Cy5 individuels, peut dépasser 100 *in vitro*, alors qu'il est de l'ordre de 20 *in vivo*. La distribution du nombre de coups détectés par pic est unimodale (Figure 43), cela confirme le caractère unique des fluorophores observés.

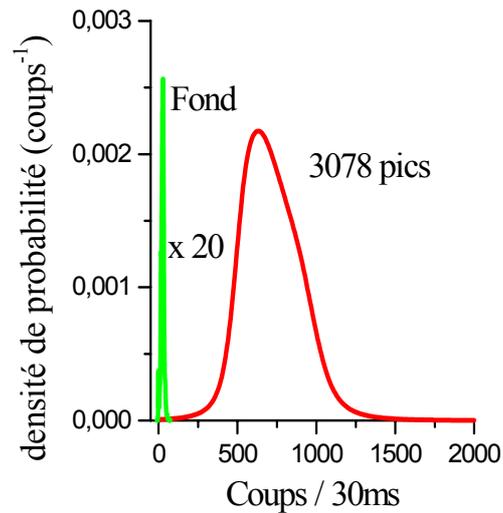


Figure 43: distribution des signaux détectés

2. Etude photophysique du Cy5

Nous souhaitons utiliser des fluorophores émettant au-delà de 550 nm pour marquer des récepteurs membranaires. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux propriétés photophysiques des Cy5 (Amersham Biosciences), que nous avons comparées à celles de l'Alexa 647 (Molecular Probes).

Les fluorophores ont été étalés sur des lamelles de verre et observés en molécule unique, excités à 633 nm et détectés à travers le même jeu de filtres.

Nous avons tout d'abord tracé le nombre de coups détectés pendant 10 ms en fonction de l'intensité d'excitation. Cette courbe de saturation nous permet d'accéder à l'intensité de saturation de chaque fluorophore.

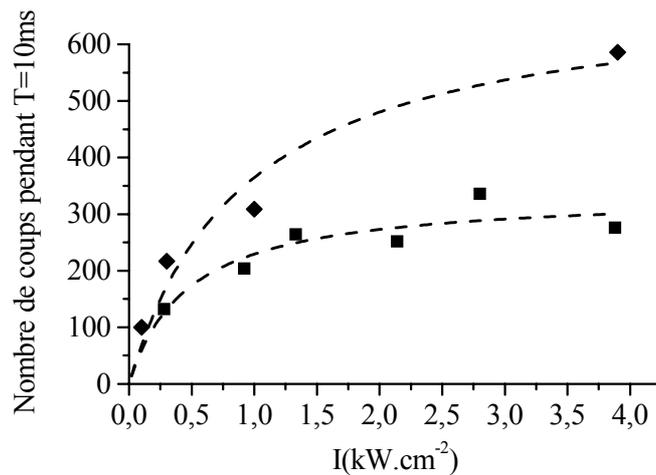


Figure 44: courbe de saturation de l'émission de Cy5 (♦) et Alexa 647(■), ajustée par la fonction $S(I) = A/(1 + I_s/I)$ avec $I_s = 0.9 \pm 0.4 \text{ kW.cm}^{-2}$ pour les Cy5, et $I_s = 0.5 \pm 0.2 \text{ kW.cm}^{-2}$ pour les Alexa 647

Nous avons ensuite tracé, pour plusieurs intensités d'excitation, le nombre de coups détecté en fonction du temps d'illumination. En tenant compte du photoblanchiment, ces courbes sont décrites par la fonction suivante [Harms 2001a] :

$$N(t) = N_0 \tau_{bl\infty} \left[1 - \exp\left(-t / \tau_{bl\infty} \left(1 + I_s/I\right)\right) \right] \quad \text{Équation 12}$$

$$\text{où } N_0 = \eta_{\text{dét}} n_{\text{Fluo}}$$

L'intensité de saturation ayant été déterminée précédemment, nous en déduisons le temps de photoblanchiment pour une intensité d'excitation infinie, soit l'inverse du taux de photoblanchiment, ainsi que le taux de fluorescence n_{Fluo} .

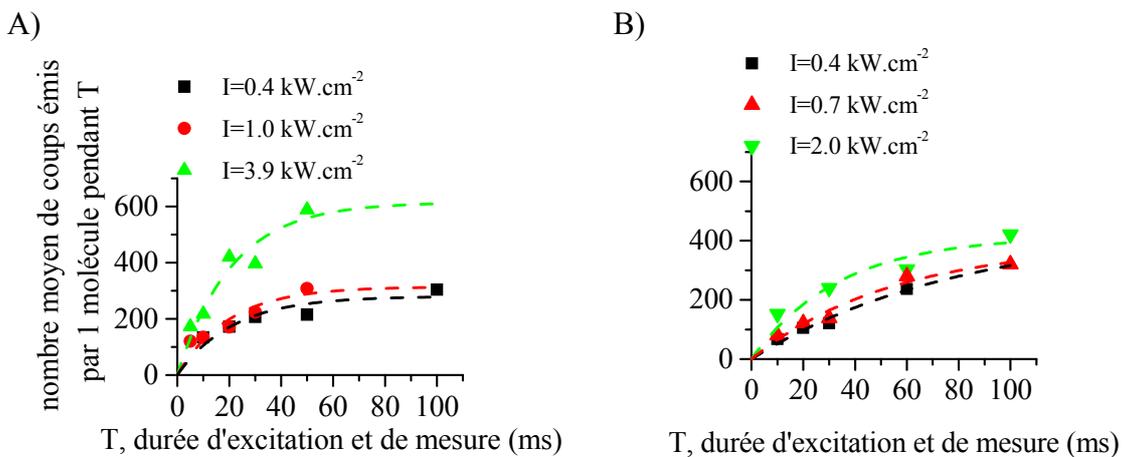


Figure 45: Graphe du nombre de coups émis, par le Cy5 (A) ou l'Alexa 647 (B), en fonction de la durée d'illumination T, ajusté par l'Équation 12.

L'alexa 647 ($\tau_{bl\infty} = 32 \pm 5 \text{ ms}$) a une durée infinie de photoblanchiment supérieure à celle des Cy5 ($\tau_{bl\infty} = 11 \pm 5 \text{ ms}$). En revanche, le taux d'émission et l'intensité de saturation des Cy5 ($N_0 = 4 \pm 3 \text{ coups.ms}^{-1}$, $I_s = 0.9 \pm 0.2 \text{ kW.cm}^{-2}$) sont supérieurs à ceux de l'alexa 647 ($N_0 = 0.5 \pm 0.2 \text{ coups.ms}^{-1}$, $I_s = 0.5 \pm 0.2 \text{ kW.cm}^{-2}$), les Cy5 peuvent donc être plus brillantes que les alexa 647. Nous avons, finalement, opté pour le fluorophore Cy5, dont l'utilisation nous assurait un rapport signal sur bruit acceptable, et donc une localisation précise des fluorophores.

Par ailleurs, les cyanines, que nous avons choisies pour marquer les protéines membranaires, sont susceptibles de traverser divers compartiments cellulaires à l'intérieur desquels le pH diffère. Nous avons alors regardé l'effet du pH sur le taux d'émission des cyanines. Les spectres de fluorescence de la Cy3, mesurés à différents pH, attestent de la grande stabilité de leurs taux d'émission, pour des pH variant entre 3 et 8 (Figure 46).

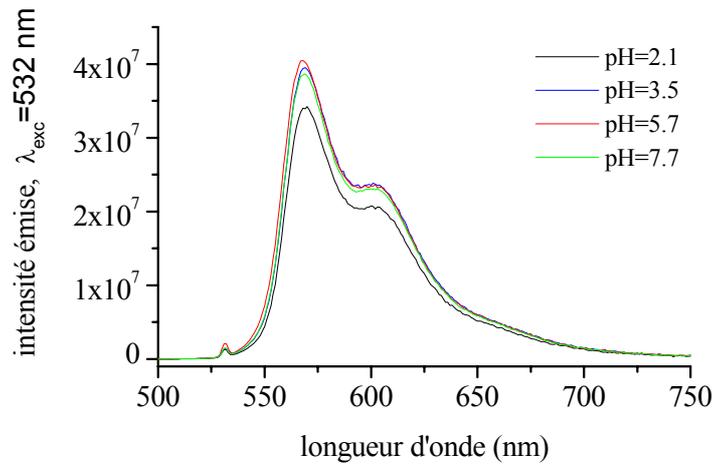
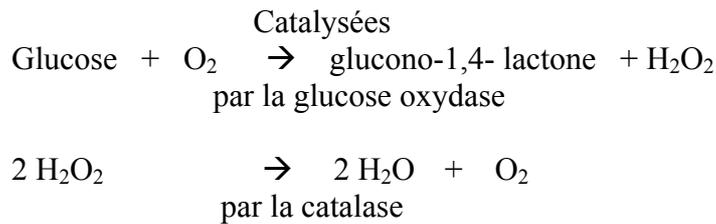


Figure 46: Spectre de fluorescence de cy3 à $\lambda_{exc}=532\text{nm}$ mesuré à différents pH

3. *Anti oxydants*

Les recettes d'anti oxydants [Harada 1990, Yasuda 1998, Ha 2001] contiennent à la fois du β mercapto éthanol et du glucose oxydase qui sont tous deux toxiques pour les cellules. Pour nos essais, nous avons utilisé séparément chacun de ces composés, et réduit les concentrations.

La glucose oxydase est employée généralement dans les proportions suivantes : 4,5 mg.mL⁻¹ de glucose, 216 μ g.mL⁻¹ de glucose oxydase, et 36 μ g.mL⁻¹ de catalase. Les réactions mises en jeu, sont :



Cependant, ce mélange, que nous noterons glucose oxydase, produit de l'eau oxygéné toxique pour les cellules. Nous avons donc employé cette recette en la diluant dix fois.

Un autre anti oxydant est le β mercapto éthanol (CH₂OHCH₂SH). Il a tendance à couper les ponts di sulfure ce qui le rend toxique pour les cellules. Nous l'avons donc utilisé à des concentrations égales à 3 10⁻⁴ M et 5 10⁻⁵ M, au lieu de 0.13 M, concentration préconisée.

Enfin, nous avons essayé d'utiliser le N-acétyl L-cystéine, noté NAC. Il s'agit d'un anti oxydant, connu notamment pour augmenter la viabilité des neurones [Mayer 1994]. Nous l'avons employé à la concentration de 0.5 mM.

Nous avons dilué des protéines BSA, fusionnées à des Cy5, dans du PBS 1X, en présence d'une de ces compositions d'antioxydants. Nous avons étalé ce mélange sur des lamelles de verre et observé les fluorophores sur le dispositif précédemment cité. Nous avons ainsi pu construire les histogrammes des longueurs de traces observées dans les différents cas (Figure 47). Ces graphes donnent accès au temps de photoblanchiment des molécules. Nous avons pu les ajuster par des fonctions exponentielles, avec une composante rapide représentant environ 90% des fluorophores et une composante lente représentant les 10% restant des fluorophores.

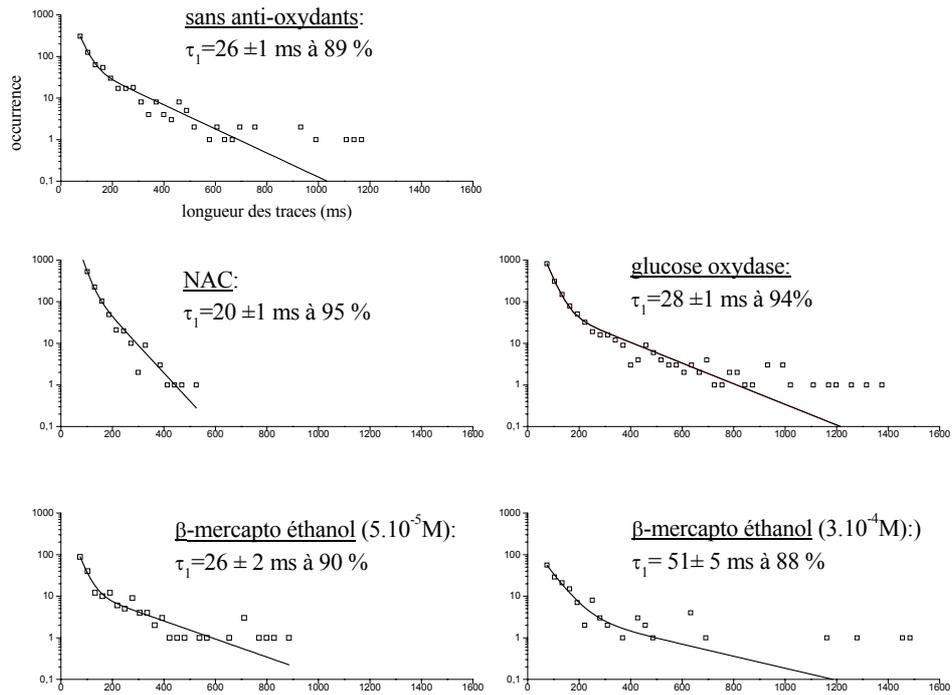


Figure 47: histogrammes de la longueur des traces mesurées en présence de divers anti oxydants

En conclusion, nous n'avons pas observé d'effets majeurs si ce n'est avec le β mercapto éthanol à la concentration de $3 \cdot 10^{-4}$ M, pour lequel la durée des traces est doublée. Cependant du fait de sa nocivité, le β mercapto éthanol est préférentiellement utilisé à des concentrations inférieures ou égales à 10^{-5} M. Finalement, compte tenu de la fragilité des neurones sur lesquels nous souhaitons effectuer nos mesures, nous avons préféré ne pas utiliser ce produit.

Références du chapitre 1

- Betzig E., Chichester R.J.; *Science* **262**, 1422 (1993).
- Billington N., Knight A. W. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal. Biochem.* **291**, 175-197 (2001).
- Blab G.A., Lommerse P.H.M., Cognet L., Harms G.S., Schmidt Th. ; Two-photon excitation action cross-sections of the autofluorescent proteins. *Chem. Phys. Lett.* **350**, 71-77 (2001).
- Block S.M., Blair D.F., Berg H.C. *Nature* **338**, 514 (1989).
- Borgdorff A., Choquet D.; Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* **417**, 649-652 (2002).
- Bouchareine P. ; Optique instrumentale. Collection de la Société Française d'Optique. Les éditions de physique (1997).
- Bruchez M. Jr., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A.P., Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **281**, 2013-2015 (1998).
- Brus L.E. Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites : The size dependence of the lowest excited electronic state. *J. Phys. Chem.* **80** (9), 4403-4409 (1984).
- Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E., Steinbach P.A., Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. ; A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7877-82 (2002).
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. *Science* **263**, 802-5 (1994).
- Chan W.C.W., Nie S., Quantum Dot bioconjugate for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* **281**, 2016-2018 (1998).
- Chan W.C.W., Maxwell D.J., Gao X., Bailey R.E., Han M., Nie S., Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Op. Biotech.* **13**, 40-46 (2002).
- Cheezum M.K., Walker W.F., Guilford W.H. ; Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys. J.* **81**, 2378-88 (2001)
- Cody C.W., Prasher D.C., Westler W.M., Prendergast F.G., Ward W.W. *Biochem.* **22**, 1212 (1993).
- Cornish V.W., Benson D.R., Altenbach C.A., Hideg K., Hubbekk W.L., Schultz P.G. Site-specific incorporation of biophysical probes into proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2910 (1994).
- Dabbousi B.O., Rodriguez-Viejo J., Mikulec F.V., Heine J.R., Matoussi H., Ober R., Jensen K.F., Bawendi M.G. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots : synthesis and characterization of a size series highly luminescent nanocrystallites. *J. Phys. Chem. B* **101**, 9463-9475 (1997).
- Dahan M., Laurence T., Pibaud F., Chemla D.S., Alivisatos A.P., Sauer M., Weiss S. ; Time-Gated biological imaging by use of colloidal quantum dots. *Opt. Lett.* **26**, 825-7 (2001).
- Dahan M, Lévi S., Luccardini C., Rostaing P., Riveau B., Triller A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* **302**, 442-5 (2003).
- Deschenes L.A., Vanden Bout D.A. ; Single-molecule studies of heterogeneous dynamics in polymer melts near the glass transition. *Science* **292**, 255-258 (2001).
- Dickson R.M., Norris D.J., Tzeng Y.L., Moerner W.E., Three-dimensional imaging of single molecules solvated in pores of poly(acrylamide) gels. *Science* **274**, 966 (1996).
- Dickson R.M., Cubitt A.B., Tsien R.Y., Moerner W.E. ; On/Off blinking and switching of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355-8 (1997).

- Dubertret B., Skourides P., Norris D.J., Noireaux V., Brivanlou A.H., Lichaber A. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* **298**, 1759-1762 (2002).
- Efros A.L., Rosen M., Kuno M., Nirmal M., Norris D.J., Bawendi M. Band-edge exciton in quantum dots of semiconductors with a degenerate valence band : dark and bright exciton states. *Phys. Rev. B* **54** (7), 4843-4856 (1996).
- Elsiger M.-A. ; Watcher R.M., Hanson G.T., Kallio K., Remington S.J. ; Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to change in pH. *Biochem.* **38**, 5296-5301 (1999).
- Fox M. A., Chanon M. Electron transfer. Part C: Photoinduced electron transfer reactions: organic substrates. Edition Elsevier (1988).
- Françon M. ; Optical interferometry. Academic press (1966).
- Funatsu T., Harada Y., Tokunaga M., Saito K., Yanagida T., Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* **374**, 555-559 (1995).
- Gaietta G., Deerinck T.J., Adams S.R., Bouwer J., Tour O., Laird D.W., Sosinsky G.E., Tsien R.Y., Ellisman M.H. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* **296**, 503-507 (2002).
- Garcia-Parajo M. F., Koopman M., van Dijk E. M. H. P., Subramaniam V., van Hulst N. F. ; The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14392-7 (2001).
- Gelles J., Schnapp B.J., Sheetz M.P.; Tracking kinesin-driven movements with nanometer-scale precision. *Nature* **331**, 450-3 (1988).
- Gerion D., Pinaud F., Williams S.C., Parak W.J., Zanchet D., Weiss S., Alivisatos A.P. ; Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots. *J. Phys. Chem. B* **105**, 8861-71 (2001).
- Griesbeck O., Baird G.S., Campbell R.E., Zacharias D.A., Tsien R.Y. ; Reducing the environmental sensitivity of Yellow Fluorescent Protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 29188-194 (2001).
- Griffin B.A., Adams S.R., Tsien R.Y. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**, 269-272 (1998).
- Guignet E.G., Hovius R., Vogel H. ; Reversible site-selective labeling of membrane proteins in live cells. *Nat. Biotech.* **22**, 440-4 (2004).
- Ha T., Ting A.Y., Liang J., Caldwell W.B., Deniz A.A., Chemla D.S., Schultz P.G. Weiss S., Single molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 893-898 (1999).
- Ha T., Enderle Th., Chemla D.S., Selvin P.R., Weiss S. ; Quantum jumps of single molecules at room temperature. *Chem. Phys. Lett.* **271**, 1-5 (1997).
- Ha T. ; Single-Molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods* **25**, 78-86 (2001).
- Harada Y., Sakurada K., Aoki T., Thomas D.D., Yanagida T. ; *J. Mol. Biol.* **216**, 49 (1990).
- Harms G.S., Cognet L., Lommerse P.H.M., Blab G.A., Schmidt T. ; Autofluorescent proteins in single molecule research : application to live cell imaging. *Biophys. J.* **80**, 2396-2408 (2001a)
- Harms G.S., Cognet L., Lommerse P.H.M., Blab G.A., Kahr H. ; Single-molecule imaging of L-type Ca²⁺ channels in live cells. *Biophys. J.* **81**, 2639-46 (2001b).

- Hines M.A., Guyot-Sionnest P. Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe Nanocrystals. *J. Phys. Chem.* **100**, 468-471 (1996).
- Inoué S., Tsuji F. *FEBS Letter* **341**, 277-80 (1994).
- Ishima A., Kojima H., Funatsu T., Tokunaga M., Higuchi H., Tanaka H., Yanagida T., Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by single molecule during interaction with actin. *Cell* **92**, 161-171 (1998).
- Kusumi A., Sako Y., Yamamoto M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.* **65**, 2021-2040 (1993).
- Lakowicz J.R. ; Principles of fluorescence spectroscopy. Seconde édition (1999). Plenum.
- Larson D. R., Water-soluble Quantum Dots for multiphoton fluorescence imaging *in vivo*. *Science* **300**, 1434-1436 (2003).
- Lee GM, Ishihara A., Jacobson KA. ; Direct observation of brownian motion of lipids in a membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6274-78 (1991).
- Lounis B. L., Deich J., Rosell F.I., Boxer S. G., Moerner W. ; Photophysics of DsRed, a red fluorescent protein, from the ensemble to the single-molecule level. *J. Phys. Chem.* **105**, 5048- (2001).
- Lu H.P. Xun L., Xie X.S., Single-molecule enzymatic dynamics. *Science* **282**, 1877-1882 (1998).
- Matz M.V., Arkady F.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. ; *Nat. Biotechnol.* **17**, 969-73 (1999).
- Mayer M., Noble M. ; N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7496-500 (1994).
- Meier J., Vannier C., Sergé A., Triller A., Choquet D. ; Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nature Neuro.* **4**, 253-60 (2001).
- Mukherjee S., Ghosh R.N., Maxfield F.R. ; Endocytosis. *Phys. Rev.* **77**, 759-803 (1997).
- Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8706-8715 (1993).
- Moerner W.E., Kador L.; *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535 (1989).
- Moerner W.E., Fromm D.P.; Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Rev. Sci. Instruments* **74**, 3597-3619 (2003).
- Nie S., Chiu D.T., Zare R.N.; *Science* **266**, 1018 (1994).
- Nirmal M., Dabbousi B.O., Bawendi M.G., Macklin J.J., Trautman J.K., Harris T.D., Brus L.E. ; *Nature* **383** 802 (1996).
- Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. *Science* **273**, 1392695 (1996).
- Orrit M., Bernard J. ; *Phys. Rev. Lett.* **65**, 2716 (1990).
- Orrit M., Bernard J., Brown R., Lounis B. Optical spectroscopy of single molecules in solids. « *Progress in optics* », **35** (éd. E. Wolf, North Holland, Amsterdam, 1996).
- Pakalnis S., Sitas V., Schneckenburger H., Rotomskis R. ; Picosecond absorption spectroscopy of biologically active pigments NADH, FMN and fluorescence marker Rhodamine-123. The third internet photochemistry and Photobiology Conference (2000).; www.photobiology.com/photobiology2000

- Patterson G.H., Lippincott-Schwartz J. ; A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells. *Science* **297**, 1873-7 (2002).
- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J. ; *Gene* **111**, 229-233 (1992).
- Sako Y., Minoguchi S., Yanagida T., Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nature Cell Biology* **2**, 168-172 (2000).
- Sanchez E. J., Novotny L., Holtom G.R., Xie X.S. ; Room-temperature fluorescence imaging and spectroscopy of single molecules by two-photon excitation. *Phys. Chem. A* **101**, 7019-7023 (1997).
- Sandison D.R., Webb W.W. ; Background rejection and signal to noise optimization in confocal and alternative fluorescence microscopes. *Appl. Opt.* **33**, 603-615 (1994).
- Sase I., Miyata H., Corrie J.E.T., Craik J.S., Kinosita K.Jr., Real time imaging of single fluorophores on moving actin with an epifluorescence microscope. *Biophys. J.* **69**, 323-328 (1995).
- Schmidt Th., Schütz G.J., Baumgartner W., Gruber H.J., Schindler H., Characterization of photophysics and mobility of single molecules in a fluid lipid membrane. *J. Phys. Chem.* **99**, 17662-68 (1995).
- Schmidt Th., Schütz G.J., Baumgartner W., Gruber H.J., Schindler H., Imaging of single molecule diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2026-29 (1996).
- Schütz G.J., Pastushenko V.Ph., Gruber H.J., Knaus H.G., Pragl B., Schindler H., 3D imaging of individual ion channels in live cells at 40 nm resolution. *Single Mol.* **1**, 25-31 (2000a).
- Schütz G.J., Kada G., Pastushenko V.Ph., Schindler H., Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* **19**, 892-901 (2000b).
- Seisenberger G., Ried M.U., Endress T., Büning H., Hallek M., Bräuchle C. ; Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* **294**, 1929-1932 (2001).
- Sergé A., Fourgeaud L., Hémar A., Choquet D.; Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of mGluR5 in the neuronal membrane. *J. Neurosci.* **22**, 3910-20 (2002).
- Sheetz M.P., Turney S., Qian H., Elson E.L. ; Nanometer-level analysis demonstrates that lipid flow does not frive membrane glycoprotein movements. *Nature* **340**, 284-8 (1989).
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. *J Cell Comp. Physiol.* **59**, 223-39 (1962).
- Siegel M.S., Isacoff E.Y. ; *Neuron* **19**, 735-41 (1997).
- Thompson R.E., Larson D.R., Webb W.W. ; Precise nanometer localization for analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* **82**, 2775-83 (2002).
- Tsien R.Y. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544 (1998).
- Vale R.D., Funatsu T., Pierce D.W., Romberg L., Harada Y., Yanagida T., Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* **380**, 451-453 (1996).
- Verberk R., van Oijen A.M., Oriit M. Simple model for the power-law blinking of single semiconductor nanocrystals. *Phys. Rev. B* **66**, 233202.
- Voityuk A.A., Michel-Beyerle M.-E., Rösch N. Protonation effects on the chromophore of green fluorescent protein. Quantum chemical study of the absorption spectrum. *Chem. Phys. Lett.* **272**, 162-167 (1997).
- Wilson T., Sheppard C. ; Theory and Practice of scanning optical microscopy. Academic press (1984)
- Wu X., Liu H., Liu J., Haley K.N., Treadway J.A., Larson J.P., Ge N., Peale F., Bruchez M.P. ; Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature Biotech.* **21**, 41-46 (2003).

- Yang H., Luo G., Karnchanaphanurach P., Louie T.M., Rech I., Cova S., Xun L., Xie X.S., Protein conformational by Single-Molecule electron transfer. *Science* **302**, 262-266 (2003).
- Yank F., Moss L.G., Phillips G.N.Jr. *Nat. Biotech.* **14**, 1246-51 (1996).
- Yasuda R., Noji H., Kinosita K., Yoshida M. ; F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell* **93**, 1117-24 (1998).
- Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., Selvin P.R., Myosin V walks hand-over-hand : single fluorophore imaging with 1.5 nm localization. *Science* **300**, 2061-65 (2003).
- Zhang J., Campbell R.E., Ting A.Y., Tsien R.Y. ; Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 906 (2002).
- Zondervan R., Kulzer F., Kol'chenko M. A., Orrit M. ; Photobleaching of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol) at the ensemble and single-molecule levels. *J. Phys. Chem. A* **108**, 1657-65 (2004).

Chapitre 2

Dynamique des récepteurs du glutamate

Les études du fonctionnement du cerveau ont toujours fait appel à de multiples disciplines scientifiques, mêlant biochimie, électrophysiologie, informatique etc....L'approche biophysique de l'organisation membranaire neuronale des récepteurs constitue un point de vue supplémentaire sur ces problématiques.

La diffusion membranaire était étudiée, jusqu'en 1995, exclusivement par des techniques telles que le FRAP ou le SPT. Ces méthodes présentent deux défauts majeurs. Le FRAP ne permet d'accéder qu'à des valeurs moyennes des coefficients de diffusion. Quant au SPU, nous avons déjà vu qu'il lui était impossible d'accéder à toute la surface du neurone (Figure 6, p 12). Ainsi, la microscopie de fluorophores uniques s'est rapidement développée pour étudier les mouvements de lipides et protéines membranaires, qu'elles soient artificielles [Schmidt 1995, 1996], ou cellulaires [Schütz 1997].

Dans ce chapitre, nous commencerons par présenter la structure des différents éléments qui composent la membrane et les modèles pouvant décrire leur mobilité.

Dans une deuxième partie, nous nous concentrerons sur une structure particulière, la synapse, qui constitue un domaine très structuré des neurones. Nous détaillerons le cas de la synapse glutamatergique afin de comprendre comment les processus de la diffusion membranaire peuvent participer aux modifications de sa structure et/ou donc de sa fonction. La régulation des processus d'endocytose et d'exocytose joue aussi un rôle important dans les changements survenant à la synapse, et nous discuterons les rôles respectifs des processus de diffusion et d'endocytose.

Les résultats, détaillés dans la troisième partie, portent sur la diffusion membranaire d'un récepteur glutamatergique spécifique, appelé GluR2, sur des neurones vivants d'hippocampe de rat. Ils ouvrent un certain nombre de perspectives que nous évoquerons.

L'ensemble de ces phénomènes de trafic définit des compartiments cellulaires sous-micrométriques, dont il est important de déterminer la composition. Nous soulignerons la nécessité de pouvoir compter les récepteurs présents dans chacun de ces compartiments, afin d'élucider les mécanismes de régulation se produisant lors du trafic. Puis, dans une quatrième partie, nous présenterons les premiers résultats concernant le dénombrement de protéines assemblées.

I. Diffusion de biomolécules dans la membrane

A. Introduction

1. Les membranes

Les membranes sont des bicouches formées de lipides, dont les trois types principaux sont les phospholipides, les glycolipides et le cholestérol (Figure 48), et dans lesquelles sont insérées des protéines [Stryer]. Leur épaisseur varie de 6 à 10 nm. Les phospholipides représentent l'essentiel des lipides membranaires. Ils sont construits à partir d'un alcool, la sphingosine ou le glycérol, sur lequel sont attachés un ou deux acides gras, qui sont de longues chaînes hydrocarbonées se terminant par un acide carboxylique, et un groupement phosphate lié à un alcool. Des chaînes glucidiques peuvent être attachées aux lipides membranaires et former les glycolipides. Finalement, phospholipides et glycolipides possèdent une tête polaire hydrophile et deux longues chaînes hydrocarbonées, issues d'acides gras ou de la sphingosine, qui sont hydrophobes. Leurs longues parties hydrophobes s'autoassemblent tandis que leurs parties hydrophiles assurent l'interface avec le milieu aqueux. Ces lipides forment ainsi spontanément la bicouche lipidique, qui n'est pas maintenue par des liaisons covalentes. Le cholestérol, présent en proportions très diverses selon les types de cellules, a une structure différente puisqu'il est composé de quatre cycles hydrocarbonés rigides où sont attachés d'une part, une queue hydrocarbonée qui s'insère parallèlement aux queues hydrophobes des lipides précédents et, d'autre part, un groupe hydroxyle qui se lie à la tête polaire des phospholipides.

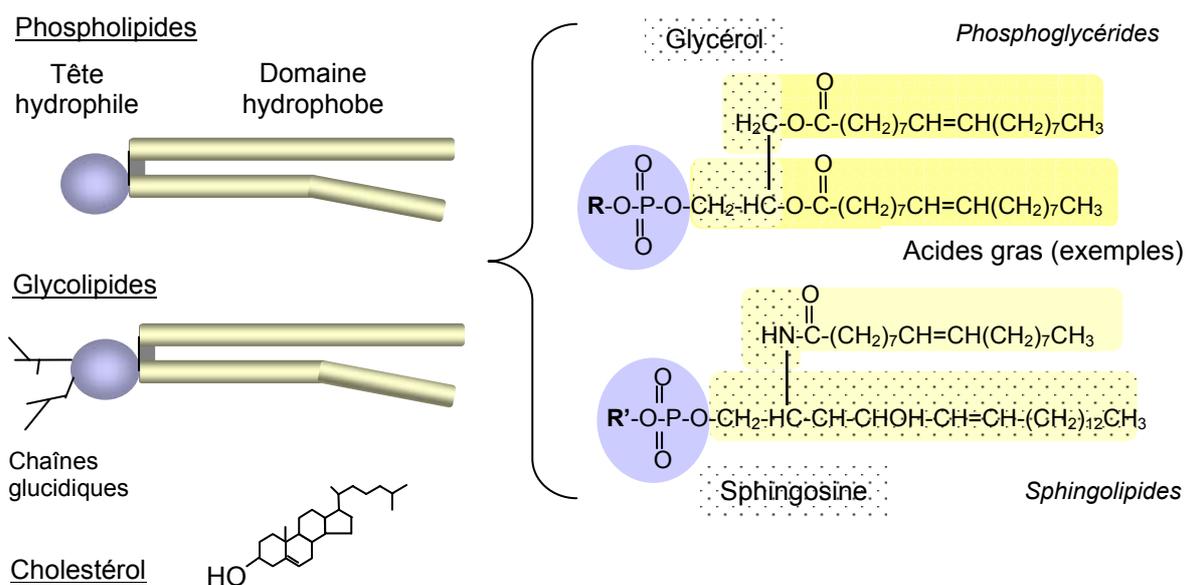


Figure 48: Structure des principaux lipides membranaires

La fluidité de la membrane dépend de la longueur et du degré d'insaturation des queues hydrophobes, et elle décroît lorsque la proportion de cholestérol augmente.

Les protéines peuvent s'associer à la membrane en interagissant directement avec les parties hydrophobes des lipides, soit grâce à des segments membranaires ou transmembranaires formés d'acides aminés hydrophobes, soit grâce à la liaison covalente des protéines avec un groupement hydrophobe tel que l'ancre Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI). Certaines protéines sont associées de façon moins forte à la membrane par interaction avec les protéines membranaires ou les têtes polaires des lipides.

Enfin, les membranes ont une structure asymétrique ; par exemple, les glycolipides sont essentiellement localisés dans le feuillet lipidique tourné vers la zone extracellulaire.

2. *Le modèle de mosaïque fluide*

Singer et Nicolson, dans un article publié en 1972, ont décrit les membranes biologiques comme une mosaïque fluide [Singer 1972]. Dans ce modèle, les membranes sont assimilées à des bicouches lipidiques formant un fluide visqueux, dans lesquelles des protéines membranaires sont dispersées de façon homogène (Figure 49). Les membranes s'organisent de façon dynamique. D'une part, des processus d'endocytose et d'exocytose assurent l'échange entre le compartiment intracellulaire et la membrane, et donc, le recyclage des protéines et lipides présents dans la membrane. D'autre part, les données expérimentales de cette époque amènent à postuler que ces biomolécules diffusent librement dans la membrane qui se réorganise ainsi au cours du temps.

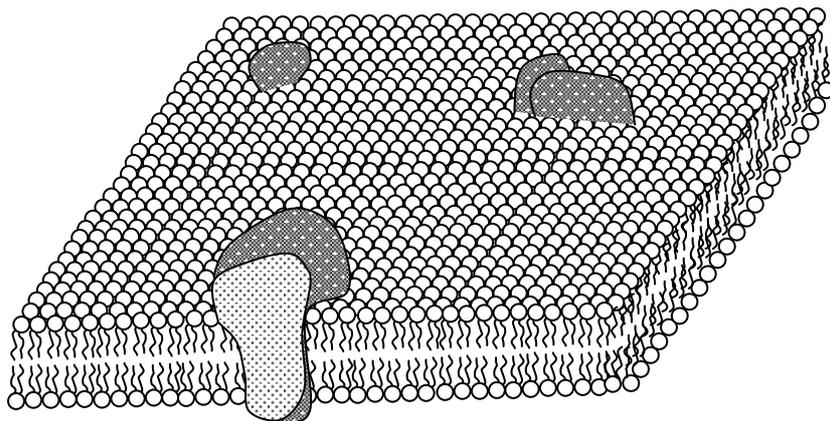


Figure 49: *Modèle de la mosaïque fluide décrivant la membrane lipidique.*

Depuis, un grand nombre d'expériences ont été réalisées portant sur les mouvements de diffusion de biomolécules membranaires. Il est alors apparu que le modèle de diffusion libre

ne suffisait pas à rendre compte des diffusions observées plus complexes. Par exemple, certaines biomolécules ont une trajectoire qui reste confinée dans une région précise de l'espace [Jacobson 1995]. Finalement, l'idée majeure du modèle de Singer et Nicolson est l'aspect mosaïque de la membrane, qui apparaît désormais comme structurée par différents microdomaines. Les microdomaines membranaires connus comprennent notamment les puits de clathrine, les densités postsynaptiques, ou encore les radeaux lipidiques.

Le concept de radeaux lipidiques a émergé il y a quinze ans. Il s'agit de domaines membranaires enrichis en cholestérol et en sphingolipides, définis biochimiquement par leur non solubilité dans le triton, et qui forment une phase liquide ordonnée. Cette notion a été introduite historiquement pour expliquer l'adressage spécifique de sphingolipides et de protéines à ancre GPI dans l'appareil de Golgi. Depuis, des questions se posent sur leur rôle dans l'adressage des protéines et dans la transduction du signal. S'il a été montré sur des membranes artificielles que des phases liquides ordonnées et désordonnées pouvaient coexister, l'existence physiologique de ces domaines est mise en doute. En effet, il n'existe pas actuellement de caractérisation *in vivo* fiable des radeaux lipidiques, et l'on continue à chercher leurs constituants dans la fraction membranaire résistante aux détergents. L'étude de ces domaines est réalisée grâce à la détection d'un de ses composants, qui peuvent être des lipides à chaînes saturées, des protéines à ancre GPI ou des protéines transmembranaires associées aux radeaux lipidiques. De plus, des techniques de mesure variées telles que le suivi de particules uniques, la microscopie de fluorescence de molécules uniques, ou le FRET ont été employées pour caractériser ces structures lipidiques présentes à la surface membranaire de différents types de cellules [Lommerse 2004b]. Des contradictions importantes apparaissent sur les résultats expérimentaux ainsi obtenus. Par exemple, les mesures provenant d'expériences de pinces optiques et utilisant des protéines à ancre GPI comme marqueurs des radeaux lipidiques indiquent que les radeaux lipidiques présents sur la face externe de la membrane ont des dimensions de l'ordre de 50 nm [Pralle 2000], la détection de fluorophores individuels marquant des lipides à chaînes saturées a elle conduit à évaluer ces dimensions à environ 700 nm [Schütz 1997], tandis que le suivi de particule a permis de visualiser la trajectoire confinée de protéines à ancre GPI dans des domaines insensibles à l'application de détergent d'environ 300 nm de diamètre [Sheetz 1997]. Plus récemment, des domaines de 200 nm de diamètre environ ont été mis en évidence sur le feuillet interne de la membrane plasmique, grâce à une détection de molécules uniques [Lommerse 2004a]. Il est difficile de déterminer si ces mesures contradictoires résultent de la diversité des approches expérimentales pour lesquelles les durées d'observation, notamment, sont différentes, de la

variété des types cellulaires observés différent, ou si elles traduisent la grande variabilité de ces domaines à la surface d'une même cellule. En se basant sur ses résultats expérimentaux, l'équipe de Kusumi a proposé que des radeaux lipidiques de différentes dimensions soient présents dans la membrane cytoplasmique [Subczynski 2003]. Selon cette équipe, il existerait des radeaux lipidiques instables, avec des durées d'existence de l'ordre de quelques millisecondes, formés de quelques molécules seulement. Les récepteurs à ancre GPI ou transmembranaires, ayant une affinité pour les lipides formant les radeaux lipidiques, stabiliseraient, au moment de leur activation par liaison de leur agoniste, ces radeaux lipidiques de petite taille, pendant une minute environ. Les tailles des radeaux lipidiques pourraient croître jusqu'à former des domaines atteignant plusieurs centaines de nanomètres, formant ainsi de larges plateformes de signalisation.

Avec l'étude des radeaux lipidiques, diverses questions ont commencé à être posées. Y a-t-il une relation précise entre la structure du microdomaine et sa fonction ? Quels sont les facteurs capables de déclencher la formation, puis la transformation des microdomaines ? Ces transformations concernent-elles seulement la composition des domaines ou bien aussi leur organisation ? La fonction du domaine est-elle affectée différemment selon le type de modification subie par le domaine ?

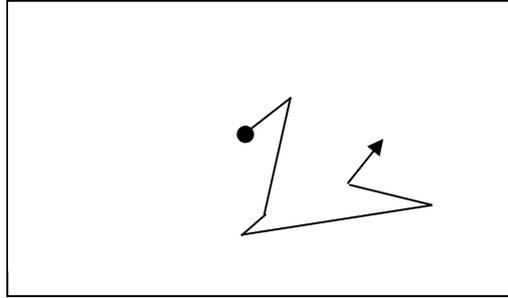
Si nous nous plaçons maintenant au niveau des protéines membranaires, celles-ci peuvent être schématisées par trois domaines : extracellulaire, transmembranaire, et intracellulaire, qui tous trois peuvent donner lieu à des interactions, soit protéines/protéines, soit protéines/lipides. Chacune de ces interactions peut modifier la diffusion membranaire des protéines.

B. Les modèles physiques de diffusion

Comme nous venons de le voir, la structure et la dynamique des membranes soulèvent de nombreuses questions. Les expériences donnent accès, principalement, aux coefficients de diffusion des biomolécules membranaires, à partir desquels des hypothèses sur la structure des membranes sont formulées. Cependant, la composition des membranes étant très imprécise, il s'est souvent avéré impossible de comparer ces résultats expérimentaux avec les modèles théoriques. Des simulations, basées sur plusieurs hypothèses de structure membranaire, ont pu néanmoins permettre d'approfondir le rôle de chacun des acteurs de la membrane dans les valeurs des coefficients de diffusion. En particulier, ces prévisions

théoriques ont été appliquées au cas de la membrane érythrocytaire qui constitue un modèle classique de membrane.

1. Diffusion en l'absence d'obstacles



a) Diffusion brownienne, le modèle Stokes-Einstein

La diffusion brownienne décrit le mouvement d'une particule se déplaçant dans un fluide et uniquement soumise aux chocs des molécules formant le fluide, dont le mouvement provient de l'agitation thermique.

La diffusion d'une particule dans un fluide est décrite par la loi phénoménologique de Fick (Équation 13), qui permet d'accéder à la probabilité de présence d'une protéine en r , à l'instant t , notée $p(r,t)$. D est le coefficient de diffusion.

$$\frac{\partial p(\vec{r},t)}{\partial t} - D \cdot \Delta p(\vec{r},t) = 0 \tag{Equation 13}$$

Lorsqu'on choisit comme condition initiale, la particule présente $r = 0$ à l'instant initial, $p(r,t)$ s'écrit :

$$p(r,t)dr = \frac{1}{4\pi Dt} \exp\left(-r^2/4Dt\right)2\pi r dr \tag{Equation 14}$$

La moyenne du carré du déplacement a alors pour expression :

$$\langle r^2 \rangle = \int r^2 p(\vec{r},t)dr = 4Dt \tag{Equation 15}$$

D est donné par la relation d'Einstein $D = k_B T / f$, où f est le coefficient de la force de frottement tel que $\vec{F} = f\vec{v}$. Or une molécule de rayon R , se déplaçant, dans un liquide de viscosité η à la vitesse \vec{v} , est soumis à une force de viscosité $\vec{F} = 6\pi\eta R\vec{v}$. Le coefficient de diffusion est donc égal à

$$D = k_B T / 6\pi\eta R \tag{Equation 16}$$

D est proportionnel à l'inverse de la taille de l'objet, soit à $\frac{1}{\sqrt[3]{M_{\text{biomolécule}}}}$, où $M_{\text{biomolécule}}$ est la masse de la biomolécule.

b) Diffusion brownienne dans une membrane, le modèle de Saffman-Delbrück

Une biomolécule diffusant dans une membrane peut être schématisée par un cylindre de rayon R se déplaçant dans un milieu fluide d'épaisseur finie h, de viscosité η et entouré d'un fluide extérieur de viscosité η_{ext} (Figure 50) [Saffman 1975].

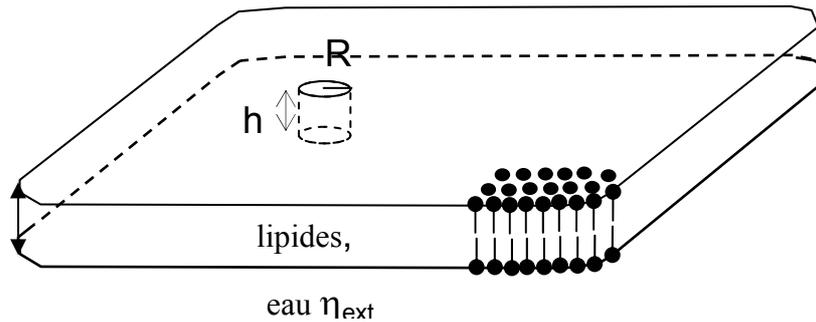


Figure 50: Membrane modélisée

Lorsque l'objet diffuse librement dans le fluide, le coefficient de diffusion est décrit par le modèle de Saffman-Delbrück (Équation 17), la probabilité de présence de l'objet conservant la même expression.

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\eta h} \left[\ln\left(\frac{\eta h}{\eta_{\text{ext}} R}\right) - \gamma \right] \quad \text{Équation 17}$$

On peut tracer la courbe représentant le coefficient de diffusion en fonction du rayon de la biomolécule R (Figure 51), en attribuant aux paramètres du modèle les valeurs suivantes, caractéristiques d'une membrane biologique :

$\eta \approx 1 \text{ Pl}$ (avec $1 \text{ Pl} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), $\eta_{\text{ext}} \approx 10^{-2} \text{ Pl}$, $h \approx 5 \text{ nm}$, et $\gamma = 0,5772$ est la constante d'Euler.

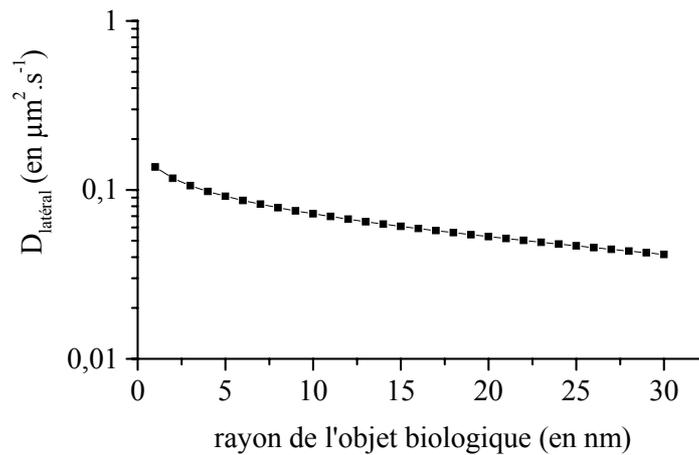
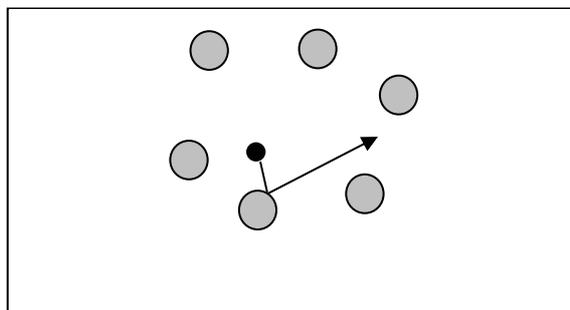


Figure 51 : Coefficient de diffusion latérale prévue par le modèle Saffman-Delbruck pour une protéine en fonction du rayon de la protéine.

Ce modèle permet de retrouver l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion des protéines dans les membranes biologiques, à savoir de l'ordre de $0,1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, alors que celui des lipides est de l'ordre de $1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. De plus, il indique que le coefficient de diffusion d'une protéine ayant un mouvement brownien dans une membrane dépend faiblement de son diamètre. En effet, si l'on considère une protéine de 3 nm de diamètre, son coefficient de diffusion est de $0,11 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, alors que pour un diamètre de 9 nm, ce qui correspond au cas où 9 protéines initiales sont agrégées, le coefficient de diffusion diminue seulement de 25%.

2. Diffusion en présence d'obstacles

a) Diffusion libre dans un milieu parsemé d'obstacles



Les membranes contiennent des biomolécules mobiles et immobiles dans des proportions non négligeables les unes par rapport aux autres. Des simulations de Monte Carlo ont été réalisées afin de déterminer l'influence de cette fraction d'obstacles immobiles dans la membrane, les interactions étant considérés de type sphère dure [Saxton 1990]. Aux temps longs, la diffusion

est libre. Le coefficient de diffusion dépend faiblement de la taille des obstacles mais décroît de façon significative lorsque la proportion d'obstacles immobiles augmente.

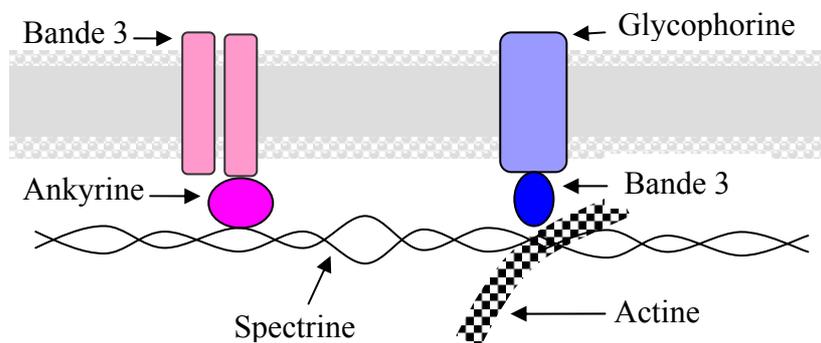
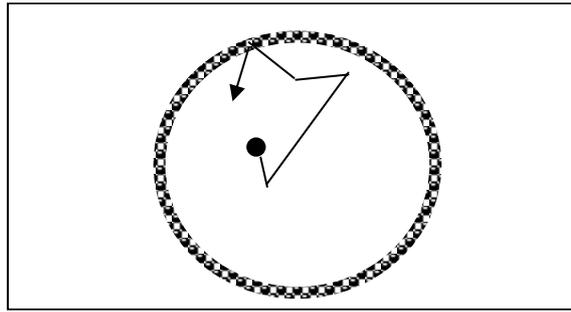


Figure 52: La membrane érythrocytaire : un modèle membranaire classique

Ces résultats théoriques ont été comparés aux mesures réalisées sur des membranes de globules rouges ou érythrocytes. La membrane plasmique érythrocytaire est sous-tendue par un réseau de spectrine dont les nœuds sont formés par des brins courts d'actine. Le réseau tout entier est lié à la membrane, d'une part, via les ankyrines interagissant avec la protéine membranaire bande 3 et, d'autre part, via la protéine bande 4,1 qui interagit avec la protéine membranaire appelée glycophorine. Le coefficient de diffusion de la protéine bande 3 à la surface des érythrocytes diminue d'un facteur 50 lorsque le cytosquelette est détruit. Après estimation des différentes grandeurs, l'obstruction réalisée par les protéines liées au cytosquelette, qui constituent 40% des protéines, ne suffit pas à expliquer une telle diminution du coefficient de diffusion [Saxton 1990].

Afin de s'approcher des mesures réalisées, un nouveau modèle théorique a été proposé. Il est basé sur l'écriture de l'équation hydrodynamique du fluide que constitue la membrane, auquel a été ajouté un terme traduisant la présence de particules immobiles [Bussel 1995]. Cependant, ce modèle n'est valable que dans le cas où la membrane peut être assimilée à un fluide, c'est-à-dire quand le rayon d'un lipide est négligeable devant celui des parties transmembranaires de la protéine, ce qui est le cas des protéines à plusieurs segments transmembranaires. De plus, si ce modèle peut rendre compte du coefficient de diffusion de protéines dont la partie intracellulaire n'intervient pas dans la diffusion, il est incapable de traduire les effets de liaison à des éléments sous membranaires. Ce modèle d'interaction hydrodynamique s'approche davantage des valeurs mesurées du coefficient de diffusion ; cependant une différence demeure qui a peut-être pour origine l'encombrement causé par le cytosquelette rencontré par la partie intracellulaire de band 3.

b) Diffusion confinée dans une zone de l'espace



L'équation de diffusion (Équation 13) peut être résolue en prenant comme condition initiale la particule présente en $r = 0$, et $t = 0$, et en considérant que la diffusion est limitée à l'intérieur d'un disque de rayon L , dont les barrières sont imperméables [Kusumi 1993]. Le déplacement quadratique moyen a alors pour expression :

$$\langle r^2 \rangle = \frac{L^2}{3} \left[1 - \frac{96}{\pi^4} \sum_{n \text{ impair}} \frac{\exp(-n^2 \pi^2 Dt / L^2)}{n^4} \right] \quad \text{Équation 18}$$

Les expériences de suivi de particules uniques réalisées par Kusumi et ses collaborateurs [Kusumi 1993, 1994] ont montré en particulier que les récepteurs de la transferrine et de macroglobuline α_2 se déplacent à la surface de fibroblastes en parcourant successivement différents domaines de diamètre avoisinant les 600 nm, dans lesquels ils restent confinés. De plus, la détérioration du cytosquelette provoque une augmentation importante de la proportion de récepteurs ayant un déplacement brownien, au détriment de la fraction de récepteurs ayant un mouvement confiné. Le cytosquelette doit donc intervenir dans la formation des barrières délimitant ces domaines.

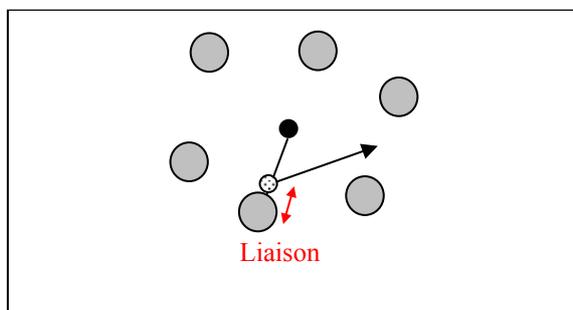
Lorsque l'on considère les barrières comme perméables, le temps nécessaire à l'échappement peut devenir un paramètre d'intérêt. [Saxton 1995]

3. La diffusion anormale

La présence d'obstacles ou, encore, la liaison à d'autres protéines perturbent la diffusion des protéines membranaires. Pour des obstacles présents à des densités inférieures au seuil de percolation on peut définir une distance caractéristique. Les déplacements quadratiques moyens, supérieurs aux carrés de cette distance, correspondent à un régime de diffusion libre. En revanche, les déplacements quadratiques moyens, inférieurs aux carrés de cette distance, ne dépendent plus linéairement du temps. Ils sont alors proportionnels au temps élevé à une puissance inférieure à un :

$$\langle r^2 \rangle \propto t^\alpha, \text{ avec } \alpha \leq 1 \quad \text{Équation 19}$$

Cette distance caractéristique, qui sépare ces deux régimes de diffusion, est d'autant plus élevée que la densité des obstacles augmente, et s'approche du seuil de percolation [Saxton 1994]. De façon générale, la diffusion apparaît donc comme anormale pour des durées d'observation courtes, et libre pour des durées d'observation longues.



En fait, une protéine diffusant dans une membrane rencontre à la fois des obstacles, type sphères dures, et des pièges formés par des biomolécules auxquelles elles se lient. Les simulations, prenant en compte ces sites de liaison, montrent que l'affinité pour certains sites du milieu ne renforce pas le caractère anormal de la diffusion aux temps courts, comparé au cas où seuls des obstacles inertes sont présents [Saxton 1996]. En revanche, il apparaît que les coefficients de diffusion sont plus faibles, et ce d'autant plus que les constantes d'affinité des pièges sont hétérogènes. Le temps séparant les deux régimes de diffusion est alors plus long.

4. Le mouvement dirigé

Le mouvement dirigé peut provenir de l'existence d'un flux des lipides membranaires qui convoie la protéine avec lui. La surface membranaire des cônes de croissance des axones s'accroît sans cesse ce qui induit un mouvement uniforme de la membrane des cônes vers le soma du neurone [Bray 1996]. Dans les fibroblastes, il a été observé que les intégrines s'attachent, elles, à l'actine dès qu'elles sont liées à leur ligand [Felsenfeld 1996]. Ainsi, emportées par le flux rétrograde d'actine, elles ont un mouvement dirigé, décrit par le modèle du tapis roulant.

Le déplacement quadratique du mouvement dirigé a pour expression :

$$\langle r^2 \rangle = v^2 t^2 \quad \text{Équation 20}$$

C. Caractérisation expérimentale du mouvement diffusif

Nous allons maintenant expliquer comment, avec l'aide des modèles théoriques précédents, les mesures réalisées avec la technique du suivi de molécules uniques sont interprétées.

1. Suivi de particules ou de molécules uniques

La méthode classique consiste à calculer le carré de la distance, parcourue au bout d'un intervalle de temps Δt , moyennée sur tous les intervalles Δt de la trajectoire. Les trajectoires sont classées en fonction de leur déplacement quadratique moyen. Ce déplacement quadratique moyen, en fonction du temps, peut être ajusté par les fonctions décrivant une diffusion libre, une diffusion confinée pour laquelle on s'arrête au premier terme de la série, une diffusion anormale, ou un mouvement dirigé (Figure 53).

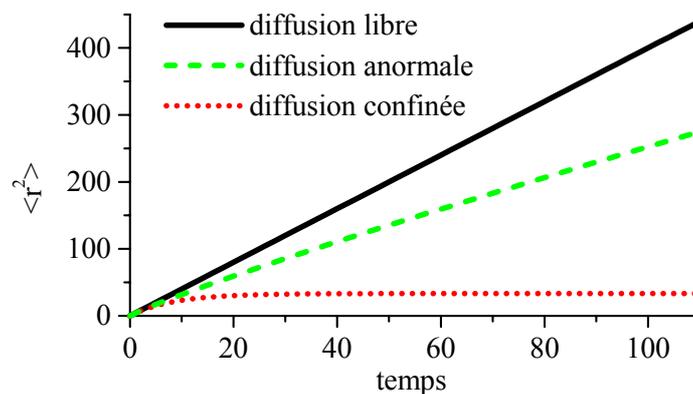


Figure 53: déplacement quadratique moyen en fonction du temps, correspondant aux divers types de diffusion

2. Longueur de traces et caractérisation des mouvements

Comme nous l'avons vu précédemment, la mobilité des protéines correspond généralement à une diffusion anormale, aux temps courts, et une diffusion libre, aux temps longs. Il est important de connaître l'ordre de grandeur du temps auquel a lieu cette transition. On considère une protéine de 4 nm de diamètre dont le coefficient de diffusion est $0,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et qui se déplace dans un milieu contenant une concentration modérée d'obstacles de la même dimension, i.e. occupant moins de 30 % de la surface membranaire. Dans ce cas, la transition d'une diffusion de type anormale à libre se produit après quelques dizaines de millisecondes [Saxton 1994].

Nous avons vu que les protéines peuvent aussi être situées à l'intérieur d'un domaine de confinement. En fait, la perturbation causée par la présence de barrières imperméables est

d'autant plus faible que la taille du domaine est grande, et la fréquence d'échantillonnage faible [Saxton 1995].

Pour comparer les modifications de mobilité des récepteurs, observées au cours des différentes conditions expérimentales, nous avons choisi d'adopter une méthode statistique. Elle consiste à calculer le coefficient de diffusion microscopique de chaque trajectoire, puis à construire une distribution de ces coefficients, dont nous tirons la valeur moyenne. Le coefficient de diffusion microscopique caractérise la portion du déplacement quadratique moyen, en fonction du temps, qui correspond à une diffusion libre. Afin de n'être perturbé ni par le régime anormal ayant lieu aux temps courts, ni par la présence de barrières autour du domaine, nous avons choisi de calculer ce coefficient de diffusion microscopique sur l'intervalle de temps compris entre 30 ms et 150 ms [Kusumi 1993]. Cette approche statistique ne donne pas accès aux caractéristiques des mouvements de diffusion. En revanche, elle permet de classer les différentes sous populations de protéines, en fonction de leur mobilité. Nous montrerons ultérieurement que les résultats obtenus sont en très bon accord avec ceux déterminés par une approche plus globale (p.120).

II. Introduction aux récepteurs glutamatergiques

Nous débuterons cette partie par une description simplifiée des neurones, avant de nous concentrer sur la région synaptique des neurones d'hippocampe. Un tel intérêt est lié aux observations comportementales concernant les capacités mnésiques, dont les changements sont à mettre en relation avec les modifications de la composition moléculaire de la synapse. Nous nous focaliserons, plus particulièrement, sur les acteurs post-synaptiques. Après avoir décrit les phénomènes majeurs observés en électrophysiologie, nous détaillerons les mécanismes moléculaires proposés aujourd'hui pour rendre compte de ces phénomènes, et évoquerons quelques unes des questions encore sans réponse aujourd'hui.

A. Une cellule particulière, le neurone

1. Introduction

L'étude des neurones, dont le diamètre est de l'ordre de quelques micromètres, n'a pu débuter qu'avec le développement du microscope à la fin du 17^{ème} siècle. La technique de coloration argentique, inventée par Golgi en 1873, constitua une avancée majeure pour la compréhension de la structure du système nerveux. En effet, l'imprégnation argentique de tranches de cerveau conduit à la coloration sombre d'un petit nombre de neurones dont on peut ainsi décrire la morphologie avec précision (Figure 54). On peut alors observer le corps cellulaire ou soma d'où partent de fins prolongements appelés neurites. Golgi considérait que ces neurites fusionnaient entre eux pour ne former qu'un réseau continu formant le système nerveux. A cette théorie réticulaire, l'histologiste espagnol Ramon y Cajal opposa une théorie cellulaire, s'appuyant pour cela sur des observations réalisées par cette même technique de coloration de Golgi dès 1889. Cajal affirmait que les neurones devaient être en contact mais en aucun cas reliés les uns aux autres. Golgi et Cajal obtinrent le prix Nobel en 1906. Quant à la controverse, elle fut définitivement tranchée en faveur de la théorie cellulaire supportant le concept de neurone grâce aux clichés de microscopie électronique réalisés dans les années 50.



Figure 54 : coloration de Golgi de neurones pyramidaux de cortex de lapin [Muséum National d'histoire naturelle]

2. Description simplifiée

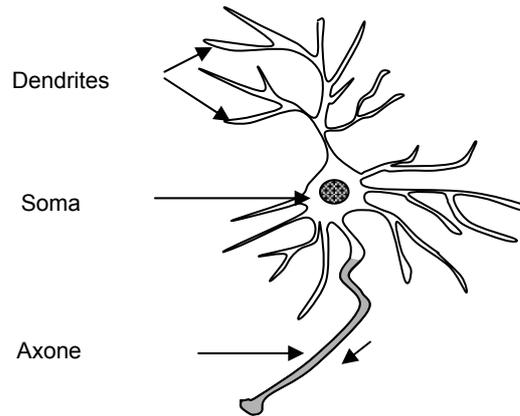


Figure 55: schéma d'un neurone pyramidal

Un neurone (Figure 55) est une cellule excitable puisqu'elle répond à un stimulus en modifiant ses caractéristiques membranaires ce qui lui permet de transmettre ce stimulus, parfois modifié. Le neurone est, de plus, une cellule polarisée, l'information nerveuse la parcourant généralement dans un sens déterminé. Cela se traduit par une organisation différente au niveau moléculaire pour les neurites qui reçoivent le stimulus et que l'on appelle dendrites, et le neurite qui transmet et qui est appelé axone. Dendrites et axones se différencient aussi d'un point de vue morphologique. Le soma donne naissance à un seul axone qui peut, parfois se diviser, et dont la taille peut atteindre 1m ; enfin, certains axones sont myélinisés, c'est-à-dire recouverts par des cellules, appelées oligodendrocytes dans le système nerveux central, qui augmentent leur conductivité. Les dendrites, eux, peuvent surgir en grand nombre du corps cellulaire, et en général, leur taille ne dépasse pas 2 mm. Enfin, le neurone est une cellule post-mitotique ; aussi la plupart des neurones ne se divisent plus après la naissance de l'individu. De ce fait, les neurones portent les marques du passé de l'individu. Au repos, le neurone possède un potentiel de membrane, mesuré entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, égal à -70 mV.

L'intégration du signal en provenance des dendrites au niveau du segment initial de l'axone peut donner naissance à un potentiel d'action qui va se propager jusqu'à la terminaison axonale. Le potentiel d'action est une dépolarisation de la partie intracellulaire, sa propagation n'est pas un simple processus passif ; car la dépolarisation serait progressivement amortie, mais un processus actif dans lequel des canaux voltages dépendants ouvrent leurs canaux dès que le potentiel de membrane dépasse localement un certain seuil. Ainsi la dépolarisation est-elle régulièrement maintenue voire amplifiée jusqu'à la terminaison axonale.

Les neurones sont classés selon des critères morphologiques ou neurochimiques. La classification morphologique tient compte du nombre de neurites ou de l'allure de l'arborisation dendritique ou encore de la longueur des axones, on parle ainsi de cellules multipolaires pyramidales et de Golgi de type I du cortex cérébral, ces neurones possédant un long axone. Un critère neurochimique définit des neurones comme étant, par exemple, glutamatergiques ou GABAergiques pour indiquer que le neuromédiateur principal de ces neurones est le glutamate ou le GABA.

3. *Transmission synaptique*

a) Définition de la synapse

Le Potentiel d'Action se propage jusqu'à l'extrémité de l'axone où le signal est transmis à la dendrite située à proximité. Le lieu où se fait la transmission de l'information nerveuse est appelé synapse (Figure 56) ; elle comprend la terminaison axonale qui constitue la partie présynaptique et la dendrite faisant face, qui forme la partie postsynaptique. En fait, ceci est le cas le plus répandu mais il existe aussi des synapses se produisant entre axone et soma, ou entre dendrites, ou même entre axones.

Les synapses entre neurones sont de deux types : électriques ou chimiques. Les synapses électriques sont des jonctions communicantes réalisées par des protéines transmembranaires dont l'assemblage forme un pore, appelé connexon. Les connexons traversent l'espace intermembranaire qui, dans le cas d'une synapse électrique, n'excède pas quelques nanomètres et le potentiel d'action peut alors passer directement d'une partie de la synapse à une autre. Dans la synapse chimique, la transmission de l'information a lieu par l'intermédiaire d'une ou plusieurs molécules chimiques appelées neurotransmetteurs.

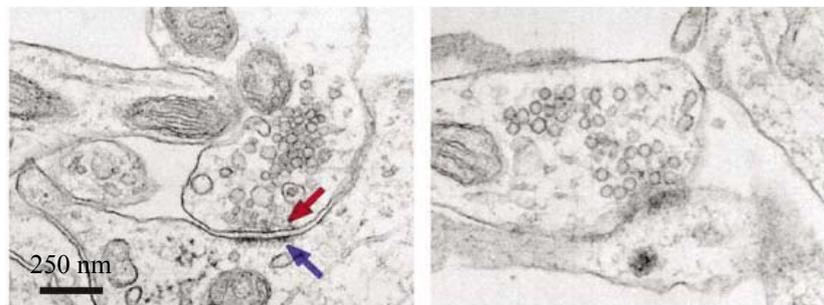


Figure 56 : Ultrastucture de synapses chimiques [Song 1999]. Culture d'embryons d'hippocampe de rat. La flèche supérieure montre la partie présynaptique, la flèche inférieure la densité postsynaptique.

b) La synapse chimique

La synapse chimique est composée du bouton présynaptique dans lequel sont stockées des vésicules remplies de neurotransmetteurs et qui possède à sa surface des canaux calciques voltage dépendants, et de la face post-synaptique sur laquelle sont concentrés les récepteurs spécifiques du médiateur contenu dans les vésicules présynaptiques (Figure 57).

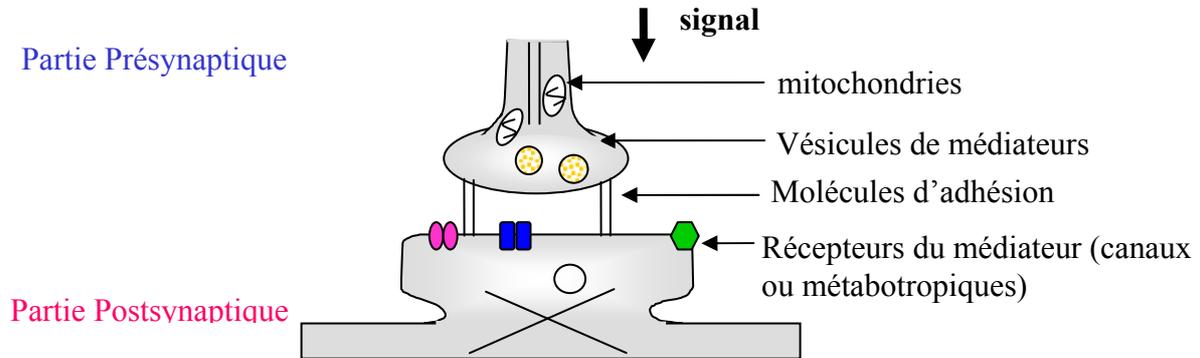


Figure 57 : schéma d'une synapse chimique

L'arrivée du potentiel d'action dans la partie présynaptique déclenche l'entrée massive d'ions calcium à l'intérieur de l'extrémité axonale, ce qui va déclencher la fusion des vésicules contenant les neurotransmetteurs à la membrane plasmique et par suite la libération du médiateur dans la fente synaptique. Le neurotransmetteur diffuse dans la fente et se lie ensuite aux récepteurs situés sur la partie postsynaptique.

L'activation des récepteurs à canaux ioniques, appelés récepteurs ionotropiques, va se traduire par un échange d'ions directement à travers le récepteur. Un récepteur métabotrope peut être couplé, à un récepteur canal grâce à une protéine G, et ainsi commander l'ouverture du récepteur canal lorsqu'il est activé. Enfin, l'activation des récepteurs métabotropiques peut aussi déclencher une suite de réactions enzymatiques.

c) L'efficacité synaptique

L'échange d'ions donne naissance, dans la partie postsynaptique, à une dépolarisation locale appelée potentiel postsynaptique excitateur (PPSE), ou une hyperpolarisation locale appelée potentiel postsynaptique inhibiteur (PPSI).

Suite à l'arrivée d'un potentiel d'action dans la partie présynaptique, il apparaît, dans la partie postsynaptique, des PPSE ou PPSI plus ou moins élevés en fonction de la composition et de l'organisation de la synapse. On définit alors l'efficacité synaptique qui indique avec quel rendement a été transmise l'information nerveuse.

d) Transport axonal et dendritique en direction de la synapse

L'activité synaptique requiert de nombreuses protéines pour avoir lieu. Généralement, les protéines sont donc synthétisées dans le réticulum endoplasmique situé dans le soma, puis maturées dans l'appareil de Golgi d'où elles sont adressées vers divers compartiments cellulaires et exocytées (Figure 58). Elles seront ensuite endocytées et évacuées soit vers des réserves intracellulaires qui peuvent exister dans les terminaisons, soit vers les compartiments de dégradation tels que les lysosomes qui sont situés dans le soma.

Afin d'atteindre l'extrémité axonale, les protéines sont transportées dans des vésicules conduites par des moteurs moléculaires appelés kinésines, se déplaçant le long de microtubules. Ce transport antérograde est complété par le transport inverse, ou transport rétrograde, qui est réalisé par la dynéine. L'extrémité des axones est, elle, dépourvue de microtubules, mais riche en vésicules claires de 40 à 60nm de diamètre contenant les neurotransmetteurs et, en mitochondries dont le fonctionnement assure le métabolisme des médiateurs ; de plus, sa membrane intérieure est densément occupée par des protéines.

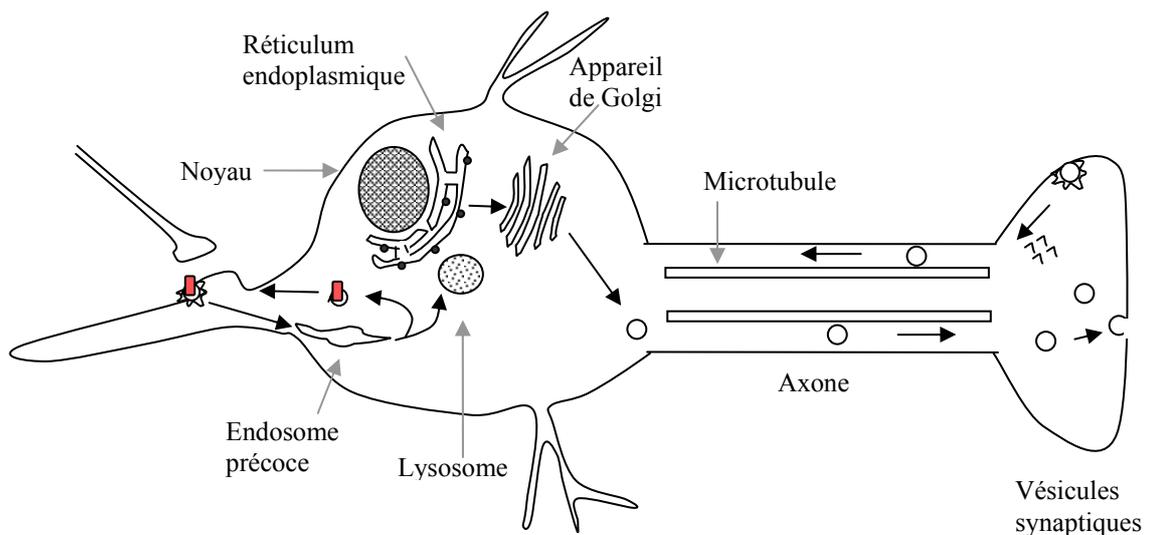


Figure 58: synthèse, adressage, recyclage et dégradation des récepteurs dans un neurone

Les dendrites de nombreux neurones présentent, loin du corps cellulaire, de petites excroissances appelées épines sur lesquelles se trouvent des synapses. Les protéines adressées aux extrémités dendritiques sont pour la plupart synthétisées dans le soma. Cependant, sous les épines dendritiques, existent des ribosomes et des ARNm permettant une synthèse locale de protéines.

e) Homéostasie de l'environnement synaptique

La transmission synaptique ne peut se faire correctement qu'à condition que le médiateur soit en concentration faible dans la fente synaptique et dans son voisinage, en l'absence de potentiel d'action dans la partie présynaptique. Les astrocytes, cellules appartenant à la famille des glies, coexistent avec les neurones et enveloppent les jonctions synaptiques. En fait, elles sont capables de capter activement les neurotransmetteurs présents dans le milieu ainsi que de réguler la concentration d'autres substances participant au bon fonctionnement des neurones, comme les ions potassium K^+ .

B. Mémoire et synapses

1. Vision globale

Après cette description rapide du neurone et de son fonctionnement, nous allons évoquer le rôle tenu par la synapse dans le fonctionnement de la mémoire d'un individu [Squire 2002].

Les informations mémorisées ne sont généralement pas localisées dans une région anatomique unique. Selon la théorie de Hebb, postulée en 1949, la mémoire est distribuée, au niveau cortical, entre des neurones connectés entre eux et activés simultanément, formant ainsi des circuits préférentiels [Hebb 1949]. Cette propriété a pour conséquence que la mémoire peut perdurer en dépit de la disparition d'une partie des neurones formant cette assemblée. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement, avec cependant une nuance : les zones du cerveau participant au processus de mémorisation y contribuent de façon différente en remplissant des fonctions spécifiques.

En fait, deux formes de mémoire existent : la mémoire déclarative qui correspond au souvenir de faits et événements et la mémoire procédurale qui concerne des réalisations motrices ou des comportements. Plusieurs cas de lésions du cerveau ont montré que les lobes temporaux et l'hippocampe étaient impliqués dans la mémoire déclarative [Scoville 1957, Milner 1968] de même qu'une partie du diencephale.

Comme les neurones matures ont perdu leur capacité à se diviser, Ramon y Cajal propose, dès 1894, que le processus mémorisation corresponde à une modification durable du nombre de synapses et de leur efficacité, c'est-à-dire à un phénomène de plasticité synaptique.

L'hippocampe est devenu un objet d'étude car il contribue à la mémoire déclarative ; en particulier, chez les rongeurs, il est le siège de la mémoire spatiale, dite aussi mémoire

contextuelle [Kim 2002]. Ainsi, des études ont testé ces capacités spatiales en fonction des caractères génétiques des rongeurs considérés, et des liens ont pu être établis, dans une certaine mesure, entre des capacités mnésiques et des mécanismes moléculaires [Tsien 1996, Mayford 1996]. De plus, l'hippocampe présente le grand avantage d'avoir une structure simple (Figure 59) qui permet une étude aisée de la transmission synaptique. Dès les années 60, des expériences d'électrophysiologie ont ainsi été menées sur des coupes d'hippocampes prélevés sur des animaux.

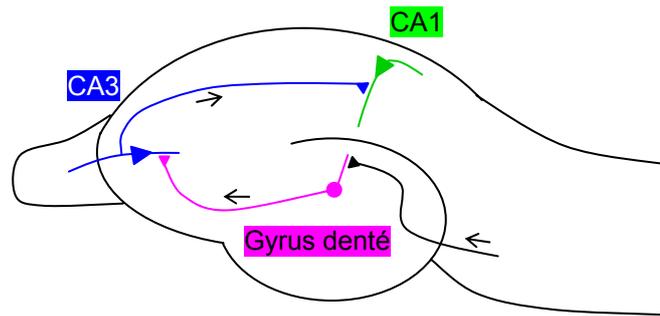


Figure 59: Circuits neuronaux de l'hippocampe, chez un rongeur.

2. Composition moléculaire des synapses glutamatergiques d'hippocampe

Nous allons maintenant présenter, de façon simplifiée, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la partie présynaptique lors de l'arrivée d'un potentiel d'action. Puis nous détaillerons les propriétés des récepteurs présents à la surface post-synaptique. Enfin, nous décrirons les nombreux éléments appartenant à la densité post-synaptique dont la structure spécifique conduit à nous interroger sur sa contribution à la fonction synaptique.

a) Libération des neurotransmetteurs

Le mécanisme moléculaire majeur, se produisant dans la partie présynaptique, est l'exocytose. Or celle-ci est cruciale pour les modifications de compositions moléculaires post-synaptiques et certaines protéines décrites ici font aussi partie de la densité post-synaptique dont nous parlerons ultérieurement. Aussi, allons-nous détailler les processus mis en jeu dans la partie présynaptique à l'arrivée d'un potentiel d'action.

La libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique a lieu suite à l'arrivée d'un potentiel d'action dans la partie présynaptique, déclenchant une entrée massive de calcium à l'intérieur du neurone. L'intervalle de temps, qui sépare l'entrée de calcium et la libération du médiateur, est d'environ 300 μ s. Ce temps indique que les vésicules sont prêtes à

fusionner lorsque survient le signal déclencheur, constitué par la concentration intracellulaire de Ca^{2+} .

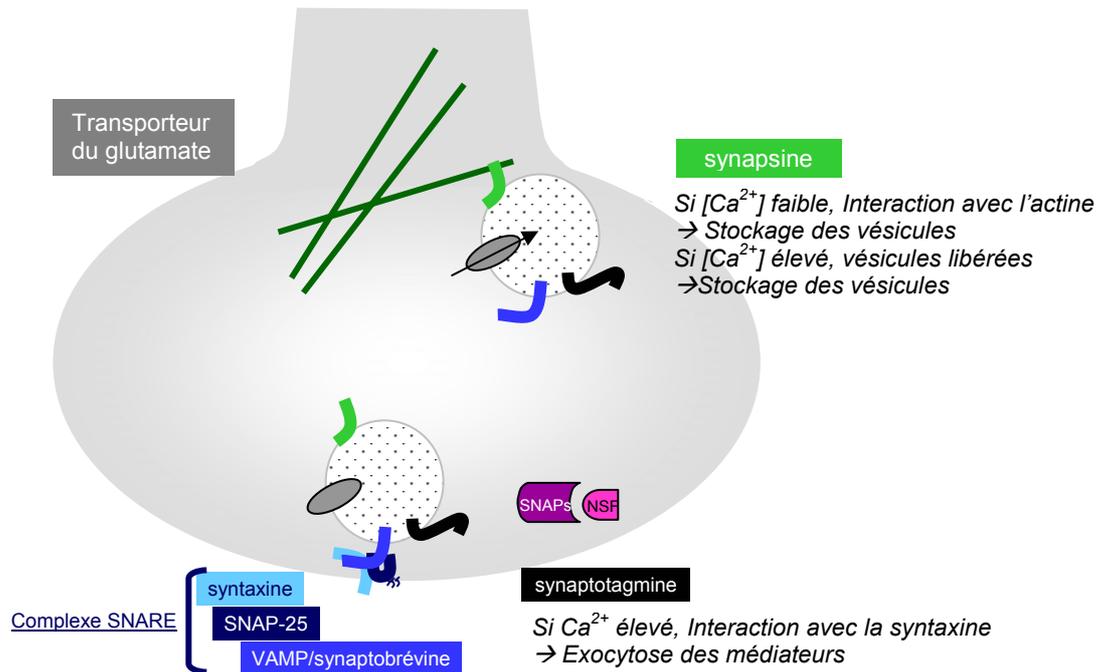


Figure 60 : Protéines intervenant dans le stockage et l'arrimage des vésicules de neurotransmetteurs dans la partie présynaptique.

L'arrimage d'une vésicule à la membrane se produit avec la formation du complexe SNARE, composé de deux protéines membranaires, la syntaxine et SNAP-25, et d'une protéine appartenant à la membrane de la vésicule VAMP/synaptobrevine. Ce complexe SNARE est ensuite reconnu par les protéines cytosoliques de la famille des SNAPs, qui, ainsi appariés, interagissent avec les protéines cytosoliques appelées NSF. Les NSF peuvent alors hydrolyser l'ATP ce qui peut-être provoque la dissolution du complexe SNARE et conduit à la fusion partielle de la vésicule avec la membrane présynaptique.

Si la concentration de calcium augmente de façon conséquente à proximité de la vésicule partiellement fusionnée, la synaptotagmine, protéine appartenant à la membrane de la vésicule, peut interagir avec la syntaxine et induire la fusion complète de la vésicule à la membrane.

La libération du médiateur est suivie par une endocytose qui délivre à l'intérieur du neurone des vésicules vides. Cette endocytose doit avoir lieu à la fois directement, et à la suite à la formation d'un puits de clathrine.

Les vésicules sont remplies localement de glutamate grâce au transporteur intégré à leur membrane. Puis, elles peuvent être stockées localement grâce à la liaison de la synapsine à

leurs membranes et à l'actine. Cette liaison disparaît lors de la phosphorylation de certains sites de la synapsine par des enzymes activés en présence d'ions calcium, comme la CaM-kinase II.

Un élément supplémentaire de régulation existe. En effet, les canaux calciques responsables de la libération du neurotransmetteur sont présents aux niveaux des sites de libération, et ils peuvent se lier à la syntaxine, ce qui les rend inactivables. Lorsque la syntaxine se lie à SNAP-25 ou à la synaptotagmine, le canal calcium redevient activable.

Nous quittons désormais la partie présynaptique pour nous consacrer exclusivement à ce qui se produit dans la partie post-synaptique. Cette zone, dense et structurée, est composée de récepteurs membranaires et d'éléments sous-membranaires formant la densité postsynaptique.

b) Récepteurs activés

Les récepteurs du glutamate sont composés de trois familles de récepteurs à canaux ioniques et d'une famille de récepteurs métabotropiques [Madden 2002].

Les récepteurs ioniques activés par le glutamate ont une structure différente des autres récepteurs ioniques présents dans le système nerveux central. En effet, ils sont composés de trois segments transmembranaires et d'un segment membranaire, et ces récepteurs ont ainsi la partie N-terminale extracellulaire et la partie C-terminale intracellulaire (Figure 61).

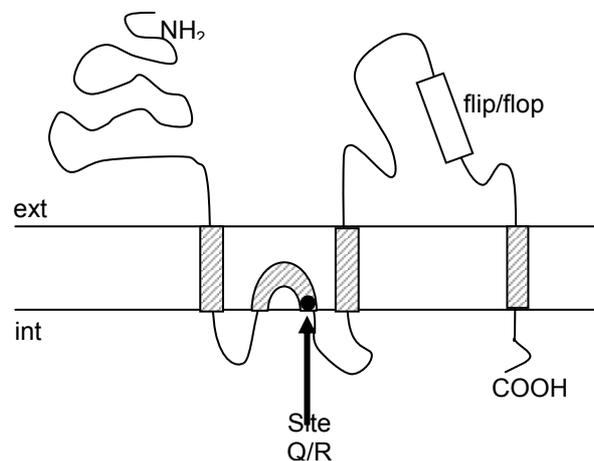


Figure 61 : structure schématique des récepteurs ioniques du glutamate

(1) Récepteurs NMDA

Cinq gènes différents codent pour les sous unités NMDA. Les récepteurs NMDA sont formés de l'association de plusieurs sous unités dont la sous unité NR1 sans laquelle les récepteurs NMDA ne peuvent pas être fonctionnels. NR1 est exprimé dans tout le système nerveux central tandis que NR2A, NR2B, NR2C et NR2D ne sont présents que dans certaines régions.

La composition des récepteurs en sous unités NR2A, B, C ou D détermine leur propriétés physiologiques.

Les récepteurs NMDA sont perméables aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} . Dans les conditions physiologiques et au potentiel de repos, les récepteurs activés ont leur pore bloqué par un ion Mg^{2+} , et la probabilité de blocage augmente avec l'hyperpolarisation de la membrane. Des mutations effectuées sur les sous unités réceptrices NMDA sur le site correspondant au site R/Q décrit pour les récepteurs AMPA indique que ce site est responsable, sur les sous unités NR2 du blocage par les ions Mg^{2+} et, sur NR1, de la perméabilité des ions Ca^{2+} .

En fait, les récepteurs NMDA ne peuvent être activés qu'en présence de l'acide aminé glycine qui est alors coagoniste avec le glutamate des récepteurs NMDA. La glycine se lie à un site présent sur NR1 et le glutamate, à un site localisé sur une sous unité NR2.

Le pore des récepteurs NMDA s'ouvre donc lorsque ceux-ci sont activés par le glutamate et la glycine, et que la membrane est dépolarisée, de sorte que l'ion Mg^{2+} s'échappe du canal. Les récepteurs NMDA ont donc une fonction de détecteur de coïncidences entre une excitation présynaptique et une excitation post-synaptique, ce qui leur donne la capacité de déclencher des processus de plasticité.

Enfin, des clichés de microscopie électronique montrent que les récepteurs NMDA sont, soit répartis de façon homogène dans la synapse, soit concentrés au centre de la synapse.

(2) Récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA et NMDA sont présents dans les mêmes synapses. La réponse à une activation est biphasique ; en effet, les récepteurs AMPA sont responsables de la réponse rapide de quelques millisecondes, et les récepteurs NMDA, de la réponse lente de plusieurs dizaines de millisecondes. La distribution spatiale des récepteurs AMPA diffère aussi de celle des récepteurs NMDA, puisqu'on trouve les récepteurs AMPA distribués également sur toute la synapse ou bien concentrés sur les bords de la synapse [Nusser 2000].

Les récepteurs AMPA proviennent de quatre gènes différents, qui forment les sous unités GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4 ; ils forment des tétramères contenant des proportions variables de chaque sous unité [Rosenmund 1998]. Leur activation induit une entrée d'ions Na^+ et une sortie plus faible d'ions K^+ , ce qui provoque la dépolarisation du neurone.

GluR2 est imperméable aux ions Ca^{2+} tandis que les autres sous unités présentent une certaine perméabilité. Cette différence de perméabilité provient de l'édition d'un site localisé dans la partie membranaire qui n'a lieu que dans GluR2 et avec un très fort pourcentage. Ainsi dans 99,9% des récepteurs GluR2, l'ADN code-t-il pour la glutamine, notée Q, avec le codon CAG

alors que l'ARN_m code pour l'arginine, notée R, avec le codon CGG, et l'on parle alors d'édition du site Q/R. La conductance en ions calcium des récepteurs AMPA augmente lorsque la sous-unité GluR2 est faiblement exprimée dans les tétramères. La partie membranaire de ces récepteurs joue donc un rôle dans la formation du pore.

L'application d'un agoniste à concentration saturante pendant un temps de plusieurs ms sur une portion membranaire de neurones provoque l'apparition d'un pic de courant qui progressivement diminue et atteint un plateau bien que l'agoniste soit toujours présent dans le milieu, ce qui correspond à la désensibilisation des récepteurs AMPA. En fait, il semble que celle-ci soit plus rapide lorsque les sous unités sont des variants d'épissage de type flip, et elle semble aussi dépendre de l'édition au niveau du site R/G.

(3) Récepteurs Kainates

Les récepteurs Kainates proviennent de 5 gènes différents, et forment deux familles. Les récepteurs GluR5, GluR6, GluR7, qui existent sous différentes formes d'épissage, ont une affinité avec le Kainate plus faible que les récepteurs KA1 et KA2. Ces récepteurs sont perméables aux ions Na⁺ et K⁺. Leurs propriétés fonctionnelles dépendent aussi de la composition en sous-unités.

(4) Récepteurs mGluR

Les récepteurs métabotropiques participent à la modulation lente de l'excitabilité synaptique. Ceux du groupe I, par exemple, inhibent l'ouverture de canaux potassiques qui, au potentiel de repos, sont ouverts, et induisent une dépolarisation postsynaptique de plusieurs secondes. Ce caractère modulant des récepteurs métabotropiques est en accord avec la localisation d'un grand nombre de ces récepteurs à la périphérie des synapses et sur la partie présynaptique.

Nous allons maintenant présenter des données expérimentales qui montrent que les protéines de la PSD influent sur l'organisation dynamique des récepteurs mGluR5 membranaires [Sergé 2002]. La sous unité mGluR5 interagit avec la protéine Homer qui appartient à la PSD. Homer existe sous des formes longues ou courtes qui sont capables de s'auto-assembler ou non. Des expériences d'immunochimie classique ont montré que les formes longues d'Homer induisent l'agrégation de mGluR5, ce qui n'est pas le cas des formes courtes. De plus, les expériences de SPT montrent que les mGluR5 alternent des phases de diffusion rapide et des phases de confinement. Les formes longues d'Homer augmentent la durée de confinement des récepteurs dans des sites qui sont colocalisés avec les protéines Homer ; alors que l'activation des récepteurs ne modifie pas la proportion de temps passé dans une phase de confinement.

Homer est donc une protéine d'échafaudage qui constitue un piège sur lequel les récepteurs viennent s'agréger de façon réversible.

Cette étude suggère l'importance des protéines de la densité post-synaptique, dans la variation du nombre de récepteurs à la synapse ; nous verrons qu'elles peuvent aussi avoir d'autres rôles.

Avant de nous intéresser aux protéines, autres que les récepteurs, présentes à la synapse, nous pouvons schématiser comme suit la répartition des récepteurs

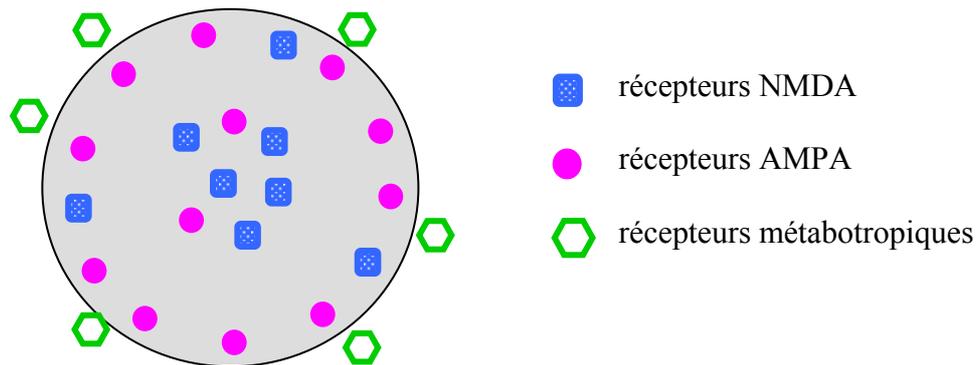


Figure 62: Vue de dessus de la synapse et de sa périphérie (seuls les récepteurs glutamatergiques sont représentés).

c) La densité postsynaptique (PSD)

En l'absence d'éléments stabilisants, les récepteurs, précédemment décrits, diffuseraient à la surface membranaire. Nous allons décrire ici les acteurs de densité postsynaptique, dont l'un des rôles est justement d'ancrer les récepteurs à la membrane synaptique.

(1) *Structure de la PSD*

Les photographies de synapses, réalisées en microscopie électronique, montrent sur la face postsynaptique une région membranaire dense aux électrons, que l'on appelle densité postsynaptique ou PSD. Cette région, ayant la forme d'un disque d'environ 400 nm de diamètre et 40 nm d'épaisseur, est très structurée, avec à la fois des composantes filamenteuses et des objets isolés, sans présenter de barrière la délimitant avec précision. En fait, la PSD comprend les protéines membranaires, dont font partie les récepteurs au neurotransmetteur puis, sous la membrane plasmique, un réseau lâche enserme des protéines, qui interagissent avec les récepteurs et diverses protéines, intervenant dans les voies de transduction.

Le réseau sous-membranaire (Figure 63) est formé d'actine et de fodrines, protéines de la famille des spectrines décrites pour les érythrocytes. L'actine est, en fait, responsable de la morphologie dynamique des épines dendritiques. La jonction synaptique est maintenue grâce aux molécules d'adhésion, telles que les cadhérines, les neuroligines et les neurexines. Les cadhérines, localisées à la périphérie de la synapse, [Uchida 1996], interagissent de façon homophile, tandis que la partie cytoplasmique postsynaptique est liée à l'actine et l'actinine α via les caténines β et α . La neurexine présynaptique interagit avec la neuroligine postsynaptique, dont la partie cytoplasmique possède un domaine PDZ (Figure 63) qui se lie avec la PSD95 ; ces protéines d'adhésion semblent réparties uniformément dans la synapse [Song 1999].

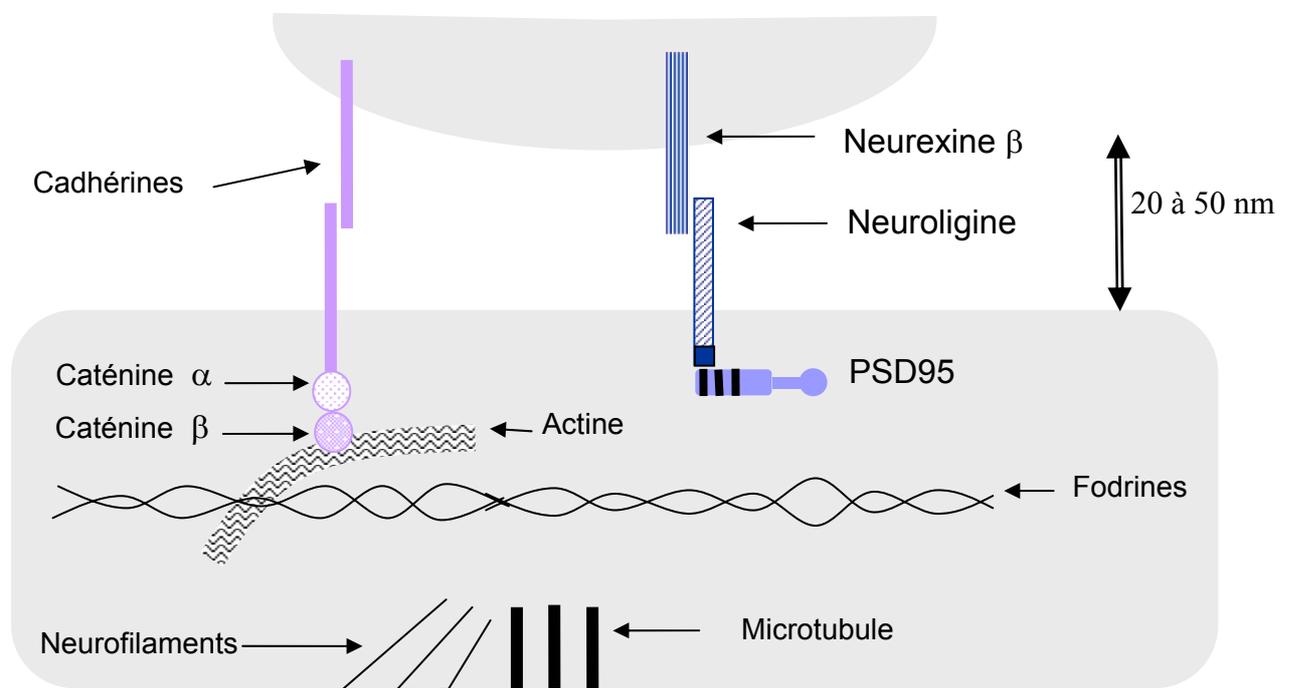


Figure 63 : Eléments du cytosquelette présents dans la partie post-synaptique et assurant la stabilisation de la jonction synaptique.

Les protéines présentes dans la PSD peuvent être classées en deux groupes ; en effet, les récepteurs interagissent directement avec une partie des protéines, qui peuvent, à leur tour, se lier à un second groupe de protéines. Toutes ces protéines forment ainsi un réseau dont la structure et les interactions semblent jouer un rôle primordial dans l'organisation des récepteurs à la surface de la synapse [Sergé 2002] ; aussi sont-elles nommées protéines d'échafaudage. Elles assurent, en fait, trois fonctions principales. Tout d'abord, elles stabilisent les récepteurs à la membrane synaptique. Elles régulent aussi le trafic des récepteurs entre les différents compartiments membranaires. Enfin, elles assemblent des

plateformes de signalisation. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux deux premières fonctions.

Nombre de protéines, qui sont en interaction avec les récepteurs, possèdent un ou plusieurs domaines PDZ. Un domaine PDZ est un motif de 90 acides aminés environ qui donne lieu à des interactions entre protéines, son nom provient des initiales des trois premières protéines sur lesquelles ce motif a été vu. Un domaine PDZ interagit souvent avec une séquence d'acides aminés contenue à l'extrémité de la partie C-terminale, et un classement des domaines PDZ a été créé en fonction de cette séquence.

(2) Protéines en interaction avec les NMDAr

L'une des premières protéines d'échafaudage des récepteurs NMDA à avoir été découverte, est la PSD-95. Elle appartient à la famille des 'Membrane-Associated Guanylyl Kinase' ou MAGUK, qui contiennent trois domaines PDZ, un domaine SH3 qui se lie aux séquences riches en proline et un domaine correspondant à une guanylyle kinase. La transfection, dans des cellules hétérologues, de ces récepteurs NMDA et de l'une des protéines MAGUK induit une agrégation des récepteurs. Les protéines MAGUK semblent être impliquées dans la stabilisation synaptique des récepteurs NMDA. Cependant, des neurones de souris, dont le gène de la PSD-95 a été modifié au niveau de ses domaines PDZ, présentent une agrégation synaptique normale des NMDAr, et même une LTP accrue [Migaud 1998]. La PSD-95 n'est donc pas un agent indispensable à la stabilisation synaptique des récepteurs NMDA. Il semblerait que la PSD-95 soit plutôt une protéine d'échafaudage des récepteurs AMPA (p.109). Ces protéines MAGUK servent aussi d'intermédiaire entre les NMDAr et des messagers secondaires. La PSD95 interagit notamment avec la protéine d'adhésion neuroligine. L'interaction secondaire des protéines MAGUK peut avoir lieu via le domaine guanylyl kinase comme c'est le cas avec la GKAP, 'Guanylyl-Kinase-Associated-Protein'. Cette protéine GKAP lie indirectement les protéines MAGUK à l'actine, aux récepteurs métabotropiques, et à la chaîne légère de la dynéine qui participe à la composition de plusieurs moteurs moléculaires.

D'autres protéines, comme l' α -actinine-2 ou les filaments intermédiaires qui ne se lient qu'à la sous-unité NR1, assurent une interaction directe entre les récepteurs NMDA et le cytosquelette. Lorsqu'un agent pharmacologique dépolymérisant l'actine est ajoutée sur des neurones d'hippocampe de rat en cultures, seules les CamKII, α -actinines-2 et drebrines sont dispersées ; la distribution de la PSD-95 et de la GKAP, qui constituent le cœur de la PSD et

qui sont pourtant indirectement liés à l'actine, reste inchangée [Allison 2000]. La dépolymérisation des microtubules n'affecte aucune de ces protéines.

Enfin, la Calmodulin Kinase II (CaMKII) est la protéine de signalisation la plus abondante dans la PSD. Son inhibition empêche l'apparition du phénomène de LTP ; elle a donc un rôle essentiel dans le fonctionnement de la synapse [Malenka 1989]. La CaMKII forme une couronne de 20nm de diamètre et 20nm de hauteur. Ce volumineux complexe se lie aux parties C-terminale des sous-unités NR2, ce qui assure, notamment, sa présence à proximité des récepteurs membranaires qu'elle peut ainsi aisément phosphoryler. La CaMKII peut aussi interagir avec le cytosquelette via l' α -actinine. La CaMKII exerce sa fonction kinase dès que la calmoduline, préalablement activée par la liaison d'ions calcium, se fixe sur elle. Lors du phénomène de LTP, un processus d'autophosphorylation de l'enzyme prolonge son activité indépendamment de la concentration du milieu en ions calcium et cela jusqu'à la survenue d'une phosphatase.

En conclusion, les protéines interagissant avec les NMDAr assurent à la fois la mise en place de cascades enzymatiques, mais aussi le lien de ces récepteurs avec le cytosquelette des synapses et avec les dispositifs de transport des protéines (Figure 64).

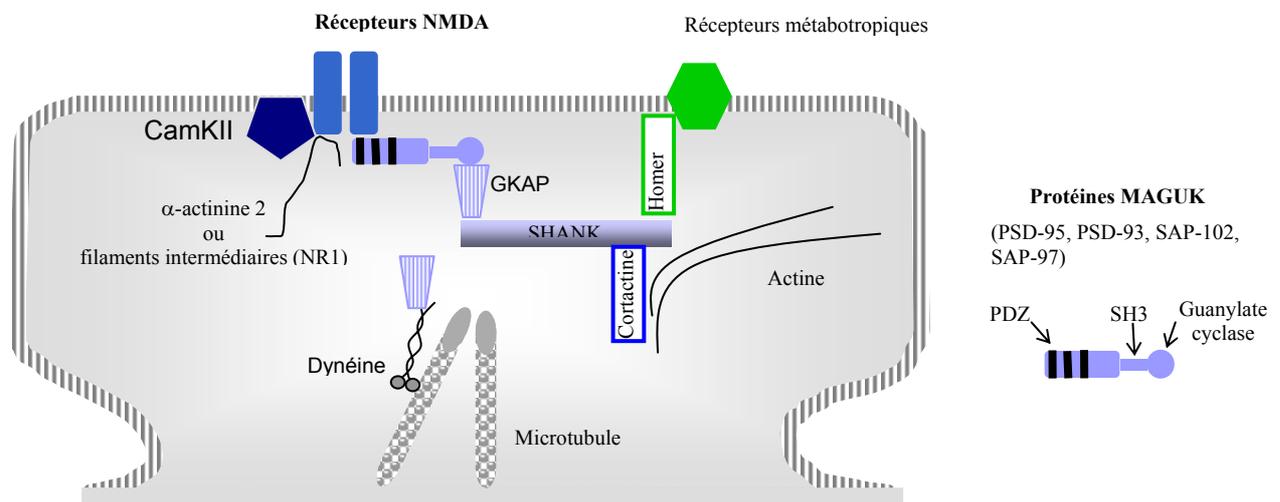


Figure 64: protéines d'échafaudage des récepteurs NMDA

(3) Protéines en interaction avec les AMPAR

Plusieurs protéines, telles que les protéines GRIP/ABP ou PICK1, constituent, aujourd'hui d'hypothétiques ancrages synaptiques pour les récepteurs AMPA. Ces protéines sont liées aux

AMPAr par leurs domaines PDZ. Elles interagissent aussi avec d'autres protéines activant des voies de signalisation (Figure 65).

GRIP, 'Glutamate Receptor Interacting Protein', et ABP, 'AMPA receptor Binding Protein', ont des structures proches et une homologie de 64 à 93% de leurs 7 domaines PDZ. Ces deux protéines peuvent former des homodimères et des hétérodimères. Elles se lient à la partie C-terminale de GluR2 et GluR3, mais leur transfection, dans des cellules hétérologues, avec ces récepteurs AMPA ne provoque pas d'agrégation des récepteurs [Osten 2000].

PICK1, 'Protein Interacting with C-Kinase', interagit avec son unique domaine PDZ à la fois à GluR2, GluR3 et GluR4 et, à la protéine kinase C. PICK1 existe sous forme dimérique, permettant le rapprochement spatial des récepteurs AMPA et de la PKC. Sa transfection, dans des cellules hétérologues avec ces récepteurs AMPA, induit l'agrégation des récepteurs. PICK1 semble intervenir dans l'adressage de ces récepteurs à la synapse ou à leur stabilisation.

Il a été montré qu'une protéine de la famille MAGUK, la SAP97, peut se lier à la partie C-terminale de GluR1, et l'on a vu précédemment que cette famille de protéines se liaient à différents éléments du cytosquelette.

D'autres protéines dépourvues de domaines PDZ peuvent se lier aux récepteurs AMPA et jouer un rôle éventuel dans leur agrégation à la synapse.

C'est le cas de la protéine NSF qui interagit avec un domaine de 10 acides aminés contenus dans la partie C-terminale de GluR2 et GluR3. La NSF est une ATPase qui intervient dans l'exocytose de vésicules, et elle est fortement concentrée dans la PSD. L'inhibition de son action stoppe la LTP [Lledo 1998] ; le blocage de l'interaction NSF/ AMPAr réduit la réponse synaptique en courant AMPA [Noel 1999]. La NSF intervient donc dans l'insertion à la membrane synaptique ou dans la stabilisation à la synapse des récepteurs AMPA.

La protéine α,β -SNAP, qui appartient aussi à la machinerie de fusion des vésicules, peut se lier de façon indépendante aux récepteurs AMPA et à NSF.

Enfin, la protéine extracellulaire NARP, qui se multimérise grâce à des liaisons disulfides, est capable d'agréger les récepteurs d'AMPA tant dans les neurones que dans les lignées hétérologues ; elle intervient donc peut-être aussi dans l'accumulation synaptique des AMPAr d'autant que sa sécrétion et son activité dépendent de l'activité neuronale [O'Brien 2002].

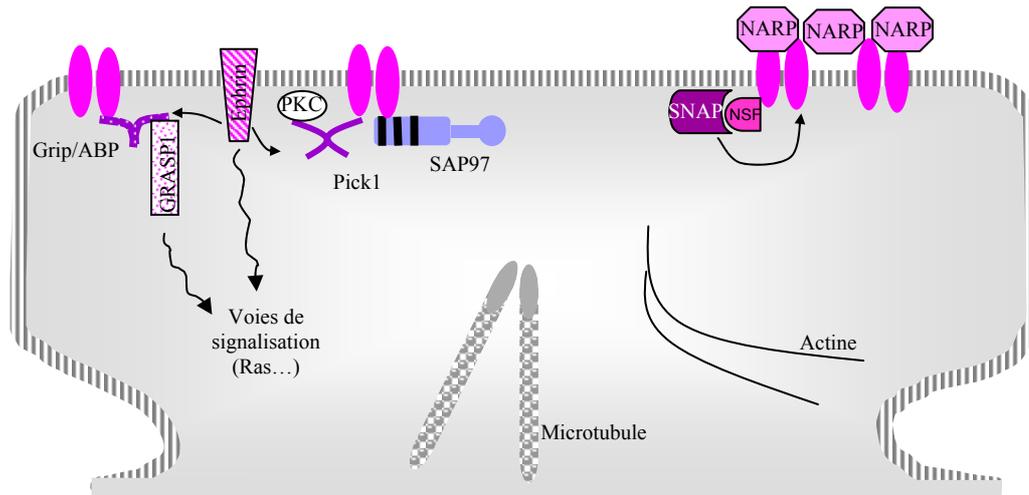


Figure 65: protéines d'échafaudage des récepteurs AMPA

3. LTP et LTD

Afin de comprendre comment la plasticité synaptique se traduit au niveau de la structure moléculaire de la synapse et assure une modification de la réponse post-synaptique, nous nous intéressons aux phénomènes de LTP et LTD, et plus particulièrement aux formes dépendantes de l'activité des récepteurs NMDA.

a) Introduction

Bliss et Lomo découvrent, en 1973, le phénomène de Long Terme Potentialisation (LTP), dans les hippocampes de lapin [Bliss 1973]. Après avoir appliqué des excitations répétées à une fréquence élevée sur une afférence à l'hippocampe, ils constatent que les PPSE mesurées à ces synapses après une simple stimulation est plus élevée qu'avant l'activation spécifique et que cette potentialisation dure plusieurs heures. Ce phénomène résulte d'un renforcement de l'efficacité synaptique consécutif du protocole de tétanisation.

Dans l'hippocampe, la LTP sur les synapses de CA1 est obtenu en appliquant un train de stimuli de 100Hz pendant 1s sur les collatérales de Schaffer (CA3) ou selon un protocole d'appariement dans lequel, simultanément, la partie présynaptique est activée par une stimulation à haute fréquence, et la partie postsynaptique est dépolarisée.

La LTP se traduit par l'augmentation du courant AMPA, mais la LTP de la voie collatérale de Schaffer est associative, c'est-à-dire que l'augmentation du courant AMPA ne se produit que si les récepteurs NMDA sont activés. En effet, si un antagoniste des récepteurs AMPA est appliqué durant le protocole d'appariement, la potentialisation de l'efficacité

synaptique est préservée ; en revanche, elle est abolie quand un antagoniste des NMDAr est appliqué durant le protocole d'appariement, de même si l'on applique un antagoniste des AMPAr lors d'une stimulation tétanique. La LTP ne peut donc se produire que si les parties présynaptique et postsynaptique sont activées simultanément soit par le protocole d'appariement, soit par l'intermédiaire des AMPAr qui dépolarisent la partie post-synaptique. La LTP est aussi inhibée lorsque le calcium intracellulaire est chélaté. Les ions calcium sont donc des messagers indispensables de la voie de signalisation conduisant à la LTP.

La LTP n'est qu'une expérience de laboratoire dont les effets rappellent des caractéristiques attendues pour le stockage de la mémoire. En fait, lorsqu'une sous-unité des récepteurs NMDA est sélectivement supprimée des cellules CA1 de l'hippocampe de rats, ceux-ci présentent à la fois une perturbation de la LTP et de la mémoire spatiale [Tsien 1996]. Afin de s'assurer que les phénomènes observés n'étaient pas dus à un développement anormal de l'animal, des souris mutantes ont été créées avec un transgène muté de la CaM kinase II, une des kinases essentielles à l'apparition de la LTP, activables grâce à une drogue spécifique [Mayford 1996]. Après activation, la CaMKII mutante est surexprimée dans l'hippocampe de ces souris et, de nouveau, un déficit de la LTP et de la mémoire spatiale est observé. Ces expériences montrent une certaine corrélation entre la mémoire spatiale et les mécanismes moléculaires en jeu dans la forme NMDA dépendante de la LTP, existant dans la voie CA3 de l'hippocampe.

Le renforcement synaptique, qui se produit durant la LTP, peut être causé par l'augmentation de trois éléments, à savoir le nombre de récepteurs AMPA aux synapses, la conductivité de ces mêmes récepteurs, ou le nombre de vésicules de glutamate libérées par la partie présynaptique. En fait, il semble que ces trois mécanismes participent à la LTP. Tout d'abord, il existe un messenger rétrograde, le monoxyde d'azote, dont la production est activée par l'augmentation de la concentration calcique, consécutive au déclenchement de la LTP [Platenik 2000]. Cette molécule diffuse jusque dans la partie présynaptique induisant une synthèse accrue des neurotransmetteurs, et finalement le nombre de vésicules de glutamate libérées est plus important. Ensuite, la LTP correspond effectivement à une augmentation du nombre de récepteurs GluR1 phosphorylés à la serine 831 [Barria 1997], dont la conductance, mesurée *in vitro*, est augmentée [Derkach 1999]. Enfin, il a été montré que l'activation sélective des récepteurs NMDA conduisait à une augmentation non seulement de l'efficacité synaptique mais aussi, du nombre de récepteurs AMPA surfaciques [Lu 2001].

Le maintien à long terme d'une structure synaptique dont l'efficacité est accrue semble faire appel à une synthèse nouvelle de protéines, impliquées dans cette structure. Ainsi, une

forte hausse de la concentration de calcium cytosolique, comme cela survient lors de la potentialisation synaptique, provoque une activation importante de la protéine kinase A, qui, dans le noyau, phosphorylerait la protéine CREB (cAMP response element binding protein). La protéine CREB pourrait alors déclencher de nouvelles synthèses protéiques, et en particulier celle de récepteurs [Abel 1997].

L'affaiblissement de l'efficacité synaptique peut aussi être obtenu sur ces mêmes neurones en appliquant une stimulation à basse fréquence. La LTD nécessite aussi l'activation des récepteurs NMDA mais modérée, agissant à nouveau à travers la concentration intracellulaire de calcium.

b) Les NMDAr, un rôle déclencheur

Les observations réalisées en microscopie électronique sur des neurones d'hippocampe [Nusser 2000, Takumi 1999] montrent une grande hétérogénéité de la composition en récepteurs AMPA de synapses formées sur des cellules différentes mais innervées par la même afférence, alors que toutes ces synapses contiennent des récepteurs NMDA. De plus, dans les synapses contenant NMDAr et AMPAr, le nombre de récepteurs NMDA est proportionnel au diamètre de la synapse tandis que celui des récepteurs AMPA est proportionnel à la surface de la synapse. La proportion d'AMPAr par rapport aux NMDAr est donc directement liée à la taille de la synapse. Au cours de la maturité, le nombre des synapses dépourvues de récepteurs AMPA semble décroître. Cela peut être corrélé avec l'existence de synapses silencieuses qui reçoivent le glutamate libéré par la partie présynaptique fonctionnelle mais qui ne répondent pas faute de récepteurs AMPA. Ces synapses silencieuses produisent des PPSE au cours de la formation des circuits neuronaux selon le mécanisme de Hebb [Malenka 1997]. Dernièrement, une étude portant sur ces synapses silencieuses montre qu'une stimulation présynaptique, du type de celle habituellement employée pour tester la réponse synaptique, est capable d'induire le départ des récepteurs AMPA mais pas NMDA, hors des synapses, ce qui a pour effet de créer des synapses silencieuses [Xiao 2004]. Ces données suggèrent que les synapses silencieuses seraient donc essentiellement des artefacts.

L'exocytose des NMDAr est régulée par l'action de la PKC. La Protéine Kinase C déclenche une exocytose lente des récepteurs à la surface membranaire du réticulum endoplasmique ; elle agit aussi sur les protéines formant le complexe SNARE, provoquant une exocytose rapide à la membrane cytoplasmique. L'endocytose des récepteurs NMDA est,

elle aussi, régulée. Les récepteurs NMDA sont présents de façon stable dans des synapses matures et la LTD se traduit généralement par une diminution du nombre de récepteurs AMPA mais aucune modification de la densité de récepteurs NMDA [Caroll 2002]. Cependant, il a été montré que l'application répétée d'un agoniste pouvait induire l'endocytose des récepteurs NMDA à de telles synapses, et que cette endocytose mettait en jeu des tyrosines phosphatases [Vissel 2001]; ce mécanisme intervient peut-être dans certaines formes de LTD. De plus, l'application d'une stimulation tétanique sur des neurones matures a entraîné une modification du nombre des récepteurs NMDA, régulée par la PKC et la tyrosine kinase, laissant le nombre des récepteurs AMPA invariants [Grosshans 2002]. Récemment, il a été observé sur des neurones du néocortex que l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la synapse, qui se produit lors de la LTP, est en fait suivie par une hausse du courant NMDA avec un décalage de 2h. Ainsi, les récepteurs AMPA et NMDA semblent contribuer au courant synaptique, dans des proportions identiques, que les neurones soient en conditions basale ou après quelques heures de LTP [Watt 2004].

4. Modèles de trafic des récepteurs AMPA

Le trafic des récepteurs, qui se produit de façon constitutive ou durant les phénomènes de LTP ou de LTD, est décrit par un modèle en quatre étapes (Figure 66). Les récepteurs sont, tout d'abord, insérés à la membrane, puis ils sont stabilisés à la surface synaptique, avant d'être internalisés, et d'être dégradés ou recyclés.

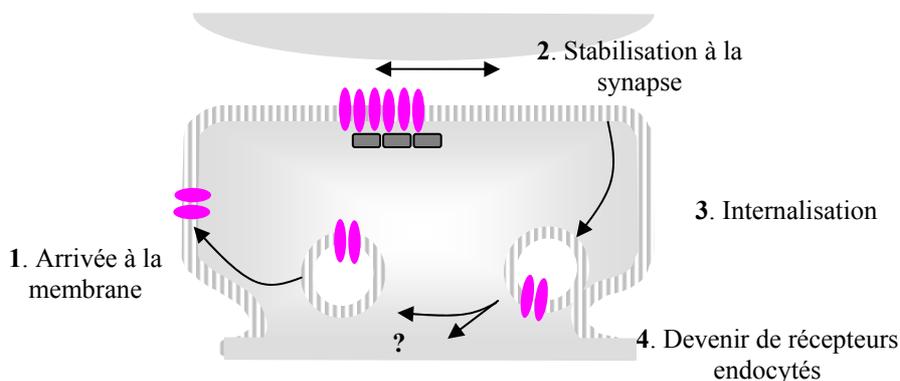


Figure 66: Les différentes étapes de la circulation des récepteurs AMPA

a) Arrivée des récepteurs à la membrane

Les récepteurs AMPA se trouvant dans les neurones matures d'hippocampe de rats sont composés soit par les sous unités GluR2/ GluR3, soit par les sous unités GluR2/ GluR1 [Wenthold 1996]. Il a été montré sur des tranches d'hippocampe, infectés par des récepteurs mutés qui présentent une signature électrophysiologique les rendant détectables à la synapse,

que les récepteurs AMPA, présents à la synapse, sont constitués, des sous unités GluR2 et GluR3, dans les conditions basales, et des unités GluR2 et GluR1, lors de la LTP Shi). Cette même étude montre que la partie C-terminale de GluR2 gouverne l'adressage à la membrane des récepteurs AMPA dans les conditions basales, alors que, lors de la LTP, elle perd son rôle dominant au profit de la partie C-terminale de GluR1. De plus, l'exocytose des GluR2, dans les conditions basales, est rapide comparée à celle des GluR1 lors d'un protocole d'activation des récepteurs NMDA [Passafaro 2001].

L'exocytose des récepteurs GluR1 met en jeu l'activation de la kinase II dépendante de la calmoduline (CamKII) qui active une voie de signalisation dans laquelle intervient la GTPase Ras puis la MAPkinase et la PI3 kinase [Zhu 2002]. Cette exocytose a lieu indépendamment de l'état du site de phosphorylation de la CamKII, mais elle est affaiblie par la mutation de la partie C-terminale de GluR1. Ce site est connu pour interagir avec SAP97, cependant des souris possédant une protéine SAP97 tronquée ne présente pas de défaut dans son accumulation synaptique.

Enfin, la phosphorylation de la sérine 845 de GluR1 accroît l'efficacité synaptique mais sa fonction est encore inconnue [Ehlers 2000].

b) Stabilisation des récepteurs AMPA à la synapse

En fait, si la stabilisation des récepteurs à la surface synaptique est importante pour engendrer la potentialisation, les protéines d'ancrage ne sont pas connues avec certitude. GRIP/ABP semblerait assurer la stabilisation à la membrane puisque des GluR2, dépourvus de leur domaine PDZ se liant à GRIP/ABP, s'accumulent plus faiblement à la synapse [Osten 2000]. Les protéines à domaines PDZ sont des candidats de même que la PSD-95 qui est liée aux récepteurs AMPA via la protéine stargazine. L'ancrage de la PSD-95 à la membrane peut être régulée, mais aucune donnée quantitative n'indique dans quelle mesure la quantité de PSD-95 peut varier, ni son lien avec la modification du nombre de récepteurs AMPA.

c) Internalisation des récepteurs

La LTD induit une internalisation massive des récepteurs AMPA, gouvernée par la partie C-terminale de GluR2, en fait par une séquence particulière et spécifique selon que la LTD est induite par l'application d'AMPA ou de NMDA [Lin 2000]. Diverses voies doivent donc être mises en jeu conduisant à l'endocytose des récepteurs.

Les récepteurs sont endocytés dans des puits de clathrine dont la formation dépend de la présence de dynamine [Carroll 1999a]. La protéine d'adaptation à la clathrine, AP2, interagit avec un domaine spécifique de la partie Cterminale de GluR2, de même qu'avec GluR1.

La LTD correspond aussi à une augmentation de la phosphorylation de la serine 880 de GluR2 ; or, cela se traduit par une interaction de GluR2, non plus avec GRIP mais avec PICK1. La surexpression de PICK1 induit justement l'internalisation des récepteurs. La kinase réalisant cette phosphorylation est peut-être la protéine kinase C.

Simultanément à l'endocytose des récepteurs AMPA, il a été constaté une diminution de la quantité d'actine présente dans les épines dendritiques ; cependant, la dépolymérisation ne semble pas être un élément nécessaire à l'internalisation des récepteurs [Beattie 2000].

d) Devenir des récepteurs endocytés

Les récepteurs peuvent être stockés dans une réserve intracellulaire comme en témoignent les ultrastructures obtenues en microscopie électronique. Le maintien dans ce stock des récepteurs GluR2 décroît fortement en l'absence d'interaction avec GRIP1/ABP [Braithwaite 2002].

Les récepteurs AMPA internalisés, suite à l'activation des récepteurs NMDA, se retrouvent dans l'endosome précoce ; cette internalisation requiert un taux élevé d'ions calcium et la présence de phosphatases. Ces récepteurs AMPA sont alors majoritairement recyclés vers la membrane extracellulaire [Ehlers 2000, Passafaro 2001]. En revanche, les récepteurs internalisés après l'ajout d'AMPA sont conduits dans les lysosomes indépendamment de la concentration calcique ou de la présence de phosphatases [Elhers 2000].

5. *Quelques questions en suspens*

a) Etape supplémentaire avant l'entrée dans la synapse ?

L'activation des récepteurs NMDA synaptiques déclenche des mécanismes différents de ceux produits par l'activation des récepteurs extra-synaptiques, mécanismes qui concernent par exemple l'endocytose des AMPAr [Lu 2001]. Dans les neurones en cours de développement, la diffusion latérale des récepteurs NMDA, entre l'intérieur et l'extérieur des synapses, a été mesurée grâce à des techniques d'électrophysiologie [Tovar 2002]. Elle pourrait permettre une régulation rapide du nombre et de la composition en sous unités des récepteurs NMDA présents à la synapse. Ces données montrent que la diffusion latérale des récepteurs NMDA

entre les compartiments synaptiques et extra-synaptiques joue un rôle important dans la régulation de l'efficacité synaptique mise en jeu lors de la LTP et de la LTD.

L'exocytose des récepteurs GluR1 a lieu à l'extérieur des synapses [Passafaro 2001], de même que leur endocytose [Blanpied 2002]. Il doit donc exister une étape de diffusion membranaire précédant l'entrée de la synapse.

La souris mutante *stargazer* a un comportement ataxique et souffre de hochements incontrôlés de la tête ainsi que de crises d'épilepsie. Ces caractéristiques comportementales proviennent de la suppression d'un gène codant pour la protéine de 38 kD appelée stargazine qui est une protéine à quatre segments transmembranaires. Cette protéine est présente principalement dans les cellules grains du cervelet [Letts 1998]. Bien que cette protéine ait une structure semblable à celle d'une sous unité de canal calcium, l'activité des canaux calcium des neurones de cervelet de *stargazer* est inchangée [Chen 2000]. En revanche, dans ces neurones, la réponse AMPA, à une activation localisée aux synapses par stimulation électrique ou étendue grâce à une injection de glutamate, est quasi nulle. L'absence de stargazine induit un défaut d'adressage à la membrane et à la synapse et non de synthèse protéique puisque l'on trouve l'ARNm des récepteurs, en quantité, dans ces cellules.

La protéine stargazine interagit avec la protéine PSD-95 et les récepteurs AMPA. Plus précisément, sa partie C-terminale se lie au domaine PDZ de la PSD-95 ; la nature de son interaction avec les récepteurs AMPA n'est pas encore élucidée. La mutation de la partie C-terminale de la stargazine empêche l'agrégation des récepteurs AMPA à la synapse, alors que leur expression à la membrane du neurone est inchangée. La protéine stargazine est indispensable à l'accumulation synaptique des AMPA qui se produit en deux étapes. Tout d'abord, l'interaction Stargazine/ récepteurs AMPA assure l'adressage membranaire des récepteurs, puis l'interaction de la Stargazine avec la PSD-95 conduit les récepteurs AMPA dans la synapse (Figure 67).

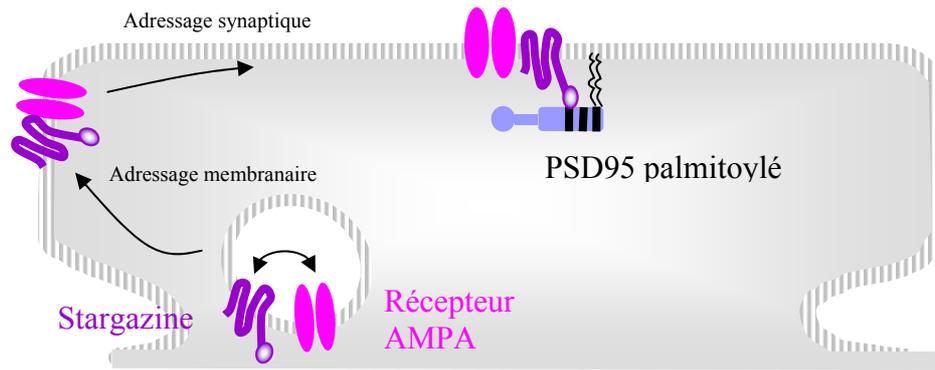


Figure 67: Effet supposé de l'interaction des récepteurs AMPA avec la PSD-95, via la stargazine.

Dans les souris stargazer, seuls les neurones du cervelet sont touchés par l'absence de stargazine. Cependant, il est possible que des protéines de la même famille entre en jeu dans l'adressage. En effet, la transfection, dans des neurones d'hippocampe, d'une stargazine, dont la partie C-terminale est tronquée, induit une diminution de la réponse AMPA à une stimulation locale. Dans les neurones d'hippocampe, cette stargazine mutée a eu un effet dominant négatif sur une interaction du même type, mettant en jeu les récepteurs AMPA et une protéine inconnue.

L'agrégation des récepteurs AMPA s'accroît aux synapses si l'on augmente le nombre de PSD-95 à la membrane, or cette protéine est liée à la membrane par un acide gras dont la liaison à PSD-95 peut être régulée, par la protéine thioestérase [El Din El-Husseini 2002].

Une autre protéine, la NSF, semble intervenir dans l'adressage synaptique des récepteurs AMPA, ce qui souligne l'existence d'une cinquième étape dans le trafic des récepteurs AMPA. En effet, la suppression de l'interaction entre NSF et GluR2 provoque la disparition de l'accumulation de récepteurs à la synapse sans changer la répartition des récepteurs extrasynaptiques [Lee 2002, Braithwaite 2002]. De plus, NSF est capable de dissocier *in vitro* le complexe formé par GluR2 et PicK1, peut-être cette étape est elle nécessaire pour permettre l'entrée de GluR2 dans une synapse densément occupée.

En conclusion, il apparaît que le nombre de récepteurs AMPA à la surface synaptique varie suite à la modification du taux d'exocytose, mais aussi au changement de la diffusion des récepteurs à la membrane consécutif à des interactions diverses.

Aren Borgdorff et Daniel Choquet ont pu suivre les récepteurs GluR2, grâce à la technique de suivi de particules, sur des neurones vivants d'hippocampe ; les récepteurs suivis sont donc

exclusivement extra-synaptiques [Borgdorff 2002]. Ce récepteur alterne des mouvements diffusifs rapides, avec un coefficient moyen de diffusion environ égal à $8 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, et des mouvements diffusifs lents, avec un coefficient moyen de diffusion environ égal à $0.2 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. A mesure que les neurones deviennent matures, les récepteurs demeurent confinés pendant des durées plus longues sur des surfaces plus étendues, et la diffusion, hors période de confinement, ralentit. De plus, les lieux de résidence sont proches des synapses comme le prouve l'histogramme des distances séparant ces lieux avec le marquage synaptique. En revanche, il semble que les récepteurs ne sont que minoritairement arrêtés sur le lieu d'endocytose que constituent les puits de clathrine. En fait, le confinement des récepteurs GluR₂ est déclenché par une augmentation locale de calcium intracellulaire, ce qui est réalisé par la photolyse sous U.V. d'un chélateur calcique. Cela démontre que la diffusion des récepteurs AMPA est régulée par des phénomènes induisant des modifications de concentration calcique, comme par exemple la LTP ou la LTD. Dans ces deux cas, comme nous l'avons déjà vu, la variation de concentration calcique entraîne notamment une modification des protéines formant la densité post-synaptique, ce qui induit une stabilisation des récepteurs à la synapse.

b) Composition des vésicules transportant les récepteurs

Une autre interrogation non résolue concerne la façon dont s'effectue l'arrivée à la membrane, puis le départ des récepteurs. En effet, la LTP se traduit par l'arrivée massive de récepteurs AMPA à la surface d'abord, puis à la synapse. Mais, pour l'instant, la composition exacte des vésicules reste inconnue, tout comme le nombre de récepteurs amenés par une vésicule. On sait que les vésicules de neurotransmetteurs délivrent des quanta de neurotransmetteurs ; en est-il de même pour les vésicules transportant les récepteurs AMPA ? Une question semblable peut se poser pour l'endocytose. Dans un tel cas, la variation du nombre de récepteurs à la surface impliquerait une régulation majeure des taux d'endocytose et d'exocytose. De plus, il existe deux types d'hétéromultimères des récepteurs AMPA, et l'on ignore si le recyclage constitutif des GluR_{2/3} s'opère de façon semblable à l'exocytose des GluR_{1/2}, qui se produit lors de la LTP.

III. Mobilité de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA à l'extérieur et à l'intérieur des synapses

Dans les expériences présentées ci-dessous nous avons cherché à observer les mouvements diffusifs de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA. Les travaux de Borgdorff et al., décrits précédemment, ont prouvé l'existence de mouvements diffusifs des GluR2 à l'extérieur des synapses, ainsi que leur corrélation avec des variations de calcium intracellulaires, dont on sait qu'elle est un facteur déterminant des phénomènes de LTD et LTP. Cependant, la technique utilisée étant le suivi de particules uniques, le comportement des GluR2 à l'intérieur des synapses n'a pas pu être enregistré (Figure 7). Nos expériences, utilisant la technique de molécule unique présentée dans le premier chapitre, ont permis de s'affranchir de cette limitation et d'étudier la diffusion des GluR2 aussi bien à l'extérieur des synapses, qu'à l'intérieur.

A. Dispositif expérimental et méthode d'analyse

1. Montage optique

Le dispositif (Figure 68) a été décrit précédemment (Chapitre 1, V). Comme nous observons des cellules vivantes, un système de chauffage a été ajouté au microscope d'épi-fluorescence. Il s'agit d'une soufflerie d'air chauffé à 37°C, qui est dirigée sous la platine dans un volume maintenu fermé. Une sonde est fixée à proximité de l'échantillon de façon à stabiliser la température au niveau de l'échantillon à 37°C. De plus, un système DIC a été ajouté afin de visualiser les neurones. Un filtre passe bas a été placé devant la lampe blanche de façon à limiter l'absorption par l'échantillon. La fréquence d'acquisition de la caméra a été choisie égale à 33Hz.

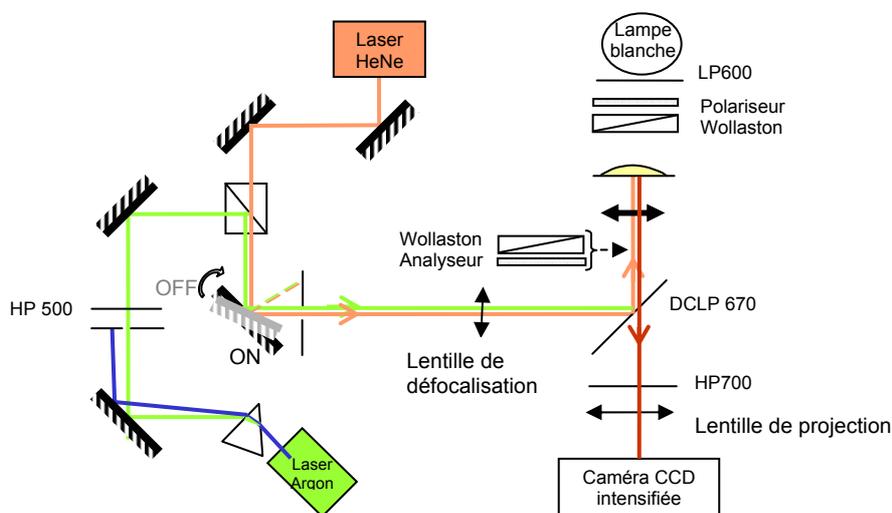


Figure 68: Montage optique

2. *Echantillon biologique*

a) Neurones en cultures

Les neurones observés proviennent de cultures dissociées d'hippocampe de rats. La dissection suit la technique développée par Banker [Hoop 1998]. Les neurones prélevés sur des embryons de rat sont dissociés dans un milieu contenant de la trypsine, puis dans un milieu de culture dépourvu de trypsine, ils sont triturés à l'aide d'une pipette pasteur, puis étalés à la concentration désirée sur des lamelles. Un dizaine d'heures après, les lamelles sur lesquelles se sont fixées les neurones, sont retournées sur de la glie mise en culture les semaines précédentes, qui va assurer l'équilibre du milieu nécessaire à la survie des neurones (Figure 69). A ce milieu, est ajouté l'Ara_C, qui détruit les cellules se multipliant i.e. spécifiquement ici les cellules gliales, afin de limiter la prolifération des glies jeunes présentes sur les lamelles.

Les cultures ainsi préparées sont constituées essentiellement de neurones. Dans les cultures non dissociées, glies et neurones sont présents à la surface des lamelles de cultures. Or, les glies sont très autofluorescentes, et elles affichent généralement un marquage important. Cette culture dissociée permet ainsi de réduire notablement le fond.

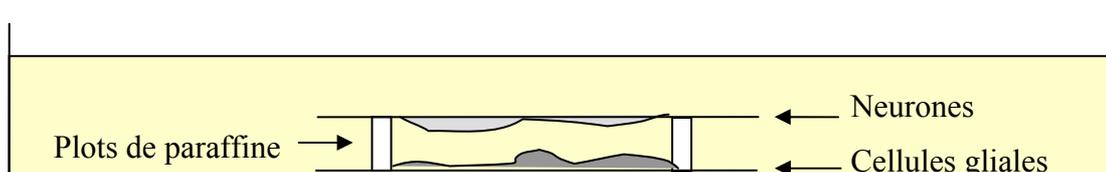


Figure 69: Schéma des échantillons neuronaux obtenus grâce à la culture de neurones à la Banker.

b) Marquage synaptique

Le FM4-64 est reconnu comme un marqueur valide des synapses [Ryan 2001]. Non fluorescent en milieu aqueux, il émet au-delà de 650nm après avoir été intégré à une membrane. Il s'incorpore notamment dans le feuillet interne des vésicules synaptiques qui fusionnent avec la membrane lors de la dépolarisation du neurone. Le marquage à l'aide du FM4-64 requiert donc une activation préalable des neurones par ajout de KCl. Lors des expériences contrôle, réalisées en présence de TTX, les synapses ont été marquées avec du FM1-43, marqueur analogue au FM4-64. Comme nous souhaitons pouvoir modifier l'état des neurones grâce à l'ajout de produits pharmacologiques, nous avons ensuite cherché un marqueur qui n'impose pas d'activation spécifique, comme par exemple la rhodamine 123.

La rhodamine 123 se lie aux membranes fortement polarisées, et en particulier celles des mitochondries. Or nous avons vu dans la partie 1 que la terminaison synaptique est très riche en mitochondries, d'où l'utilisation de la rhodamine 123 comme marqueur synaptique [Yoshikami 1984].

Nous avons vérifié la validité de ce marquage synaptique en le comparant avec un marquage des synapses obtenu avec le FM4-64. Le marquage à la rhodamine 123 est réalisé en incubant les neurones dans du milieu contenant de la rhodamine 123 (2 μ M) et du tampon Hepes (20mM), pendant 5 min et à 37°C, suivi d'un rinçage. Le marquage au FM4-64 est obtenu en incubant les neurones, dans du milieu contenant du FM4-64 (5 μ M), du KCL (40 mM) et de l'Hepes (20mM), pendant 30 s et à 37°C, suivi d'un rinçage. Les deux marquages (Figure 70) coïncident à environ 70% avec celui réalisé par le FM4-64.

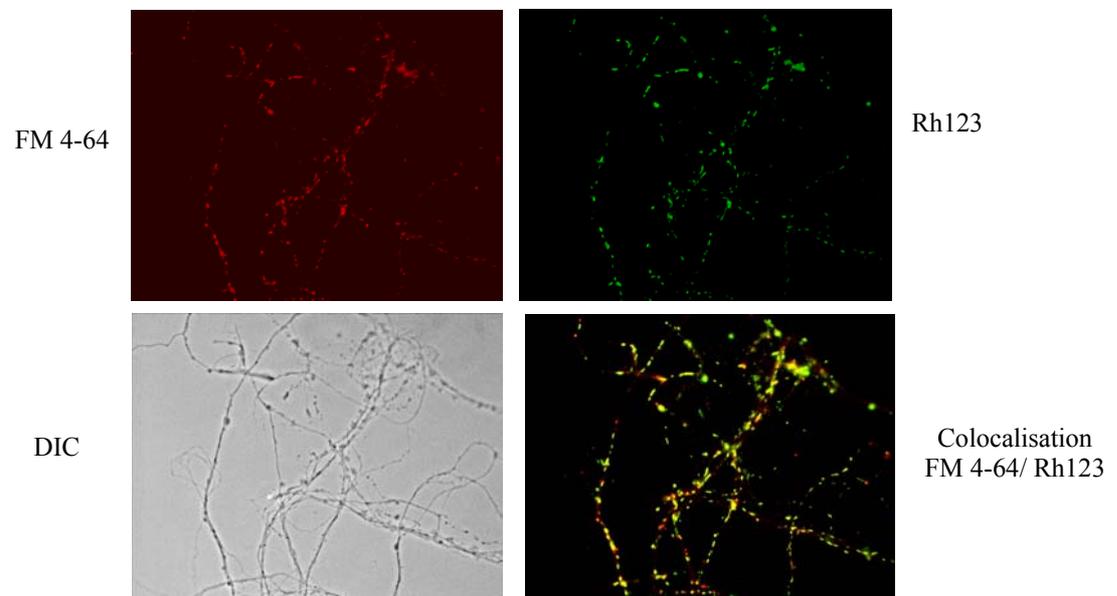


Figure 70: Comparaison du marquage synaptique obtenu à l'aide du FM4-64 et de la rhodamine 123.

c) Marquage des récepteurs

Les neurones sont incubés, durant 10 min et à 20 °C, dans du milieu contenant une concentration d'anticorps égale à 10 μ g.mL⁻¹ et de l'Hepes (20mM), puis le milieu est rincé. La concentration d'anticorps conduit à un marquage peu dense, inférieur à 1 anticorps par micromètre carré.

Les neurones sont ensuite enfermés dans une cellule contenant leur milieu de culture et le tampon Hepes, auxquels sont ajoutés les traitements pharmacologiques choisis. L'enregistrement des trajectoires dure 25 min, de façon à observer des neurones dans un état physiologiquement correct. En particulier, les cultures de neurones, sur lesquelles

apparaissent des modifications morphologiques telles que des vésicules, ne donnent pas lieu à des enregistrements. Nous avons vérifié grâce à un marquage au bleu trypan qu'après 15 min d'expériences, $74 \pm 10\%$ ($n=355$ neurones) étaient vivants.

Finalement, la procédure mise en place lors de ces expériences est résumée dans la Figure 71. Tout d'abord, nous réalisons le marquage synaptique, qui est éventuellement suivi d'une préincubation avec le traitement testé, puis le marquage des récepteurs GluR2. Enfin, les neurones, dont le milieu contient le traitement choisi, sont observés sur le microscope d'épifluorescence.

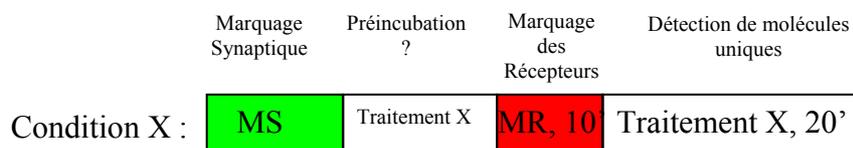


Figure 71: Schéma du protocole expérimental

3. Analyse des enregistrements

Après l'analyse des films (p. 62), nous disposons des traces reconstruites. Le coefficient de diffusion est obtenu en calculant le déplacement quadratique moyen glissant sur toute la trajectoire, pour les durées allant de 30 à 150 ms (p 86).

Nous allons étudier séparément la mobilité des récepteurs dans les compartiments synaptiques et extra-synaptiques. Pour cela, nous déterminons manuellement la localisation des récepteurs. Ceux-ci sont considérés synaptiques s'ils sont à l'intérieur d'une zone de 300nm autour du centre de la synapse, et extra-synaptiques sinon (Figure 72).

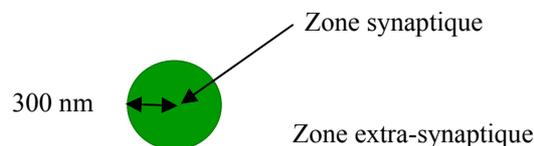


Figure 72: Définition des zones synaptiques et extra-synaptiques

B. Résultats expérimentaux

1. Validité du protocole

Nous nous sommes assurés de la validité de notre protocole en vérifiant tout d'abord que nous étions capable de marquer les récepteurs GluR2, y compris à l'intérieur des synapses, et que, de plus, l'observation d'une population de récepteurs mobiles à l'intérieur des synapses n'était pas un simple artefact dû aux récepteurs endocytés.

a) Possibilité de marquage de récepteurs synaptiques

Nous avons conduit une première expérience d'immunocytochimie. La première étape de marquage des GluR2 a été effectuée de façon identique à la procédure employée pour l'observation en molécules uniques, elle a ensuite été suivie de la fixation des neurones et d'une étape d'amplification, grâce à l'utilisation d'anticorps secondaires. Le marquage synaptique a été réalisé grâce à un anticorps dirigé contre le transporteur du glutamate présent dans les vésicules d'exocytose appelé BNPI/ VGLUT1. On constate alors, comme attendu, une accumulation du marquage des récepteurs aux synapses (Figure 73).

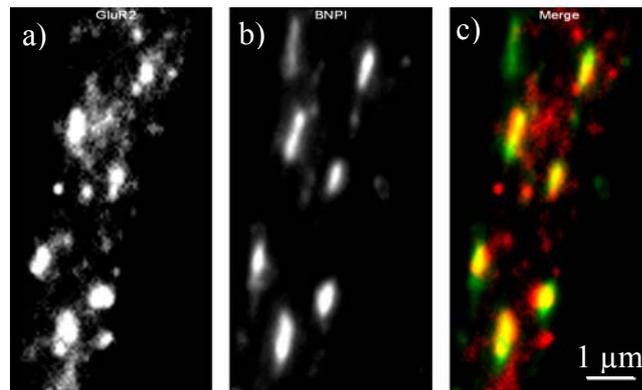


Figure 73 marquage des récepteurs GluR2 (a et c rouge) et des transporteurs du glutamate contenus dans la partie pré terminaison présynaptique (b et c vert)

Par ailleurs, nous avons calculé la densité surfacique des récepteurs, détectés dans les expériences de molécules uniques, en fonction de la distance au centre des synapses. Cette densité est normalisée par le nombre total de récepteurs observés au cours de chaque série d'expériences. Pour cela, les centres des synapses ont été déterminés en ajustant le marquage par des pics gaussiens. La précision sur leurs positions est de l'ordre de 60nm. Nous avons alors défini des surfaces élémentaires, sur lesquelles se répartissent les récepteurs autour des synapses, comme étant égales à des couronnes d'aire $2\pi r dr$. Nous pouvons alors calculer la densité surfacique qui correspond au nombre de récepteurs $N(r)$, trouvés dans chaque surface élémentaire, divisé par l'aire de la surface, soit $S(r) = N(r)/2\pi r dr$. L'histogramme (Figure

74) ainsi obtenu fait apparaître un fort enrichissement, pouvant atteindre un facteur 10, sur un rayon de 300nm autour du centre des synapses. Cela renforce l'idée que nous sommes capables de marquer les récepteurs synaptiques.

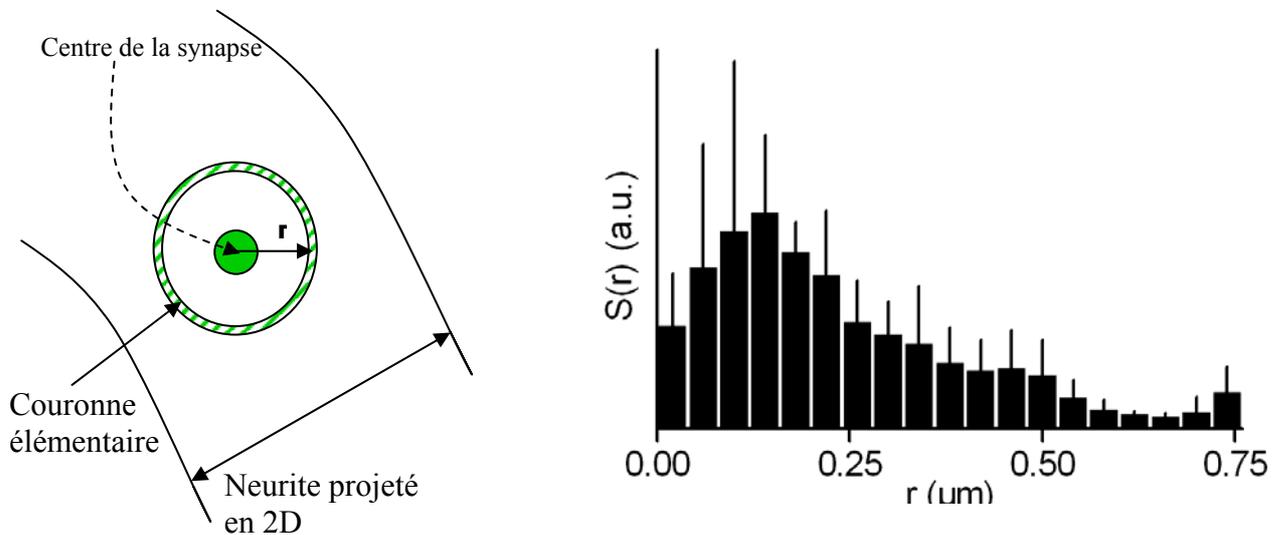


Figure 74 : Schéma de neurite utilisé pour la construction de l'histogramme des densités surfaciques des récepteurs

Des observations réalisées en microscopie électronique, sur des neurones vivants ayant été soumis à un protocole d'immunochimie semblable au nôtre viennent le confirmer. Les récepteurs à la glycine ont ainsi été marqués par des nanocristaux semi-conducteurs sur des neurones vivants, et ont pu être détectés à l'intérieur des synapses inhibitrices [Dahan 2003]. En conclusion, il est possible de marquer des récepteurs GLuR2 synaptiques. Notons cependant, que nous n'avons aucun élément prouvant que la probabilité de marquage des récepteurs extra-synaptiques est égale à celle des récepteurs synaptiques. Aussi nous nous garderons par la suite de comparer ces deux populations en terme de nombre d'éléments les composant.

b) Récepteurs observés et récepteurs endocytés

Nous savons que les récepteurs GluR2 s'endocytent rapidement [Beattie 2000]. Or les anticorps, liés aux récepteurs, peuvent aussi être endocytés avec eux [Luscher 1999]. Ainsi, par des méthodes d'immunochimie, nous avons pu mesurer sur des neurones incubés avec les anticorps anti-GluR2 durant 10 min à 37°C, puis rincés et laissés à 37°C pendant 15 min, que $24 \pm 5\%$ des récepteurs étaient endocytés avec leurs anticorps dans les neurites. Nous avons donc essayé d'évaluer la contribution à nos mesures de cette population constituée de récepteurs endocytés,.

Afin de n'observer que les récepteurs endocytés, nous avons utilisé la technique de lavage acide. Les neurones ayant été incubés à 20°C pendant 10 min avec les anticorps, puis laissés à 37°C pendant 30 min. Ils ont ensuite été lavés avec du milieu de culture à 4°C et de pH égal à 2 pendant 2 min. Les résultats d'immunochimie ont montré une baisse de $80\pm 9\%$ du marquage surfacique par rapport à la condition contrôle sans lavage acide (Figure 75).

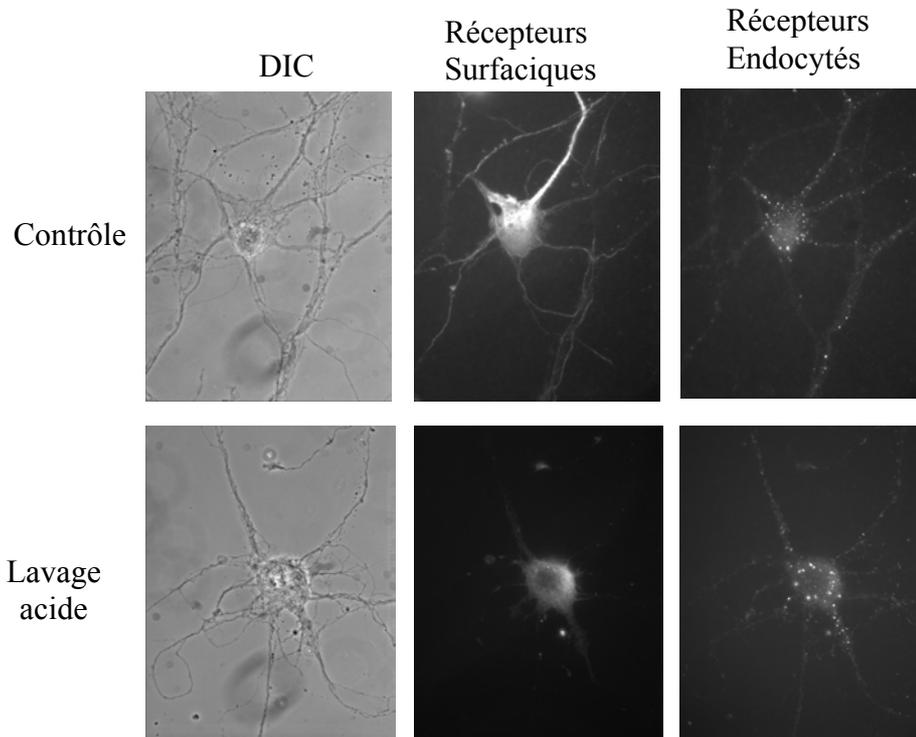


Figure 75: Marquage immunochimique des récepteurs GluR2 surfaciques et endocytés en condition contrôle et après lavage acide

Les mesures en molécules uniques réalisées dans les mêmes conditions indiquent qu'après lavage acide 79% des récepteurs, extra-synaptiques et synaptiques mêlés, sont immobiles alors qu'ils ne sont que 25% d'immobiles en condition contrôle (Figure 76).

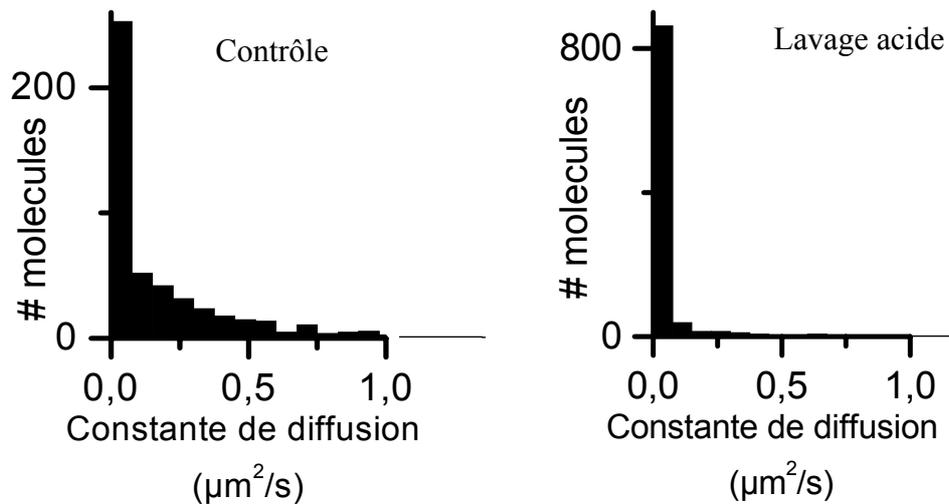


Figure 76: histogramme des coefficients de diffusion des récepteurs suivis en molécule unique, dans la condition contrôle et après le lavage acide

En conclusion, les récepteurs endocytés avec leurs anticorps participent essentiellement à la fraction de récepteurs immobiles. Ces résultats sont en bon accord avec une observation qualitative donnée dans la littérature. Les vésicules contenant les récepteurs AMPA GluR1, endocytés suite à l'application d'AMPA, ont été suivis sur des neurones vivants, après un lavage acide, et il a été constaté, de façon similaire, leur grande immobilité [Beattie 2000].

2. Dynamique des GluR2 dans les conditions basales

Les premières expériences ont été réalisées sur des neurones au repos, i.e. des neurones dans lesquels aucune propagation de signal électrique le long des neurones n'existe et qui sont donc dépourvus d'activité synaptique. Pour réaliser cet état, un bloqueur des canaux voltages dépendants, la tétrodontoxine notée TTX, a été ajoutée au milieu de culture à la concentration de $1\mu\text{M}$, dès le marquage des récepteurs.

a) Approche analytique

Afin de caractériser les mouvements se produisant dans les deux compartiments cellulaires que sont la synapse et le domaine extra-synaptique, une méthode analytique a été adoptée [Schütz 1997]. Elle consiste à construire la distribution $P(r^2, t)$ des distances au carré, parcourues par l'ensemble des molécules d'un compartiment cellulaire, dans un intervalle de temps t . Le calcul de $P(r^2, t)$ est donné par l'Équation 21, et correspond à la probabilité qu'une molécule, initialement en O , se trouve, au temps t , à l'intérieur d'un cercle de rayon r .

$$P(r^2, t) = \int_0^{r^2} 2\pi p(\rho^2, t) \rho d\rho \quad \text{Équation 21}$$

Lorsque les molécules se partagent entre deux populations : une fraction α dont la moyenne du carré du déplacement, pour un intervalle de temps t , vaut $r_1^2(t)$, et une fraction $(1-\alpha)$ dont la moyenne du carré du déplacement est égale à $r_2^2(t)$, la distribution $P(r^2, t)$ est décrite par l'Équation 22.

$$P(r^2, t) = 1 - [\alpha \exp(-r^2/r_1^2(t)) + (1-\alpha) \exp(-r^2/r_2^2(t))] \quad \text{Équation 22}$$

Cette distribution est construite pour chaque compartiment synaptique, et extra-synaptique (Figure 77).

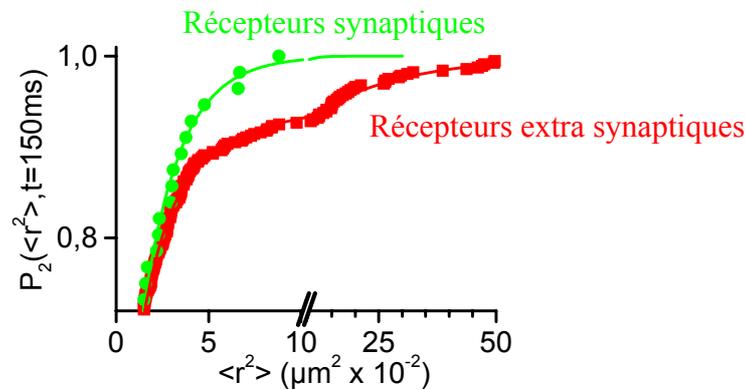


Figure 77: distribution des distances au carré, parcourues par les molécules synaptiques (●) et les molécules extra-synaptiques(■), après un temps égal à 150 ms

Chacune des distributions, obtenues pour différents intervalles de temps notés t , est ajustée par l'Équation 22. Il nous est alors fourni les fractions de ces deux sous populations, (1) et (2), existant dans chaque domaine cellulaire, ainsi que les paramètres $r_1^2(t)$ et $r_2^2(t)$. Le tracé de $r_1^2(t)$ et $r_2^2(t)$ en fonction du temps nous permet de caractériser les diffusions de ces populations (1) et (2) (Figure 78). L'intérêt de cette méthode vient de ce qu'elle ne nécessite pas de tri préalable des molécules en fonction de l'allure de leurs trajectoires.

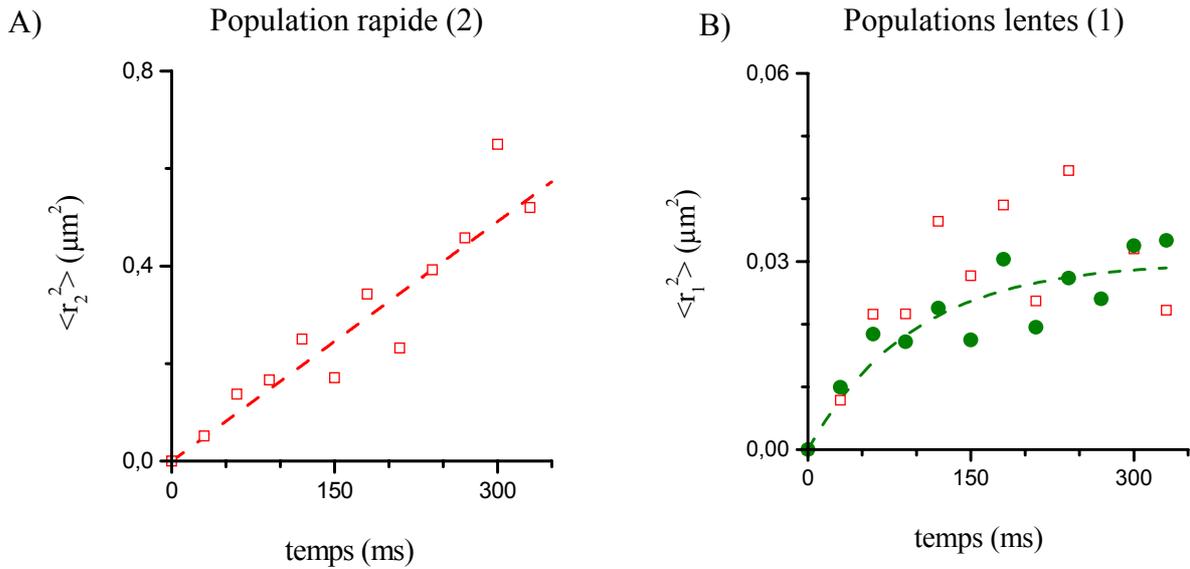


Figure 78: moyenne du déplacement quadratique en fonction du temps des populations (A) rapides et (B) lentes de récepteurs extra-synaptiques (□) et synaptiques (●).

Cette analyse montre que, dans le domaine extra-synaptique, sont présentes une population très rapide, notée (2), une population lente, notée (1), et une population immobile (0), alors que dans la synapse, coexistent une population lente, notée (1) et une population immobile, notée (0).

La moyenne du carré de la distance de la population extra-synaptique rapide (2) varie linéairement avec le temps. Ces récepteurs extra-synaptiques rapides, qui représentent $75 \pm 5\%$ de la population extra-synaptique, diffusent donc de façon brownienne, avec un coefficient de diffusion moyen égal à $0.37 \pm 0.04 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Les populations lentes, trouvées parmi les récepteurs synaptiques ou extra-synaptiques, ont un comportement diffusif identique. Les moyennes des carrés des distances, parcourues en fonction du temps et appelées $\langle r_1^2(t) \rangle$, présentent une saturation au cours du temps, caractéristique d'une diffusion confinée (p 84). Aussi, nous avons ajusté les $\langle r_1^2(t) \rangle$ mesurés grâce à l'Équation 23. Cette approximation au premier ordre de l'Équation 18 décrit une diffusion confinée, dans un domaine de taille L , à l'intérieur duquel le coefficient de diffusion est égal à D_1 :

$$\langle r_1^2 \rangle \approx \frac{L^2}{3} \left[1 - \exp\left(-\frac{12D_1 t}{L^2}\right) \right] \quad \text{Équation 23}$$

Nous avons mesuré un coefficient de diffusion D_1 égal à $6 \pm 2 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et un domaine de restriction mesurant $L = 300 \pm 20 \text{ nm}$. Cette taille est conforme à celles des synapses, obtenues

en microscopie électronique [Schikorski 1997, Takumi 1999], les récepteurs synaptiques semblent donc pouvoir parcourir la surface synaptique toute entière. La fraction lente (1) constitue $45 \pm 5 \%$ de la population synaptique et seulement $25 \pm 5\%$ de la population extra-synaptique. La présence d'une telle fraction peut s'expliquer soit par un défaut de marquage de certaines synapses, soit par l'agrégation de récepteurs extra-synaptiques sous l'action de protéines d'échafaudage [Meier 2001, Sergé 2002].

b) Approche statistique et mesure de la moyenne de la diffusion instantanée

Par la suite, nous nous intéressons uniquement aux coefficients de diffusion instantanée de chaque molécule, pour lesquels nous n'avons pas à considérer le caractère confiné ou pas du mouvement. La distribution de ces coefficients de diffusion (Figure 79) nous apprend alors que la population extra-synaptique se divise en trois fractions: une fraction rapide où $\langle D_2 \rangle = 0.45 \pm 0.05 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et qui représente 66% des récepteurs, une fraction lente où $\langle D_1 \rangle = 0.05 \pm 0.01 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et qui représente 26% des récepteurs, enfin une population considérée comme immobile, car $D_0 < 7 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, représentant 8% des récepteurs. La population synaptique se divise en deux fractions égales : l'une composée de récepteurs faiblement mobiles dont la moyenne du coefficient instantané de diffusion est $\langle D_1 \rangle = 0.054 \pm 0.005 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, et l'autre constituée de récepteurs immobiles, selon le critère précédemment donné.

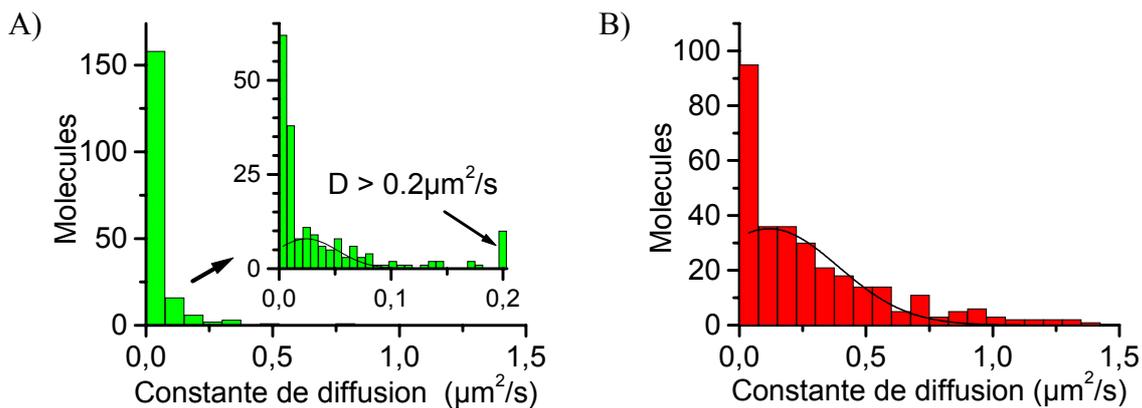


Figure 79: histogrammes détaillés des coefficients de diffusion des récepteurs synaptiques (A) et extra-synaptiques (B)

En fait, les mesures, que nous attribuons à des neurones en condition basale, ont été réalisées après un marquage au FM1-43, et donc après une activation au KCL de 30 s. Nous avons

ensuite réitéré ces mesures sur des neurones, marqués avec la rhodamine 123, et qui n'ont donc pas été activés. Il apparaît dans ces conditions que le coefficient de diffusion des récepteurs extra-synaptiques diminue de façon importante ($0.2 \pm 0.02 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). L'activation des récepteurs AMPA semble donc se traduire par une mobilité accrue des récepteurs extra-synaptiques.

En conclusion, l'approche analytique nous a permis de constater que les récepteurs synaptiques sont soit immobiles, soit soumis à une diffusion confinée, tandis que la majeure partie des récepteurs extra-synaptiques diffuse librement. De plus, les deux méthodes nous fournissent, de façon équivalente, les caractéristiques des différentes sous-populations présentes dans chaque domaine. Les résultats exposés ultérieurement seront basés sur l'approche statistique.

c) Facteurs limitant la diffusion

L'approche analytique a montré que les récepteurs peuvent diffuser librement ou dans un domaine limité, ou enfin rester immobiles. Nous nous sommes interrogés sur les facteurs limitant des mouvements diffusifs, et pour cela nous avons testé l'influence de la température sur les valeurs des coefficients de diffusion.

Le protocole dit « standard » comprend une phase d'incubation des neurones avec les anticorps à 20°C et une phase d'enregistrement vidéo, les neurones étant replacés à 37°C. Nous avons donc effectué nos mesures sur neurones au repos dans trois conditions : une condition où les deux phases se produisent à 37°C, la condition standard, et une condition où les deux phases se produisent à 20°C. Les résultats obtenus (Figure 80) indiquent que la moyenne des coefficients de diffusion des récepteurs synaptiques est indépendante de la température, alors que celle des récepteurs extra-synaptiques est divisée par trois lorsque la température passe de 37°C à 20°C.

A l'extérieur des synapses, le facteur limitant la diffusion est, peut-être, la viscosité de la membrane alors qu'à l'intérieur des synapses, ce ne peut plus être le cas. Dans les synapses, la diffusion des récepteurs doit être limitée par les obstacles et les pièges, que constituent la concentration importante de protéines et d'éléments du cytosquelette présents dans la densité postsynaptique.

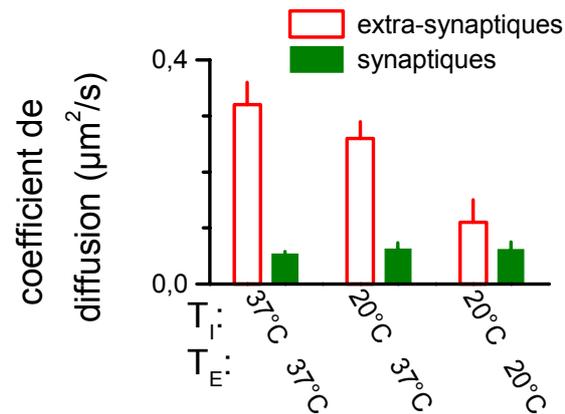


Figure 80: coefficients de diffusion moyens des récepteurs synaptiques et extra-synaptiques en fonction de la température

Si la moyenne des coefficients de diffusion de la fraction mobile des récepteurs synaptiques ne varie pas en fonction de la température, en revanche, la proportion de récepteurs immobiles dans la population totale de récepteurs synaptiques diminue significativement avec la température (Figure 81).

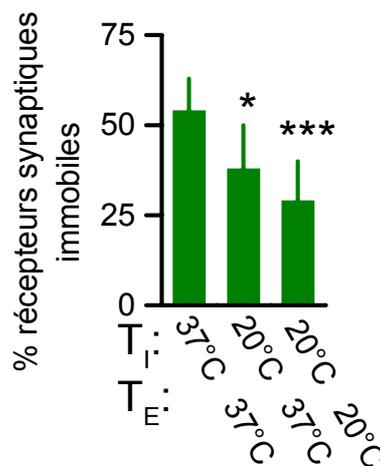


Figure 81: pourcentage de récepteurs synaptiques mobiles en fonction de la température

Ce résultat peut provenir d'une endocytose réduite des récepteurs membranaires, quand la température est abaissée. La fraction décroissante de récepteurs synaptiques immobiles correspondrait alors à la proportion décroissante de récepteurs suivis qui sont endocytés. Cependant les expériences d'immunochimie réalisées dans les mêmes conditions indiquent que le pourcentage de récepteurs endocytés ne diminue que de 10% lorsque la température varie de 37°C à 20°C, alors que la proportion de récepteurs synaptiques immobiles diminue de plus de 40%. De plus, plusieurs expériences suggèrent que l'internalisation des récepteurs AMPA se ferait à travers les puits recouverts de clathrine. [Carroll 1999a, Lin 2000]. Or, des

expériences de microscopie de fluorescence et de microscopie électronique montrent que ceux-ci sont localisés à la périphérie des synapses [Blanpied 2002, Petralia 2003]. Cela conduit à penser que peu de récepteurs internalisés sont observés à l'intérieur des synapses.

D'autres phénomènes pourraient donc être en cause dans la variation de la fraction de récepteurs immobiles, comme, par exemple, une modification des interactions avec les protéines présentes, de façon dense, à la synapse.

3. Simulation de phénomènes de plasticité neuronale

Comme nous l'avons expliqué dans la deuxième partie, les modifications de l'efficacité synaptique sont dues essentiellement à la variation du nombre de récepteurs de type AMPA à la synapse. L'endocytose des récepteurs semblent se produire à travers les puits recouverts de clathrine ; or ceux-ci sont localisés à la périphérie des synapses [Blanpied 2002, Petralia 2003]. Cette observation suggère qu'une étape de diffusion doit conduire les récepteurs de la synapse vers ces zones d'endocytose. Le recrutement des récepteurs AMPA grâce à l'interaction avec la PSD-95, via la stargazine semble donner lieu à deux étapes, à savoir l'exocytose des récepteurs suivi par une étape de diffusion des récepteurs vers la synapse [Chen 2000]. Ces étapes de diffusion n'ont pas été observées directement, mais seulement déduite d'expériences d'immunocytochimie. Nous avons alors appliqué divers traitements pharmacologiques, mimant les processus de plasticité, afin d'évaluer les modifications induites sur la mobilité des récepteurs GluR2.

a) Concentration intracellulaire de calcium et condition « bapta »

La condition Bapta est obtenue en appliquant le protocole de la condition TTX, auquel a été ajouté une étape de préincubation avec du milieu de culture contenant 5 μ M de Bapta AM, ayant lieu à 37°C pendant 10 min. De cette façon, le calcium intracellulaire, contenu dans les parties pré- et postsynaptiques, est chélaté. La moyenne des coefficients de diffusion des récepteurs mobiles, qu'ils soient synaptiques ou extra-synaptiques, est inchangée dans la condition « bapta ». En revanche, nous avons constaté une diminution significative de la proportion de récepteurs synaptiques immobiles (Figure 82).

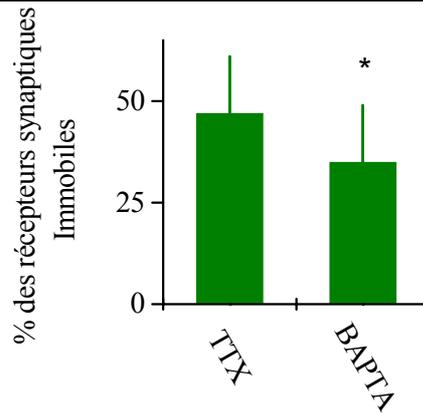


Figure 82 : Pourcentage des récepteurs synaptiques immobiles dans les conditions TTX et Bapta.

Cela confirme des résultats, obtenus précédemment dans notre groupe [Borgdorff 2002], selon lesquels la présence de calcium intracellulaire peut provoquer la stabilisation locale de récepteurs.

b) Dépression à long terme et « protocole glutamate »

(1) « protocole glutamate »

Des protocoles induisant la LTD ont été réalisées sur des tranches d'hippocampes, qui ont ensuite subi un marquage d'immunochimie [Carroll 1999b]. Il apparaît que l'affaiblissement de la réponse synaptique, qui requiert l'activation des récepteurs NMDA et l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, se traduit aussi par une diminution de la proportion de synapses contenant des récepteurs AMPA GluR1, alors que la proportion de synapses contenant des récepteurs NMDA NR1 reste inchangée. L'application seule d'AMPA, à une concentration élevée, conduit à l'endocytose de ces mêmes récepteurs GluR1 ; tandis que l'application du glutamate à des doses modérées induit une endocytose dépendante de l'activation des récepteurs NMDA [Carroll 1999a].

Nous nous sommes donc intéressés à la mobilité des GluR2 surfacique lorsque ceux-ci font face à des mécanismes d'endocytose. Les processus observés ici ne sont pas ceux de la LTD, mais témoignent d'un des phénomènes mis en jeu dans la LTD.

Nous avons tout d'abord vérifié en immunohistochimie classique l'effet du protocole choisi, qui consiste à rajouter du glutamate, à une concentration de 100 μ M, dans le milieu d'immersion des neurones lors de l'enregistrement. Après 15 min d'incubation des neurones vivants, dans ce milieu à forte concentration en glutamate, nous observons, après fixation, une

augmentation de 85% des récepteurs endocytés, ce qui se traduit par une perte de 22% de la densité en récepteurs surfaciques (Figure 83).

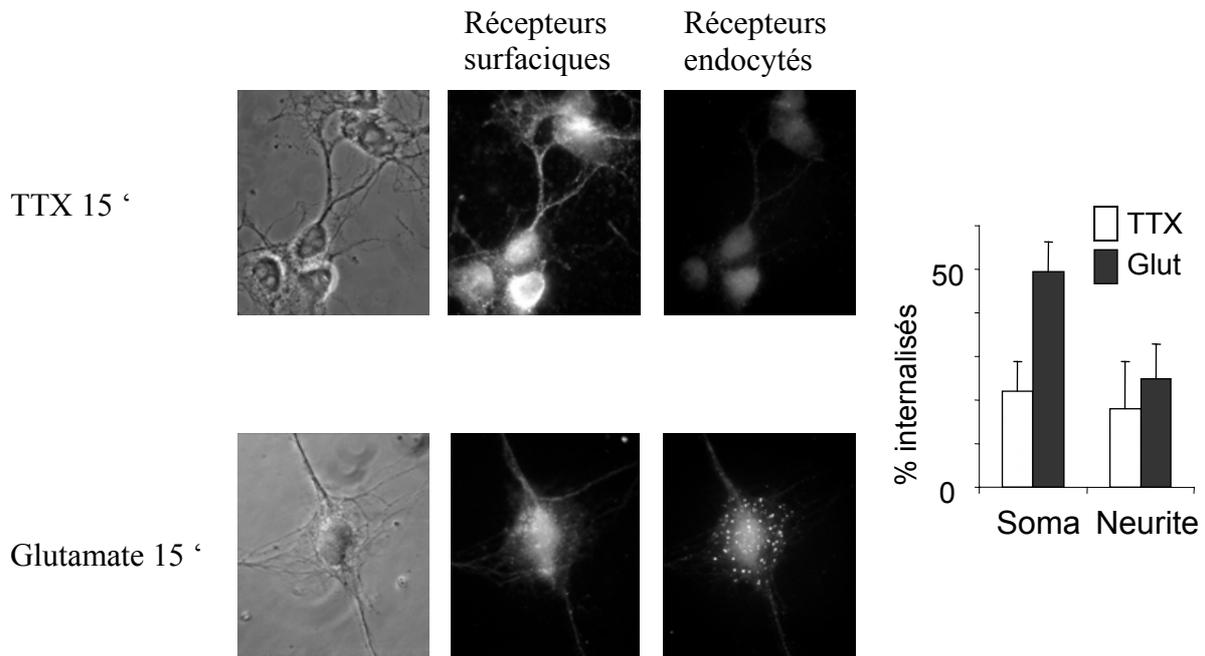


Figure 83: marquage immunochimique des récepteurs GluR2 surfaciques et endocytés, dans la condition contrôle et dans la condition glutamate.

(2) Effet sur la mobilité des récepteurs synaptiques

A l'extérieur des synapses, aucun changement de la moyenne des coefficients de diffusion n'est décelable. En revanche, dans les synapses, cette moyenne est multipliée par deux par rapport aux valeurs obtenues pour les conditions de repos TTX.. Cette augmentation de la moyenne des coefficients de diffusion s'accompagne de la diminution de 30% de la proportion de récepteurs immobiles dans la synapse (Figure 84).

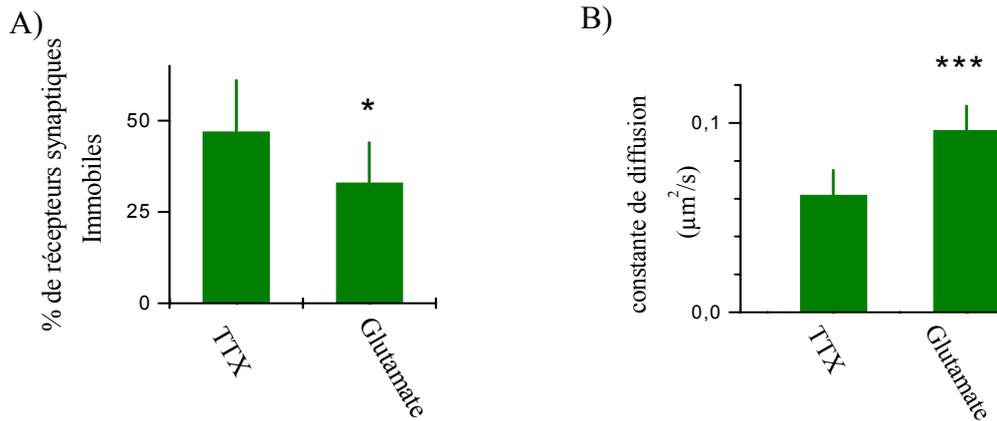


Figure 84: mobilité des récepteurs synaptiques dans la condition 'glutamate', (A) pourcentage des récepteurs immobiles, (B) constantes de diffusion moyennes

Ceci est a priori étonnant si l'on se rappelle que la condition glutamate induit une endocytose massive et que les récepteurs endocytés sont principalement immobiles. En fait, cela peut être expliquée par l'observation des résultats d'immunochimie, qui semblent indiquer que les récepteurs endocytés, au cours du traitement glutamate, semblent être stockés majoritairement dans le corps cellulaire, i.e. loin des synapses (Figure 83).

Il semble donc que, suite à l'application de glutamate, les récepteurs se libèrent des liens, qui les stabilisent à la surface de la densité postsynaptique, avant d'être endocytés et conduits vers le soma (Figure 85).

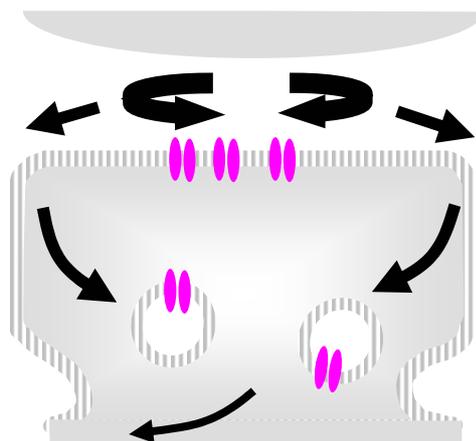


Figure 85: Modèle de circulation des GluR2 durant la condition 'glutamate'

c) Potentialisation à long terme et « protocole biccuculine/glycine »

(1) « *protocole biccuculine/glycine* »

L'application de glycine, coagoniste des récepteurs NMDA, de strychnine, antagoniste des récepteurs inhibiteurs à la glycine, et de biccuculine, antagoniste des récepteurs inhibiteurs GABA, a permis d'induire une augmentation de la réponse synaptique sur des cultures de neurones d'hippocampe, qui requiert l'activation des récepteurs NMDA et l'entrée de calcium dans le neurone [Lu 2001]. Seule l'amplitude du signal électrique mesuré en post-synaptique est modifié et amplifié, les caractéristiques cinétiques restant inchangées, la LTP induite provient de l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la synapse. De plus, elle disparaît quand l'exocytose des vésicules est empêchée. Le marquage immunocytochimique confirme l'élévation de la proportion de récepteurs GluR2 surfaciques après l'application du protocole précédent, et l'invariance du nombre de récepteurs NMDA à la surface.

Nous avons utilisé ce protocole afin d'observer la mobilité de récepteurs nouvellement exocytés. En effet, nos cultures n'étant pas complètement matures, puisque âgées de 8 à 11 jours et non comme dans l'article précédemment cité de 12 à 17 jours, nous n'utiliserons pas le terme de LTP pour décrire les processus qu'elles subissent.

En immunohistochimie classique, nous avons cherché à évaluer la modification du recrutement surfacique en récepteurs GluR2 après l'incubation des neurones vivants, à 37°C et pendant 5 min, soit dans un bain composé de 20µM de biccuculine, 1µM de strychnine et 200µM de glycine que l'on appellera protocole 'Bic/Gly', soit dans un bain contenant 1µM de TTX, appelé protocole contrôle. Le protocole a donc consisté en une première phase durant laquelle nous avons masqué les récepteurs présents à la surface à l'instant initial ; pour cela les neurones vivants ont été incubés avec l'anti-GluR2 durant 40 min à 4°C, puis incubés dans les mêmes conditions avec un anti IgG de souris non marqué par un fluorophore et présent en concentration saturante. Ainsi avons-nous masqué les récepteurs surfaciques initialement présents. Dans une deuxième étape, nous avons incubé les neurones soit dans le bain 'Bic/Gly', soit dans le bain contrôle durant 5 min et à 37°C. Enfin, dans une troisième étape, nous avons fixé les neurones et marqué les récepteurs nouvellement surfaciques avec l'anti GluR2 et une couche amplificatrice d'anti IgG de souris fusionnés avec l'Alexa 568.

Nous constatons alors une augmentation de 59% de la densité surfacique en récepteurs surfaciques dans la condition 'Bic/Gly' comparée à la condition contrôle.

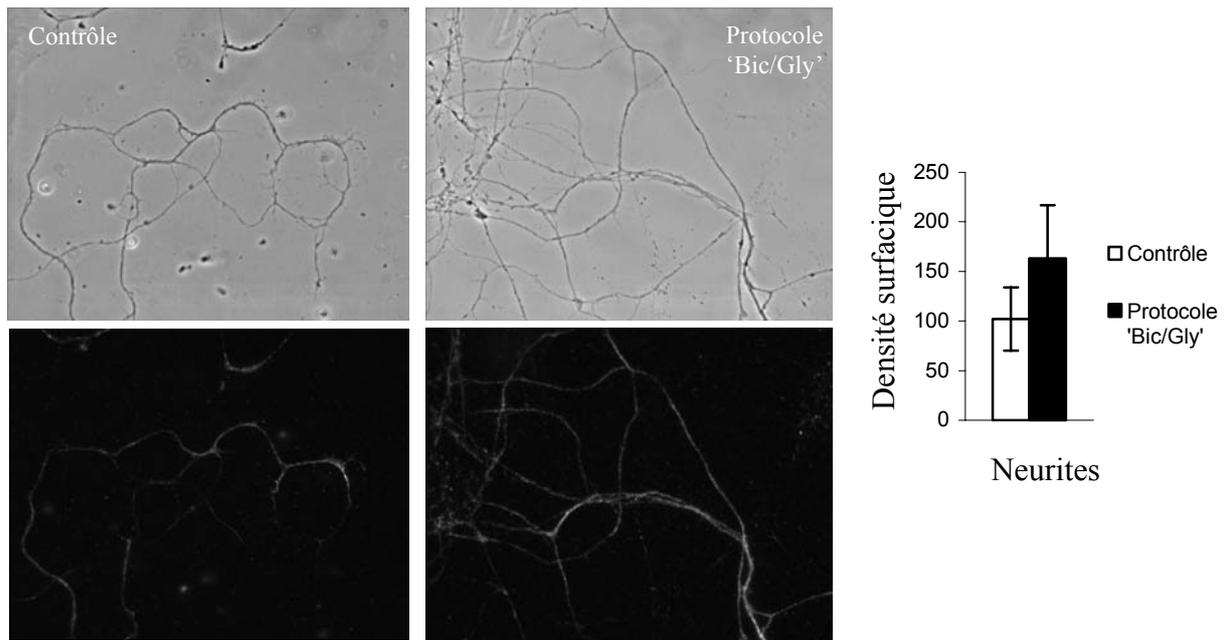


Figure 86: Marquage d'immunochimie des neurites dans la condition contrôle et la condition 'Bic/Gly'

(2) Effet transitoire dans et hors synapses

Les mesures en molécule unique ont été réalisées sur des neurones ayant été préincubés 0,5 et 40 min, à 37°C; dans le bain 'Bic/Gly'.

Le comportement des récepteurs détectés après une préincubation de 40 min des neurones est semblable à celui des récepteurs suivis sur des neurones n'ayant pas été prétraité, voire même à celui dans la condition contrôle. En revanche, il existe un effet transitoire significatif après une préincubation de 5 min. (Figure 87).

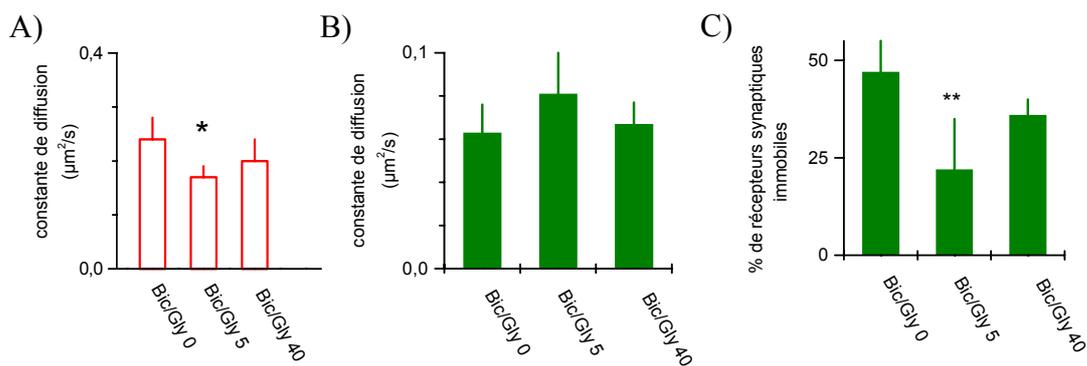


Figure 87: mobilité des récepteurs extra-synaptiques (A) et synaptiques (B) et (C) en fonction des durées de préincubation dans la condition 'Bic/Gly'

A l'extérieur des synapses, la moyenne des coefficients de diffusion diminue faiblement, tandis qu'à l'intérieur des synapses, elle reste quasiment stable et seule la proportion de récepteurs immobiles diminue très fortement.

Il semble donc que les récepteurs nouvellement insérés à la membrane, suite à l'application du traitement 'Bic/Gly', commencent par diffuser dans la synapse avant de s'y stabiliser (Figure 88).

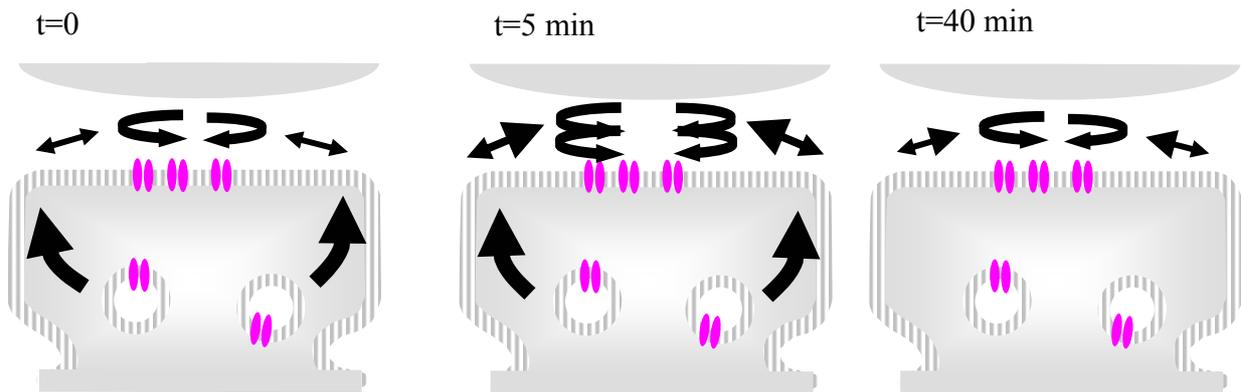


Figure 88: modèle de circulation des récepteurs GluR2 dans la condition 'Bic/Gly'

d) Plasticité synaptique et localisation des récepteurs extra-synaptiques

Dans la condition glutamate, nous avons pu observer un grand nombre de récepteurs dont les trajectoires restent localisées dans le voisinage de la synapse. Aussi avons-nous défini dans l'espace extra-synaptique un nouveau domaine formant une couronne de 400 à 800 nm de rayon, que l'on nomme espace juxtasyntique (Figure 89).

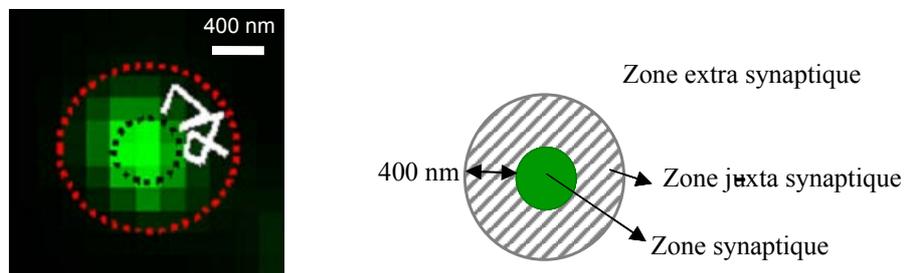


Figure 89: Exemple de trajectoire juxta synaptique et définition de la région juxta synaptique

Cette simple observation a été confirmée par la construction de la densité surfacique de récepteurs, détectés en molécule unique, en fonction de la distance au centre des synapses

(Figure 90). En comparant cet histogramme avec celui obtenu dans la condition contrôle (Figure 74), il apparaît un enrichissement dans la zone définie précédemment.

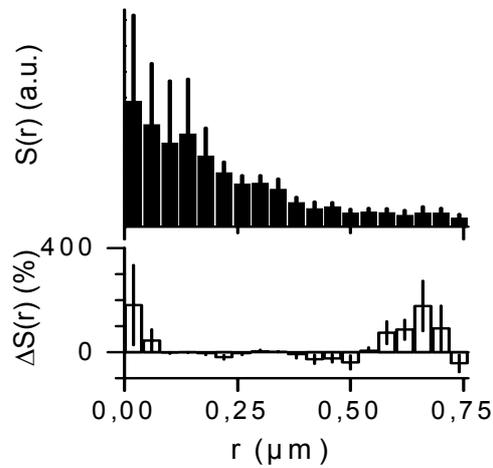


Figure 90: densité surfacique mesurée dans la condition glutamate en fonction de la distance au centre de la synapse.

De plus, nous avons comparé la proportion des récepteurs extra-synaptiques localisés dans la zone juxta synaptique dans les différentes conditions définies précédemment (Figure 91). Il apparaît qu'elle double dans la condition glutamate, comme si les récepteurs fuyant les synapses s'accumulaient dans la zone juxta synaptique. On observe, par ailleurs, un léger affaiblissement de cette proportion de récepteurs juxta synaptique dans la condition 'Bic/Gly' après 40 min d'incubation. Cet effet pourrait indiquer que cette zone juxta synaptique est aussi une zone de réserve pour les récepteurs GluR2.

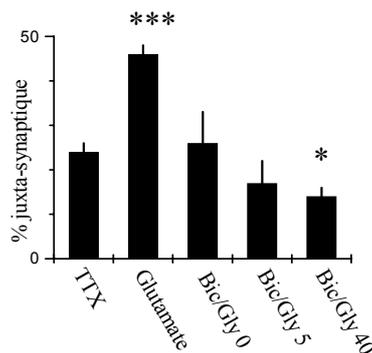


Figure 91: pourcentage des récepteurs extra-synaptiques localisés dans la zone juxta synaptique dans les différentes conditions

C. Discussion

1. Méthode

Nous avons marqué les synapses en repérant les zones de recyclages situées dans la partie présynaptique, grâce au FM1-43, et les zones riches en mitochondries que sont les terminaisons présynaptiques. Ces marquages ne permettent pas de marquer avec précision le centre des synapses comme le feraient le marquage de la PSD95 sur des neurones matures. En fait, seules les cultures de neurones d'hippocampe de rats, âgées de plus de deux semaines, présentent un marquage punctiforme caractéristique de la PSD-95. Pour des neurones, dont les épines dendritiques sont en formation, peut être faudrait il marquer des composants présynaptiques et postsynaptiques, afin d'obtenir un marquage synaptique parfaitement rigoureux [Ahamari 2002]. Néanmoins, notre marquage reste relativement fiable, comme en témoigne l'usage courant du FM comme marqueur synaptique.

La difficulté rencontrée au cours de nos expériences concerne la faible durée de nos enregistrements. Ce problème devrait être résolu par l'utilisation des quantum dots, apparus récemment, même si ces particules clignent de façon importante et peuvent rendre difficile la reconstruction des trajectoires. En fait, le marquage réalisé grâce à ces particules présente un handicap principal à savoir leur taille. En effet, elles mesurent environ 15nm alors que la fente synaptique a une hauteur variant entre 20 et 50 nm, les fluorophores constitués de seulement quelques cycles aromatiques soit au plus 1 ou 2 nm, n'ont pas cet inconvénient. En fait, ces particules viennent d'être employées comme marqueurs des récepteurs à la glycine diffusant sur des neurones de moelle épinière [Dahan 2003]. Cette étude a montré clairement, à l'aide d'observations en microscopie électronique, la capacité de ces particules à rentrer dans la fente synaptique. De plus, les mesures de diffusion, réalisées grâce à ces quantum dots, font apparaître des proportions de récepteurs lents et rapides, identiques à celles effectuées à l'aide de fragment Fab monovalents liés à un fluorophore classique. En revanche, une étude récente, réalisée dans notre groupe, dans laquelle a été comparée la diffusion de récepteurs GluR2 marqués à l'aide d'un simple fluorophore ou de quantum dots, a montré que le coefficient de diffusion mesuré pour les récepteurs synaptiques était cinq fois plus faible dans le cas du marquage avec les quantum dots [Groc 2004]. Finalement, si l'utilisation des nanoparticules semiconductrices permet de s'affranchir du photoblanchiment rapide des fluorophores, les mesures obtenues dans l'environnement synaptique, grâce à ces nouveaux marqueurs, s'avèrent délicates à exploiter.

L'extinction brutale d'un fluorophore prouve son unicité. De plus, la distribution unimodale des intensités des émissions des fluorophores mesurées par image confirme l'observation de fluorophores isolés (Figure 43). Cependant, cette signature ne permet pas d'affirmer que le suivi de ce fluorophore individuel donne la trajectoire d'un seul récepteur. D'une part, l'anticorps possède deux sites de liaisons qui pourraient induire une agrégation artificielle des récepteurs, mais le marquage immunochimique ne montre pas d'agrégation supplémentaire des récepteurs lorsqu'il est réalisé sur cellules vivantes par rapport à celui effectué sur cellules fixées. Cependant, même si l'anticorps n'est lié qu'à un récepteur, celui-ci peut appartenir à un groupe natif de récepteurs. Par exemple, la diffusion des récepteurs extra-synaptiques est principalement limitée par viscosité de la membrane et leur coefficient de diffusion peut être décrit par le modèle de Saffman-Delbrück. Le coefficient de diffusion dépend alors faiblement du nombre de récepteurs suivis et sa mesure ne permet pas de remonter aux nombres exacts de récepteurs suivis.

La présence de l'anticorps de 10nm de hauteur fixé sur la partie extracellulaire de GluR2 peut occasionner une gêne stérique pour l'ensemble, lorsque le récepteur se déplace dans la synapse, et cela se reflète dans la valeur des coefficients de diffusion des récepteurs synaptiques. Ainsi, à l'instar des expériences réalisées avec les quantum dots, nous ne pouvons exclure que les coefficients de diffusion mesurés ici indiquent la limite inférieure des coefficients de diffusion des récepteurs dans la synapse.

2. Diffusion des sous unités AMPA et des récepteurs NMDA

Nous nous sommes concentrés ici sur la diffusion de la sous unité GluR2. En fait, les sous unités des récepteurs AMPA sont présentes dans les synapses de façon diverse selon l'activité des neurones, mais les différents hétéromultimères incluent tous la sous unité GluR2. Dans la condition, « biccuculine/glycine », il y a insertion massive des hétéromultimères GluR1/2, qui se substituent aux GluR2/3. Même si la majeure partie des GluR2 observés après 5 min et 30 min de préincubation doivent appartenir aux multimères GluR1/2, on souhaiterait connaître la dynamique exacte des seuls multimères GluR1/2 i.e. des récepteurs GluR1. Dans le protocole « biccuculine/glycine », les GluR2 synaptiques, qui ont été nouvellement insérés suite aux cinq minutes de préincubation, sont instables ; mais cette instabilité est peut-être amplifiée par le départ des GluR2/3 hors de la synapse.

Les récepteurs NMDA, dont la diffusion latérale à l'extérieur des synapses a été mesurée indirectement [Carroll 1999b], sont supposés stables à l'intérieur des synapses,

d'autant que, lors des processus de LTD, les NMDAr ne sont pas endocytés [Carroll 1999b]. Des résultats récents, réalisés dans notre groupe avec la technique de détection de molécules uniques décrite ici, montrent qu'en condition basale, les récepteurs NMDA extra-synaptiques diffusent deux fois moins vite que GluR2, alors qu'il n'y a pas de différence à l'intérieur des synapses. Une baisse de l'activité des neurones, induite par l'ajout de TTX, ou une augmentation, par dépolarisation au KCl, ne semble pas modifier la dynamique des récepteurs NMDA. Ces conclusions sont en accord avec l'hypothèse faite jusqu'alors. En revanche, l'activation de la PKC, connue notamment pour désagréger les récepteurs NMDA [Fong 2002], induit une mobilité très fortement accrue de ces récepteurs.

3. Endocytose, exocytose et diffusion des récepteurs AMPA

Les expériences de suivi de particules [Borgdhorff 2002] avaient laissé non résolue la question de savoir si la zone juxta-synaptique était un endroit particulier ; en effet, les particules ne pouvant entrer dans la fente synaptique, elles s'immobilisaient dans cette zone juxtasyntique.

En fait, les coefficients de diffusion sont identiques pour des récepteurs juxtasyntiques et extra-synaptiques, donc les récepteurs ne s'immobilisent pas spécifiquement dans cette zone, mais plutôt dans les synapses. En revanche, il apparaît que la proportion des récepteurs extra-synaptiques localisés dans la zone juxtasyntique varie de façon inverse au caractère stable des récepteurs synaptiques. Il peut donc s'agir d'une zone de réserve des récepteurs, ou de fuite des récepteurs. En effet, l'endocytose des récepteurs AMPA, après ajout de glutamate ou d'AMPA, semble se produire à travers les puits recouverts de clathrine [Carroll 1999a, Lin 2000]. Or ces puits recouverts de clathrine semblent être localisés dans une zone située à côté de la PSD [Blanpied 2002, Petralia 2003], i.e. dans la zone que nous avons appelée juxtasyntique. Ainsi, dans la condition glutamate dont la conséquence majeure est l'induction d'une endocytose massive, les récepteurs s'échapperaient de la synapse avant d'être endocytés dans des puits de clathrine dans la zone juxtasyntique. En fait, les données de microscopie électronique font apparaître que les zones où se produit l'endocytose se déplacent en fonction de la maturité des synapses, voire changent de structure. Sur les neurones issus d'embryons de rats, il semble que les structures assurant l'internalisation des récepteurs soient essentiellement constituées par les puits de clathrine. De plus, ceux ci paraissent s'éloigner des densités post-synaptiques lorsque les synapses deviennent matures. Sur des neurones de rats adultes, coexistent à la fois les puits de clathrine qui sont plus

faiblement présents et dont la distance moyenne à la densité postsynaptique est désormais de l'ordre de 300 nm, et des cavéoles, présentes majoritairement dans les synapses. [Petralia 2003]

De plus, cette zone spécialisée pour l'endocytose par formation des puits de clathrine reste stable indépendamment de l'activité [Blanpied 2002], donc toujours disponible pour remplir sa fonction. De par sa localisation proche de la synapse, elle semble constituer un relais de la densité post-synaptique.

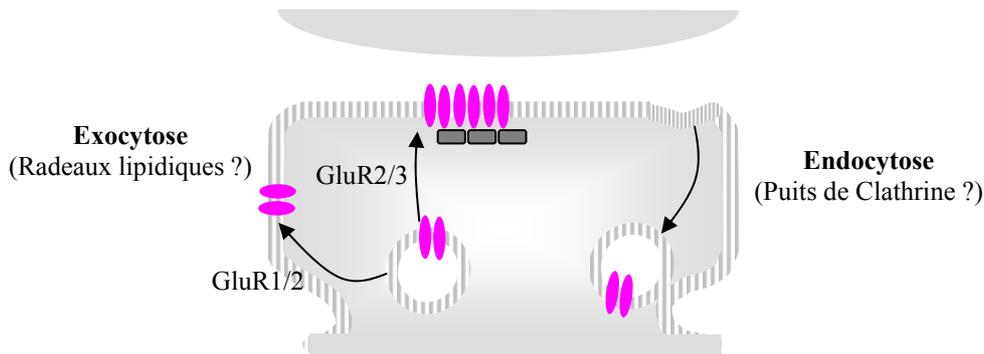


Figure 92: Etapes d'endocytose et d'exocytose et différents domaines membranaires éventuellement mis en jeu.

L'exocytose semble se produire dans deux sites différents pour les GluR1 et pour les GluR2/3, respectivement à l'extérieur et à l'intérieur de la synapse [Passafaro 2001]. En fait, cette observation pourrait aussi correspondre à une diffusion plus importante pour les récepteurs GluR2/3, et donc une probabilité d'entrer dans la synapse plus importante. Cependant, nos résultats n'indiquent pas de différence réelle entre les coefficients de diffusion mesurés pour les récepteurs extra-synaptiques, qu'ils soient majoritairement formés de GluR2/3 ou GluR1/2. Ces lieux d'exocytose sont peut-être à mettre en relation avec des structures membranaires particulières comme par exemple, les radeaux lipidiques, d'autant que la PSD-95, connue pour favoriser l'expression surfacique des récepteurs AMPA, est liée à la membrane par une ancre GPI. Le suivi de ces radeaux lipidiques est susceptible d'informer sur des corrélations éventuelles entre la dynamique des GluR1 et celle de ces structures lipidiques. On ne sait pas, par exemple, si, après avoir été exocytés à la membrane, les récepteurs diffusent en restant groupés, s'ils entrent ainsi dans la synapse. L'insertion de ces récepteurs dans un radeau lipidique notamment, pourrait conduire à ce type de phénomènes.

Nous nous sommes intéressés à la dynamique des récepteurs AMPA par rapport à une division spatiale, de la membrane des neurites, centrée autour des synapses. Nous avons donc

observé la diffusion dans les compartiments synaptiques, juxta synaptiques, et extra-synaptiques. En fait, on pourrait définir de nouveaux compartiments sur la surface membranaire des neurites, tels que les zones contenant les puits de clathrine/zones hors puits de clathrine, ou encore radeaux lipidiques/ hors radeaux lipidiques. Peut-être serait il alors possible d'établir des liens plus directs entre l'étape de diffusion et des mécanismes mis en jeu lors des processus d'endocytose ou d'exocytose. Cependant, pour que ces mesures aient un sens il est nécessaire de pouvoir suivre ces récepteurs le temps nécessaire à leur passage éventuel à travers plusieurs de ces compartiments, soient plusieurs minutes ce qui n'est pour l'instant réalisable qu'à l'aide de quantum dots.

4. Mécanismes de stabilisation des récepteurs AMPA

En ce qui concerne les récepteurs extra-synaptiques, les coefficients de diffusion mesurés avec la technique de molécule unique sont en bon accord avec ceux obtenus en suivi de particule [Borgdhorf 2002]. Les récepteurs synaptiques ont un mouvement confiné dans des domaines de la taille de la PSD, ce qui peut être expliqué par l'existence de barrières perméables autour des synapses, telles que celles constituées par les cadhérines situées en périphérie de la synapse et dont l'immobilité est assurée par leur liaison à l'actine. A l'intérieur de la synapse, près de la moitié des récepteurs observés sont immobiles, peut-être du fait de leur liaison avec des protéines d'échafaudage contenues dans la PSD. Les coefficients de diffusion des récepteurs synaptiques, dans les neurones au repos, sont environ six fois plus faibles que ceux des récepteurs extra-synaptiques et nos expériences ont confirmé que dans cette zone, la diffusion n'était pas limitée par la viscosité de la membrane. Cette différence de valeur du coefficient de diffusion peut s'expliquer par l'existence de protéines immobiles en grand nombre dans cette zone, mais elle peut aussi traduire la présence de sites de liaison avec des protéines d'échafaudage qui constituent des pièges d'affinités diverses. Il est ici difficile de faire la moindre prédiction théorique du fait de la connaissance très imprécise de la composition de la PSD.

De plus, des clichés de microscopie électronique montrent que l'épaisseur de la PSD peut s'accroître après seulement quelques minutes d'activation. La CamKII serait l'une des protéines responsables de ce phénomène puisqu'elle s'accumule alors fortement dans la PSD ; en revanche la PSD-95 conserve sa localisation sous la membrane synaptique et ne semble pas être présente en plus grand nombre [Dosemeci 2001].

La fuite des récepteurs hors de la PSD peut correspondre soit à une diminution de l'affinité pour certaines protéines d'échafaudage, soit à leur libération du cytosquelette. Pour ce qui est des protéines d'échafaudage, on peut s'interroger sur la diffusion des récepteurs AMPA à la synapse si l'interaction avec la stargazine était inhibée. Il vient d'être prouvé que la stargazine, et des protéines transmembranaires homologues, libèrent les récepteurs AMPA, lorsque ceux-ci sont activés par leur agoniste, par un simple effet allostérique. En effet, la liaison de l'agoniste au récepteur modifie la conformation de celui-ci, ce qui perturbe la liaison du récepteur AMPA avec la stargazine [Tomita 2004]. La protéine extra cellulaire NARP est peut-être aussi un composant important pour la stabilisation des récepteurs AMPA dans la synapse, du fait de sa densité et de la régulation de son activité par l'activité neuronale [O'Brien 2002]. Pour ce qui est du rôle du cytosquelette, il a été observé que l'internalisation des récepteurs AMPA a pu être stoppée par l'ajout de jasplakinolide, qui stabilise l'actine, tandis que l'ajout de la seule latrunculine A, qui dépolymérise l'actine, provoque une endocytose semblable à celle induite par le glutamate [Zhou 2001]. Cependant, des résultats contradictoires existent même s'ils concernent une voie différente d'endocytose, à savoir celle induite par l'ajout de NMDA. En effet, dans ce cas, il s'est avéré impossible d'empêcher l'endocytose des récepteurs AMPA en ajoutant de la jasplakinolide [Beattie 2000].

L'effet de ces composants de la densité postsynaptique dans la stabilisation des récepteurs à la surface synaptique devrait se traduire par des temps de piégeage et donc d'immobilisation différents, qui, s'ils sont courts devant la fréquence d'acquisition, donnent lieu à une diffusion réduite. Si à l'inverse ces temps sont longs, il devient indispensable de pouvoir mesurer ces transitions entre des phases d'immobilisation et de diffusion, ce qui implique de pouvoir suivre pendant plusieurs minutes les récepteurs synaptiques. Le même impératif apparaît lorsque l'on souhaite évaluer la probabilité d'échappement de cette zone partiellement perméable. Cependant, aujourd'hui, il n'existe pas de technique parfaitement fiable pour effectuer ce type de suivi. Le développement de l'imagerie photothermique, dont nous verrons l'application à la biologie ultérieurement, permet peut-être d'envisager de telles expériences pour le futur.

IV. Stoechiométrie des protéines en molécules uniques

Les récepteurs du glutamate peuvent circuler entre les trois compartiments que sont les membranes synaptiques, extra-synaptiques, et les vésicules d'endo- ou d'exocytose. La modification de l'efficacité synaptique passe par la régulation de ce trafic, notamment des étapes d'endocytose et d'exocytose des récepteurs. Or jusqu'à présent, le contenu exact des vésicules, et en particulier le nombre de récepteurs par vésicule, n'est pas connu. Afin de comprendre si la régulation concerne une variation du nombre de récepteurs présents par vésicule ou le nombre de vésicules endo- ou exocytées, nous avons cherché à développer une méthode pour compter ces protéines assemblées dans des structures d'au plus quelques centaines de nanomètres. De cette façon, nous pourrions aussi évaluer le nombre de récepteurs présents à la membrane synaptique, ou encore déterminer les assemblages existants des récepteurs NMDA, qui sont aujourd'hui sujets à controverse [Schorge 2003, Hawkins 1999].

Nous commencerons par détailler les différents essais de mesure de la stoechiométrie qui ont déjà été réalisés en détection de molécules uniques. Nous présenterons ensuite le système choisi pour tester notre capacité à compter des protéines, la méthode adoptée, ainsi que nos premiers résultats.

A. Revue des méthodes de mesures, en molécules uniques, du nombre de fluorophores assemblés

Nous souhaitons observer des biomolécules présentes avec une densité élevée, sur des zones de dimension inférieure ou égale à la limite de séparation de deux points sources, i.e. quelques centaines de nanomètres en microscopie d'épi-fluorescence. Les biomolécules ne sont pas isolées, et le signal détecté provient de plusieurs fluorophores. Deux méthodes ont été proposées pour compter le nombre de fluorophores assemblés, qui contribuent au signal détecté.

1. *Distribution des intensités émises par unité de temps*

Deux études, parues en 2001, ont tenté d'évaluer l'agrégation de biomolécules à la surface de cellules vivantes [Lino 2001, Harms 2001b]. Des biomolécules recombinantes, qui sont fusionnées par génie génétique avec une protéine fluorescente de la famille des GFP, sont utilisées dans les deux cas. Elles sont exprimées dans les cellules, à la surface desquelles elles sont imagées grâce à un microscope d'épi-fluorescence. Les pics qui apparaissent dans chaque

image peuvent correspondre au signal émis par plusieurs fluorophores. Les deux groupes ont considéré ce nombre de coups détectés par pic et par image, comme le paramètre permettant de compter le nombre de fluorophores assemblés. Un système d'analyse détecte les pics dans chaque image, et mesure le nombre de coups détectés par pic et par image, qui sont ensuite rassemblés dans une distribution. Nous avons vu précédemment que la distribution des photons émis par un fluorophore, pendant une durée t grande devant la durée moyenne séparant l'émission de deux photons, i.e. devant l'inverse du taux de fluorescence n_{Fluo}^{-1} , est assimilable à une gaussienne (Figure 21, p.35). Nous notons N le nombre coups détectés par pic et par image, et $p_1(N)$ sa densité de probabilité. Nous considérons maintenant que plusieurs fluorophores, distants de plus de 10 nm environ et n'interagissant donc pas entre eux, contribuent au signal. La probabilité, que N photons soient émis par les k fluorophores indépendants, est donnée par le produit de convolution de la probabilité d'émission de $(k-1)$ monomères par la probabilité d'émission d'un seul monomère :

$$p_k(N) = \int p_{k-1}(x)p_1(N-x)dx \quad \text{Équation 24}$$

Finalement, lorsque $p_1(N)$ est une gaussienne centrée sur N_1 et de largeur W , la distribution de l'intensité émise par k monomères indépendants, notée $p_k(N)$, est une gaussienne centrée sur kN_1 et de largeur $\sqrt{k} \cdot W$. Donc, lorsque le système est composé d'une proportion α_k d'agrégats de fluorophores, composés de k monomères, alors la distribution des intensités s'écrit :

$$d(N) = \sum_{k=1}^{\infty} \alpha_p \frac{1}{\sqrt{2\pi k}W} \exp\left(-\frac{(N-N_1)^2}{2kW^2}\right) \quad \text{Équation 25}$$

Ce type d'analyse a mis en évidence l'aggrégation des protéines d'adhésion, les E-cadhérines, à la surface membranaire des fibroblastes [Lino 2001]. Elle a aussi confirmé que les canaux calciques de type L ont tendance à s'agréger à la membrane plasmique [Harms 2001b]. Cependant, cette analyse ne tient pas compte des caractéristiques photophysiques singulières des GFP et de ses mutants, que nous détaillerons dans la partie B.

2. *Anti-bunching et stoechiométrie*

Un fluorophore individuel constitue un système quantique unique, dont l'émission est caractérisée par le phénomène de dégroupement de photons. La probabilité que deux photons

soient émis par une molécule individuelle, avec un intervalle de temps inférieur à la durée de vie de l'état excité, est quasiment nulle. La mesure de la fonction d'autocorrélation des signaux émis par la molécule, au cours du temps, constitue la véritable méthode pour caractériser l'émission par un fluorophore individuel.

En se basant sur ce phénomène, une autre méthode a été proposée afin de déterminer le nombre d'émetteurs indépendants, à l'origine du signal détecté. Elle consiste à construire la distribution des durées séparant l'émission de deux photons successifs, les fluorophores étant excités par un laser pulsé [Weston 2002]. Le rapport du nombre de photons détectés à coïncidence, noté N_c , et de celui des photons détectés avec un retard supérieur à la durée de vie de l'état excité, noté N_L , dépend du nombre de fluorophores assemblés, noté n . Il a pour expression :

$$\frac{N_c}{N_L} = 1 - \frac{1}{n} \quad \text{Équation 26}$$

La mesure de ce rapport permet donc de quantifier le nombre de fluorophores assemblés qui sont responsables du signal détecté. Compte tenu de la dépendance en $1/n$, cette technique est intéressante lorsque le nombre de fluorophores agrégés est faible. En fait, cette méthode élégante présente deux inconvénients majeurs : d'une part, elle est particulièrement sensible au fond, d'autre part elle requiert la détection d'un grand nombre de photons. Enfin, en pratique, elle requiert l'usage d'un microscope confocal associé à un dispositif de comptage de photons, ce qui la rend difficilement applicable à l'observation d'objets assemblés mobiles.

B. Méthodes et résultats préliminaires

Les techniques précédentes n'étant pas entièrement satisfaisantes dans le cadre de nos applications, nous avons cherché à développer une méthode nouvelle et robuste pour quantifier les signaux émis par des assemblées de fluorophores. Nos expériences tests ont été réalisées *in vitro* sur plusieurs constructions moléculaires [Coussen 2002], qui devraient constituer une échelle moléculaire de référence de stoechiométrie donnée. Nous avons envisagé deux types de mesures. Tout d'abord, nous avons pensé utiliser les signaux émis initialement par l'assemblage de molécules; mais, compte tenu des caractéristiques des protéines fluorescentes, il apparaît que le nombre total de photons émis par agrégats de molécules constituent un paramètre robuste et plus simple à exploiter.

1. Introduction

a) Choix du système test

Pour réaliser une mesure du nombre de récepteurs assemblés, nous avons choisi de marquer les biomolécules avec des protéines fluorescentes. En effet, la fusion par génie génétique d'une protéine fluorescente est la seule méthode qui assure un marquage parfaitement spécifique réalisé avec un rapport 1 :1. Le marquage des biomolécules par une méthode immunochimique pose deux types de problèmes. D'une part, l'ajout d'une forte concentration d'anticorps sur des récepteurs déjà fortement concentrés pourraient aggraver leur agrégation ; d'autre part, les anticorps peuvent être endocytés avec les récepteurs membranaires, auxquels ils sont liés, mais avec une probabilité mal connue.

Parmi les protéines fluorescentes, la YFP semble être la plus appropriée pour la détection de molécules uniques [Harms 2001a]. Comme, de plus, nous souhaitons observer les récepteurs présents dans des vésicules, nous avons préféré le mutant citrine à la YFP, mutant qui est plus résistant à une diminution du pH [Griesbeck 2001]. A l'intérieur des vésicules d'endocytose, le pH est d'environ 6, puis dans les compartiments de recyclage de l'ordre de 6.5. Le pKa de la citrine étant de 5.7, on s'attend à ce que son taux d'émission soit peu affecté par son passage de la surface membranaire à l'intérieur des vésicules.

Nous avons employé un système multimérique artificiel (Figure 93) composé de monomères, formés d'une citrine liée à un bras séparateur de ténascine de 21 nm, lui-même suivi d'un domaine *coiled coil* [Coussen 2002]. Ces domaines sont connus pour s'enrouler, les uns avec les autres, en une hélice α , et former des multimères de stoechiométries différentes selon leur origine. Les domaines *coiled coil* employés pour la construction des trimères et des pentamères proviennent de protéines de la matrice du cartilage, respectivement de la partie C-terminale de la CMP [Beck 1996], et de la partie N-terminale de la COMP [Malashkevich 1996]. La formation de ces multimères est due à des interactions hydrophobes, et à l'établissement de liaisons hydrogènes entre les domaines. Généralement, ces structures multimériques sont stabilisées par des ponts disulfures établis entre les cystéines des différents domaines.

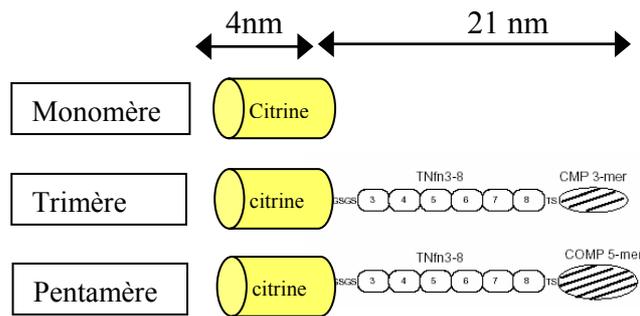


Figure 93: constructions employées pour l'obtention de multimères [Coussen 2002]

b) Composition des échantillons observés

Les constructions ont été exprimées dans des bactéries, puis le lysat obtenu a été purifié par chromatographie HPLC. Enfin, les échantillons ainsi préparés ont été contrôlés sur des westerns blots, dans lesquels les domaines *coiled coil* sont dissociés. D'après ce contrôle, il apparaît que la solution contient majoritairement les protéines d'intérêts.

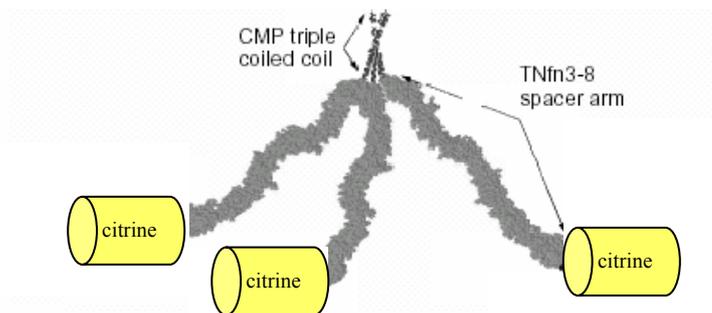


Figure 94: Structure 3D d'un trimère

Les multimères (Figure 94) étant formés par auto assemblage, il est probable que les échantillons, obtenus à partir de l'expression de protéines recombinantes destinées à former des multimères de n éléments, contiennent ces structures mais aussi des formes incomplètes. Nous souhaiterions connaître la proportion des différents multimères présents dans chaque échantillon, i.e. composés de n monomères ou moins. Nous avons pensé effectuer une évaluation de ces proportions par des méthodes biochimiques. En effet, il est possible de lier chimiquement ces assemblages moléculaires, avant de les faire migrer dans un western blot pour mesurer leur taille. Cette méthode a notamment été utilisée pour étudier les tailles moléculaires des tétramères AMPA [Greger 2003]. Cependant, les monomères utilisés ici ont une taille d'environ 80 kDa, il est donc difficile de les faire migrer à l'intérieur de gels. Aussi,

avons-nous démarré des expériences de microscopie électronique, dont la mise au point n'est pas encore achevée. Les échantillons dilués dans un solvant volatil sont vaporisés sur des lamelles de mica, un ombrage de platine est ensuite réalisé, suivi d'un dépôt de carbone. Enfin, le dépôt métallique est détaché du mica par immersion dans l'eau, et est recueilli sur une grille métallique, avant d'être observé [Fowler 1979].

c) Observation en microscopie de fluorescence

Les multimères sont immobilisés dans un gel d'agarose de 2%, de $\text{pH} \approx 7.4$ (p. 60), dont les pores mesurent de l'ordre de 160 nm de diamètre [Pluen 1999]. Les multimères ne sont donc pas contraints; alors qu'ils le seraient dans des gels de polyacrylamide (p. 60), dont les pores n'excèdent pas une dizaine de nanomètre [Ogston 1958]. Ce gel est enfermé entre deux lames de verres parfaitement propres (p.60). L'échantillon, observé dans un microscope d'épi-fluorescence (p. 57), est illuminé avec une intensité d'excitation égale à l'intensité de saturation, soit $0,9 \text{ kW.cm}^{-2}$. Nous avons choisi une durée d'enregistrement aussi faible que possible de manière à suivre, avec le maximum de précision temporelle, l'évolution du signal émis par les multimères. La durée d'acquisition du signal a été fixée à 5 ms. Ainsi, le nombre de coups détectés est de l'ordre de 200 par 5 ms, et nous obtenons un rapport signal sur bruit de 8 environ.

2. Méthode de comptage adoptée et résultats

La valeur du signal, détecté en microscopie de molécule unique, devrait permettre de mesurer directement le nombre de fluorophores assemblés et responsables du signal. Cependant, la citrine comme les autres protéines fluorescentes présente des caractéristiques photophysiques particulières. Son émission clignote de façon importante (Figure 95) et elle photoblanchit rapidement.

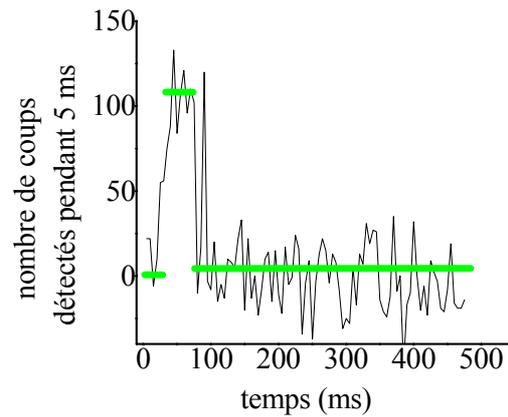


Figure 95: Clignotement du signal émis par une citrine unique

a) Caractéristiques photophysiques de la citrine

Nous avons commencé notre étude par une caractérisation optique de la citrine. Nous avons donc tout d'abord réalisé une mesure d'ensemble du temps de photoblanchiment (τ_{Bl}) en fonction de l'intensité d'excitation (Figure 96). Les échantillons observés ont pour cela été fortement concentrés en citrine monomérique. Nous supposons que le photoblanchiment des protéines fluorescentes se fait à partir d'un seul niveau, qui est peuplé à partir des différents niveaux excités de la protéine. Comme nous l'avons indiqué précédemment (p. 35), la distribution des temps de photoblanchiment est alors décrite par une fonction monoexponentielle, caractérisée par le temps moyen de photoblanchiment τ_{Bl} . Le taux de photoblanchiment, qui est l'inverse de τ_{Bl} , a alors pour expression $1/\tau_{bl} = (1/\tau_{bl}^{\infty}) / (1 + I_S / I)$. Nos mesures conduisent à une intensité de saturation égale à $0.9 \pm 0.3 \text{ kW.cm}^{-2}$ et à un temps de photoblanchiment aux très fortes intensités de $14 \pm 4 \text{ ms}$.

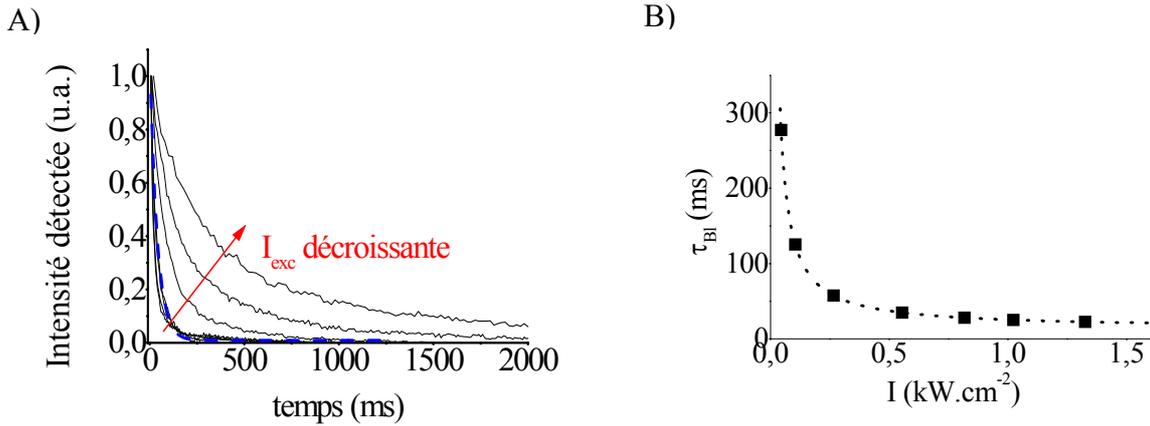


Figure 96 : (A) Graphes de l'intensité, détectée sur des échantillons concentrés, ajustés par des fonctions monoexponentielles; (B) Graphe de la durée de photoblanchiment en fonction de l'intensité d'excitation, ajustée par $\tau_{Bl} = \tau_{Bl\infty}(1 + I_S/I)$, avec $I_S = 0.9 \pm 0.3 \text{ kW.cm}^{-2}$ et $\tau_{Bl\infty} = 14 \pm 4 \text{ ms}$

Le signal émis par la protéine citrine clignote. En particulier, celle-ci peut rester éteinte initialement, alors qu'elle est illuminée. Nous avons mesuré cette durée, que nous appelons $T_{OFF \text{ initial}}$, à partir des enregistrements réalisés en molécules uniques. La distribution de ce temps noir initial a été ajustée par une fonction monoexponentielle (Figure 97), et la moyenne de ce temps noir est égale à $11 \pm 1 \text{ ms}$.

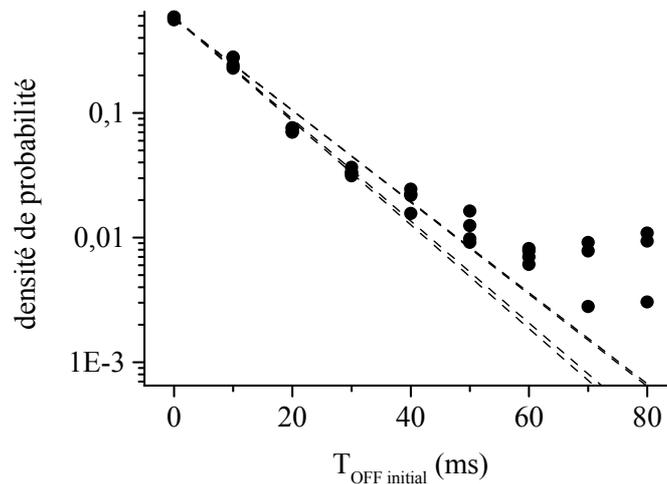


Figure 97: distribution du $T_{OFF \text{ initial}}$, ajustée par une fonction monoexponentielle, avec $\langle T_{OFF \text{ initial}} \rangle = 11 \pm 1 \text{ ms}$

La moyenne du temps noir initial est de l'ordre de grandeur du temps de photoblanchiment obtenu en mesure d'ensemble. Or celui-ci est détecté dès le début de l'illumination, et non dès

le début de l'émission de chaque molécule. Le temps de photoblanchiment, obtenu en mesure d'ensemble, correspond donc à une valeur majorée du temps de photoblanchiment moyen d'une molécule individuelle [Peterman 1999, Harms2001a].

b) Méthodes

(1) Méthode envisagée : mesure de l'intensité détectée dans la première image

Compte tenu du photoblanchiment rapide de la citrine, nous avons pensé utiliser les distributions du nombre de coups détectés par pic, dans la première image, pour évaluer la composition en multimères des échantillons. Cette idée nous a aussi été suggérée par l'observation de certaines traces (Figure 98).

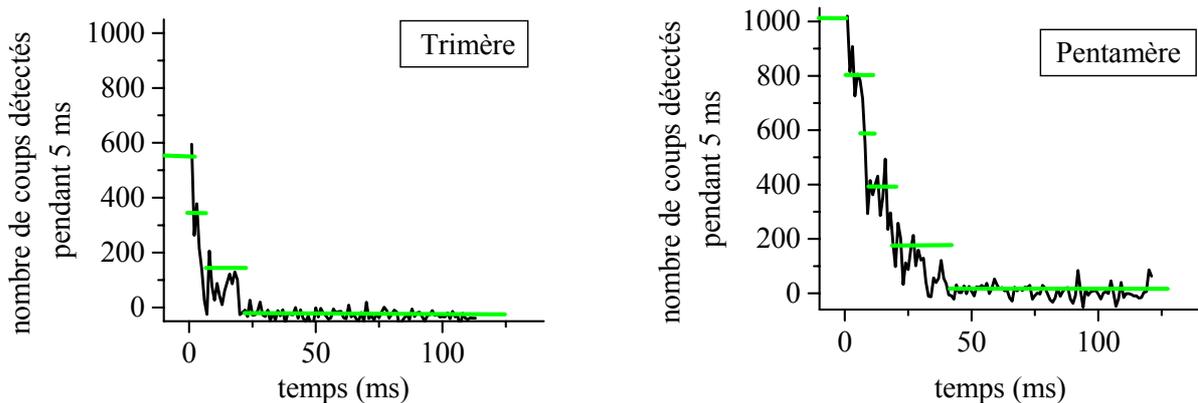


Figure 98: Exemples de traces temporelles d'un trimère et d'un pentamère uniques

Les résultats expérimentaux, ainsi obtenus, ont été décevants, et nous avons cherché à prévoir le type de distribution, à laquelle on devait s'attendre compte tenu des caractéristiques photophysiques de la citrine, en réalisant des simulations.

Nous avons réalisé une simulation de Monte Carlo de ces distributions pour des échantillons composés uniquement soit de monomères, soit de trimères, soit de pentamères. Nous supposons que les multimères sont composés d'émetteurs indépendants, qui émettent avec un taux d'émission constant n_{Fluo} , durant un temps moyen τ_{BI} , l'émission étant précédée par un

état noir dont la durée moyenne est égale $T_{OFF\ initial}$. Nous avons effectué cette simulation dans deux cas : en prenant en compte les mesures expérimentales de ces deux temps (Figure 99 B), et en considérant un cas favorable pour lequel le temps T_{OFF} est négligeable devant le temps moyen de photoblanchiment (Figure 99 A). Dans le cas favorable, les distributions des intensités détectées durant la première image sont effectivement des gaussiennes. En revanche, ce n'est plus le cas pour la simulation réalisée avec les mesures expérimentales. La forme de ces distributions dépend des temps τ_{BI} et T_{OFF} , et ces distributions ne sont pas décrites par des fonctions analytiques connues.

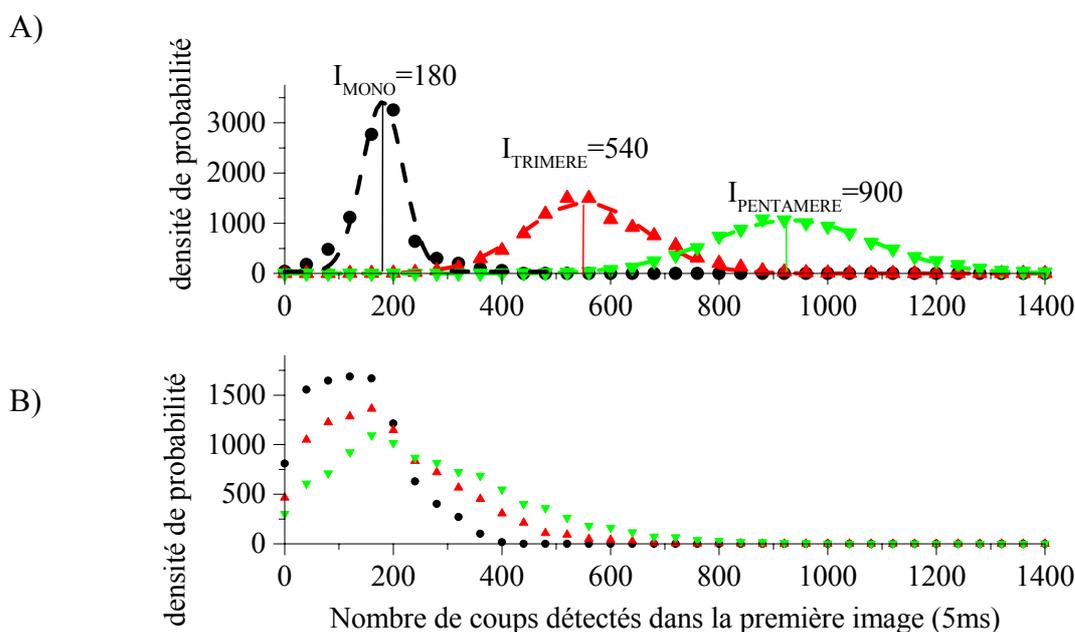


Figure 99: Simulation du nombre de coups détectés, dans la première image, en fonction de $T_{OFF\ initial}$ et τ_{BI} , pour des échantillons formés de monomères (•), de trimères (▲), et de pentamères (▼).

(A) Cas favorable : $T_{OFF\ initial} (=1\text{ms}) \ll \tau_{BI} (=14\text{ms})$. (B) Cas réels : $T_{OFF\ initial} (=11\text{ms}) \approx \tau_{BI} (=14\text{ms})$.

Nous avons donc abandonné cette méthode, dont les mesures s'avèrent difficiles à exploiter.

(2) Méthode adoptée : mesure du nombre total de photons émis

Nous avons alors cherché une méthode qui serait indépendante de ce temps noir, et nous nous sommes tournés vers la mesure du nombre total de photons émis, pour évaluer le nombre de biomolécules assemblées.

Après avoir formulé plusieurs hypothèses, nous avons établi l'expression analytique décrivant la densité de probabilité du nombre total de coups émis par un monomère de citrine. Après avoir vérifié expérimentalement sa validité, nous en avons déduit les expressions analytiques

des densités de probabilité obtenues pour des multimères contenant k citrines, qui ont été validées grâce à des simulations.

Nous avons ensuite vérifié que l'ajustement des distributions, par ces expressions analytiques, permet effectivement de remonter aux proportions des différents assemblages existant dans l'échantillon. Pour cela, nous avons fait appel à des simulations.

- Validité de la fonction analytique

Nous supposons que la distribution du temps de photoblanchiment est monoexponentielle, ce que nous avons vérifié dans nos échantillons concentrés, et que le taux d'émission, n_{Fluo} , est constant. Ces hypothèses conduisent à une distribution monoexponentielle du nombre total de photons émis par des monomères. La densité de probabilité du nombre total de coups détectés a pour expression :

$$p_1(N) = \exp(-N / N_{tot0}) / N_{tot0} \text{ avec } N_{tot0} = n_{Fluo} \tau_{bl} \quad \text{Équation 27}$$

Expérimentalement, nous avons pu vérifier la validité de cette formule sur des échantillons composés uniquement de monomères de citrine (Figure 100).

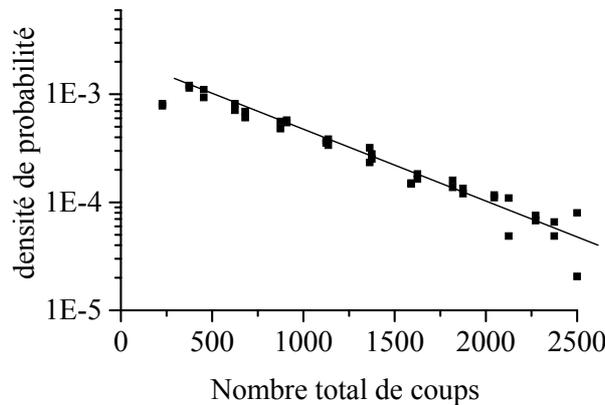


Figure 100: Distribution mesurée du nombre total de coups détectés par des monomères de citrine, ajustée par une fonction monoexponentielle.

Nos multimères étant construits avec des distances de séparation de l'ordre de 40 nm, nous faisons l'hypothèse qu'ils constituent des émetteurs indépendants. La densité de probabilité du nombre total de photons émis par un multimère, formé de k monomères, est alors le produit de convolution de la densité de probabilité d'émission du nombre total de photons émis par (k-1) monomères par la densité de probabilité d'émission du nombre total de photons d'un seul monomère (Équation 24). Elle a pour expression :

$$p_k(N) = (N / N_{tot0})^{k-1} \exp(-N / N_{tot0}) / [(k-1)! N_{tot0}] \quad \text{Équation 28}$$

A partir de ces hypothèses, nous avons effectué des simulations de Monte Carlo sur les intensités totales détectées. Les distributions obtenues sont parfaitement ajustées par ces expressions (Figure 101).

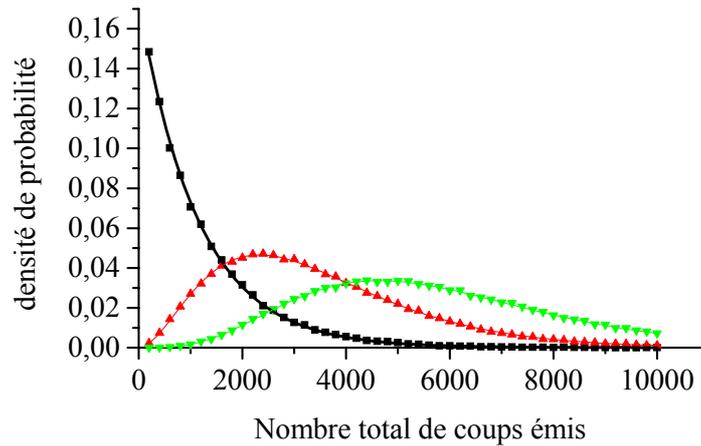


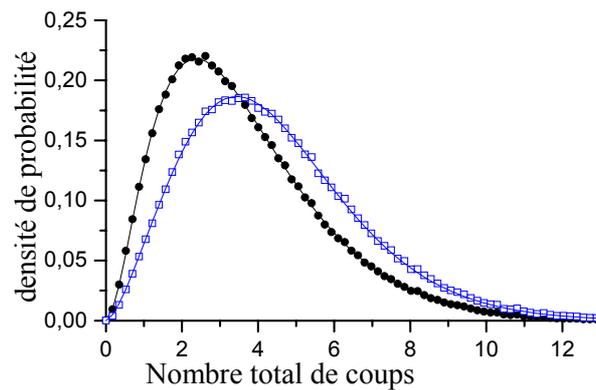
Figure 101 Simulations de la distribution de I_{tot} pour des monomères (■), trimères (▲) ou pentamères (▼) purs et ajustement (trait continu) par les fonctions analytiques.

- Robustesse de l'ajustement non linéaire

Nous nous sommes ensuite intéressés à des échantillons contenant différentes proportions de multimères contenant k citrines, avec k compris entre 1 et 5, et nous avons cherché à évaluer ces proportions. La méthode adoptée consiste à ajuster les distributions obtenues, par l'Équation 29, en fixant N_{tot0} , à la valeur mesurée sur des échantillons contenant uniquement des monomères de citrine. Les seuls paramètres variables sont alors les proportions de chacun des multimères existant réellement dans ces échantillons. De plus, la procédure d'ajustement non linéaire est initialisée en fixant $\alpha_k=0.2$ comme paramètre initial, de façon systématique.

$$p(N) = \sum_{k=1}^5 \alpha_k (N / N_{tot0})^{k-1} \exp(-N / N_{tot0}) / [(k-1)! N_{tot0}] \quad \text{et} \quad \sum_{k=1}^5 \alpha_k = 1 \quad \text{Équation 29}$$

Nous avons vérifié la robustesse de cet ajustement en le mettant en pratique sur des distributions simulées d'échantillons contenant plusieurs types de multimères. Il nous a permis de retrouver les proportions données dans la simulation, avec une grande exactitude (Figure 102).



	simulation 1 (●)		simulation 2 (□)	
	paramètres simulation	paramètres ajustés	paramètres simulation	paramètres ajustés
α_1	0%	1%	0%	0%
α_2	0%	0%	0%	1%
α_3	70%	66%	30%	27%
α_4	0%	3%	0%	0%
α_5	30%	30%	70%	70%

Figure 102: Distributions simulées d'échantillons (simulation 1 ●, simulation 2 □) contenant plusieurs types de multimères et ajustement (trait continu) avec l'Équation 29 (paramètres obtenus rassemblés dans le tableau).

c) Résultats expérimentaux

Expérimentalement, seul l'échantillon formé de monomères de citrines, qui ne sont pas susceptibles de s'agréger, a une composition connue. Nous avons pu alors vérifier la robustesse de l'ajustement, sur les mesures réalisées sur les citrines monomériques. Nous avons tout d'abord ajusté une fonction monoexponentielle à cette distribution, afin d'obtenir le paramètre N_{tot0} ($N_{\text{tot0}}=722 \pm 72$ coups). Puis, nous avons réalisé la procédure d'ajustement par l'Équation 29 en laissant varier librement les paramètres α_k . Nous avons ainsi retrouvé que l'échantillon ne contient que des monomères (Figure 103).

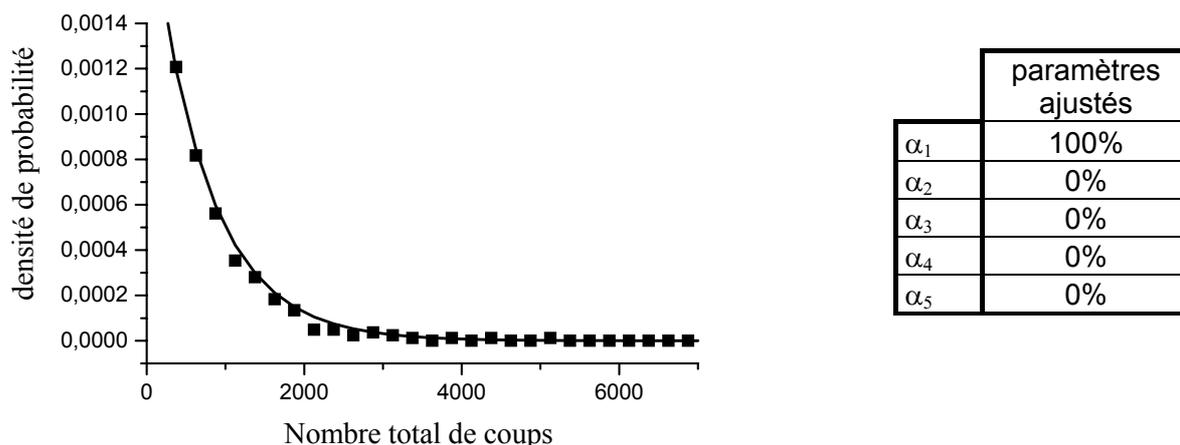


Figure 103 : Distribution mesurée sur des échantillons contenant les monomères de citrines, et ajustée (trait continu) par l'Équation 29, les paramètres calculés sont égaux à $\alpha_k = \delta_{1k}$

Dans nos mesures, une différence apparaît à l'observation des distributions obtenues pour les échantillons contenant des citrines monomériques, et celles contenant des trimères ou des pentamères (Figure 104).

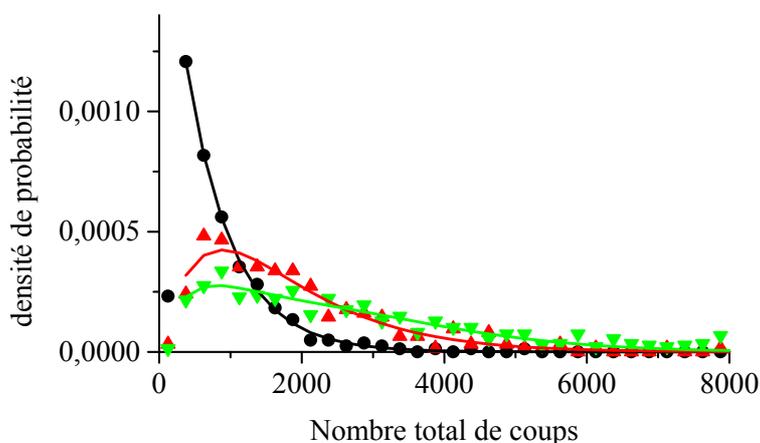


Figure 104 : Distributions du nombre total de coups mesurées pour les échantillons 'monomères' (•), 'trimères' (▲) et 'pentamères' (▼), et ajustées par l'Équation 29 (trait continu)

Nous avons effectué les ajustements des distributions de « trimères », et « pentamères » en utilisant la valeur moyenne de N_{tot0} . Les résultats de ces ajustements (Figure 105) montrent que les échantillons de trimères contiennent majoritairement des dimères, à hauteur de $77 \pm 16\%$, tandis que les échantillons de pentamères sont constitués principalement de dimères ($60 \pm 12\%$) et de pentamères ($30 \pm 9\%$). Nous avons ensuite reproduit ces ajustements en

imposant une variation de $\pm 10\%$ sur N_{tot0} , et nous avons constaté que ces proportions étaient quasiment inchangées (Figure 105).

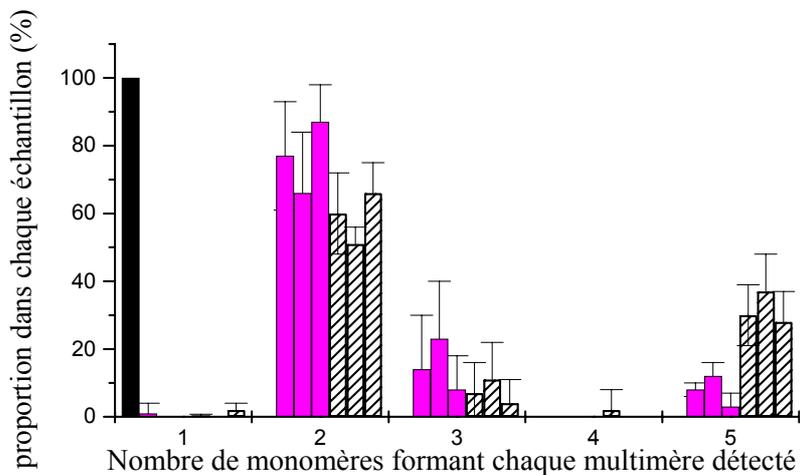


Figure 105: Histogramme des proportions mesurées, de multimères contenus dans les échantillons dits « monomères » (noir), « trimères » (violet), et « pentamères » (hachuré). Pour les « trimères » et « pentamères », apparaissent successivement les résultats obtenus par ajustement de l'Équation 29 avec N_{tot0} , $0.9*N_{tot0}$ et $1.1*N_{tot0}$.

d) Perspectives pour un grand nombre de molécules assemblées

Nous avons effectué des simulations de la distribution du nombre total de coups pour un grand nombre de molécules assemblées, à savoir de 10 à 50. Il apparaît que ces distributions sont correctement ajustées par des gaussiennes (Figure 106).

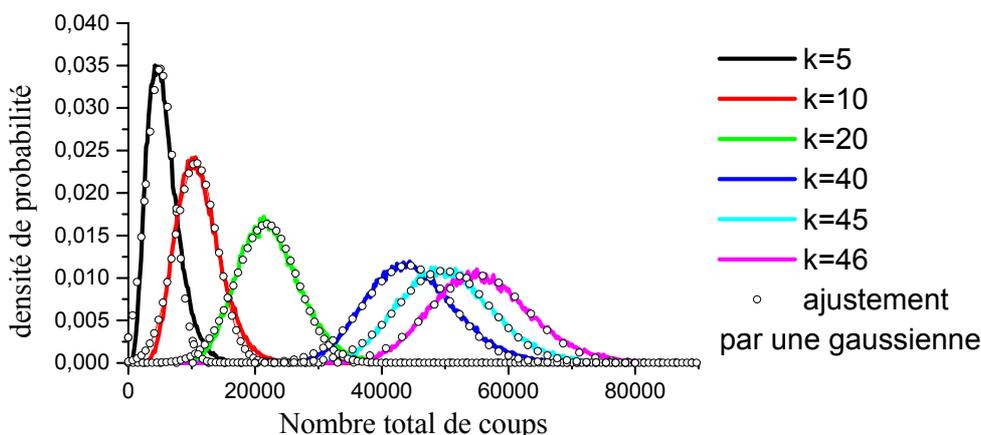


Figure 106: Distributions simulées (trait continu) pour un nombre de molécules assemblées, noté k , grand, et ajustées par des fonctions gaussiennes (O)

En effet, pour k suffisamment grand, nous pouvons faire l'approximation $\ln[k!] \approx k \ln[k] - k$ (écart relatif inférieur à 10% pour k supérieur à 12). Après calcul, nous trouvons que la densité de probabilité du nombre total de coups détectés, pour k molécules assemblées, peut être ajustée par une gaussienne telle que :

$$p_{k+1}(N) \propto \exp\left[-2 \frac{(N - N_{tot k})^2}{W_k^2}\right] \quad \text{Équation 30}$$

$$\text{avec } N_{tot k} = (k-1) * N_{tot 0}$$

$$\text{et } W_k = 2 * \sqrt{(k-1)} * N_{tot 0}$$

A partir des ajustements des densités de probabilités, obtenues par simulation, nous avons tracé les graphes représentant la position centrale et la largeur de la fonction gaussienne en fonction du nombre de multimères assemblés (Figure 107). Nous avons effectivement mesuré que la position du pic gaussien dépend linéairement du nombre de molécules assemblées :

$$N_{tot k} = (k-1) * a \quad \text{avec } a=1132 \pm 4 \quad \text{au lieu de } 1120 \quad \text{Équation 31}$$

et que la largeur, qui dépend comme la racine carrée du nombre de molécules assemblées :

$$W_k = 2 * \sqrt{(k-1)} * b, \quad \text{avec } b=2213 \pm 5 \quad \text{au lieu de } 2240 \quad \text{Équation 32}$$

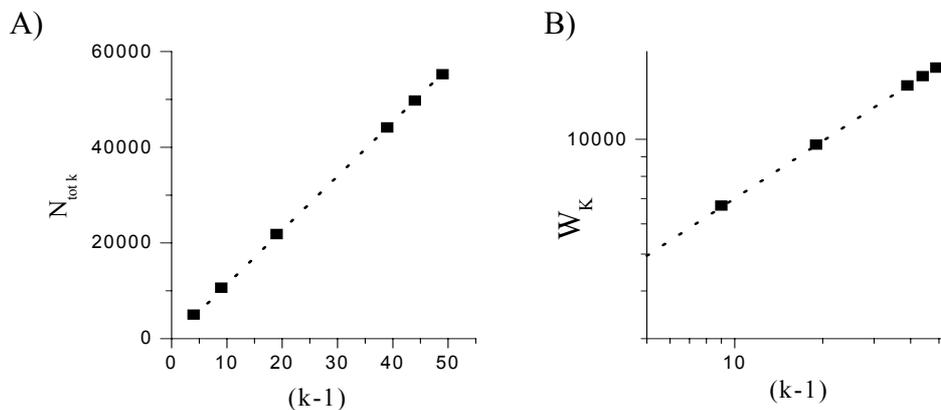


Figure 107 : Graphes représentant la position $N_{tot k}$ (A) et la largeur W_k (B) de la fonction gaussienne, en fonction du nombre de molécules assemblées, ajustés respectivement par l'Équation 31 et l'Équation 32

Le fait de pouvoir ajuster la distribution obtenue par une gaussienne, lorsque le nombre de molécules agrégées est supérieur à 10, devrait nous permettre d'obtenir simplement une estimation du nombre de biomolécules assemblées.

La méthode, basée sur la mesure du nombre total de coups émis, semble permettre de déterminer le nombre de molécules fluorescentes assemblées et séparées par une distance supérieure à une dizaine de nanomètres. En effet, pour un nombre de biomolécules assemblées, inférieur à 10, elle paraît robuste et précise. Au-delà, elle devrait pouvoir donner accès simplement à une approximation de ce nombre.

Références du chapitre 2

- Abel. *Cell* **88**, 615-26 (1997).
- Ahamari S.E., Smith S.J. Knowing a nascent synapse when you see it. *Neuron* **34**, 333-336 (2002).
- Allison D.W., Chervin A.S., Gelfand V.I., Craig A.M.; Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *J. Neurosci.* **20**, 4545-4554 (2000).
- Anderson R.G.W., Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **296**, 1821-1825 (2002).
- Barria A. et al.; *Science* **276**, 2042 (1997).
- Beattie E.C., Carroll R.C., Yu X., Morishita W., Yasuda H., Von Zastrow M., Malenka R.C. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signalling mechanism shared with LTP. *Nat. Neurosci.* **3**, 1291-1300 (2000).
- Beck K., Gambee J.E., Bohan C. A., Bächinger H. P.; The C-terminal domain of cartilage matrix protein assembles into a triple-stranded α -helical coiled-coil structure. *J. Mol. Biol.* **256**, 909-923 (1996).
- Blanpied T.A., Scott D.B., Elhers M.D.; Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytotic zones of dendrites and spines. *Neuron* **36**, 435-449 (2002).
- Bliss T.V.P., Lomo T.; Long lasting potentialisation of synaptic transmission in the dentate area of anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiology* **232**, 331-356 (1973).
- Borgdorff A., Choquet D.; Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* **417**, 649-652 (2002).
- Braithwaite S.P., Xia H., Malenka R.C.; Differential role for NSF and GFIP/ABP in AMPA receptor cycling. *Proc. Natl. Sci. USA* **99**, 7096-7101 (2002).
- Bray D. Membrane biophysics - the dynamics of growing axons. *Curr. Biol.* **6**, 241-243 (1996).
- Bussel SJ, Koch DL, Hammer DA. *Biophys. J.* **68**, 1836-49 (1995).
- Carroll R.C., Beattie E.C., Xia H., Luscher C., Altschuler Y., Nicoll R.A., Malenka R.C., et Von Zastrow M. Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 14112-14117 (1999a).
- Carroll R.C., Lissin D.V., von Zastrow M., Nicoll R.A. et Malenka R.C.; Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to Long Term Depression in hippocampal cultures. *Nature Neurosci.* **2**, 454-460 (1999b).
- Carroll R.C., Zukin R.S.; NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci.* **25**, 571-577 (2002).
- Chen L., Nicoll R.A. et al.; Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* **408**, 936-943 (2000).
- Coussen F., Choquet D., Sheetz M.P., Erickson H.P. ; Trimers of the fibronectin cell adhesion domain localize to actin filament bundles and undergo rearward translocation. *J. Cell Science* **115**, (2002).
- Dahan M, Lévi S., Luccardini C., Rostaing P., Riveau B., Triller A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* **302**, 442-5 (2003).
- Derkach V., Barria A., Soderling T.R; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3269 (1999).
- DeSouza S., Fu J., Bradley A.S., Ziff E.B.; Differential palmitoylation directs the AMPA receptor-binding protein ABP to spines or to intracellular clusters. *J. Neurosci.* **22**, 3493-3503 (2002).

- Dosemeci A., Tao-Cheg J.H., Vinade L., Winters C.A., Pozzo-Miller L., Reese T.S. Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 10428-10432 (2001).
- El-Din El-Husseini A., Brecht D.S.; Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. *Nature Rev. Neuro.* **3**, 791-802 (2002).
- Ehlers M.D.; Reinsertion and degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* **28**, 511-525 (2000).
- Felsenfeld D.P., Choquet D., Sheetz M.P. Ligand binding regulates the directed movement of β_1 integrins on fibroblasts. *Nature* **383**, 438-440 (1996).
- Fong D.K. et al. Rapid synaptic remodeling by protein kinase C : reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependant kinase II. *J. Neurosci.* **22**, 2153-64 (2002).
- Fowler, Erickson ; Trinodular structure of fibrinogen. *J. Mol. Biol.* **134**, 241-249 (1979),
- Gensch T., Hofkens J., Köhn F., Vosch T., Herrmann A., Müllen K., De Schryver F.C. ; Polarisation sensitive single molecule fluorescence detection with linear polarised excitation light and modulated polarisation direction applied to multichromophoric entities. *Single Mol.* **2**, 35-44 (2001).
- Greger I.H., Khatri L., Kong X., and Ziff E.Z. ; AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* **40**, 763-774 (2003).
- Griesbeck O., Baird G.S., Campbell R.E., Zacharias D.A., Tsien R.Y. ; Reducing the environmental sensitivity of Yellow Fluorescent Protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 29188-194 (2001).
- Groc L., Heine M., Cognet L., Stephenson F.A., Lounis B., Choquet B. ; Differential activity-dependent regulation of AMPA and NMDA receptors. *Nat. Neuro.* sous presse (2004)
- Grosshans D.R. et al. ; LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nat. Neurosci.* **5**, 27-33 (2002).
- Harms G.S., Cognet L., Lommerse P.H.M., Blab G.A., Schmidt T. ; Autofluorescent proteins in single-molecule research : applications to live cell imaging microscopy. *Biophys. J.* **80**, 2396-2408 (2001a).
- Harms G.S., Cognet L., Lommerse P.H.M., Blab G.A., Kahr H., Gamsjäger R., Spaink H.P., Soldatov N.M., Romanin C., Schmidt T. ; Single-molecule imaging of L-type Ca^{2+} channels in live cells. *Biophys. J.* **81**, 2639-46 (2001b).
- Hawkins L., Chazot P., Stephenson F.A.. *J. Biol. Chem.* **274**, 774 (1999).
- Hebb D.O.; The organization of Behavior : a Neuropsychological Theory. Wiley, New York (1949).
- Hofkens J. et al. ; Excited state processes in individual multichromophore systems. *Proc. of SPIE* **4962** (2003).
- Hoop M.J., Meyn L., Dotti C.G. Culturing Hippocampal neurons and astrocytes from fetal rodent brain. Cell biology : a laboratory handbook. Seconde édition (1998). Academic Press.
- Jacobson K., Sheets E.D., Simson R. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* **268**, 1441-1442 (1995).
- Kim J.J., et Diamond D.M.; The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memory. *Nature Rev. Neuro.* **3**, 453-462 (2002).
- Kusumi A., Sako Y., Yamamoto M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.* **65**, 2021-2040 (1993).

- Kusumi A, Sako Y. Compartmentalized structure of the plasma for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *Biophys. J.* **125** :1251-64 (1994).
- Lee S.H., Liu L., Wang Y.T., Sheng M.; Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* **36**, 661-674 (2002).
- Lets V.A., et al.; The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel γ subunit. *Nature Genet.* **19**, 340-347 (1998).
- Lin J.W., Ju W., Foster K., Lee S.H., Ahmadian G., Wyszynski M., Wang Y.T., Sheng M.; Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalisation. *Nat. Neurosci.* **3**, 1282-1290 (2000).
- Lino R., Koyama I., Kusumi A. ; Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells : E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys. J.* **80**, 2667-77 (2001).
- Lledo P.M., Zhang X., Südhof T.C., Malenka R.C., Nicoll R.A.; Postsynaptic membrane fusion and long term potentiation. *Science* **279**, 399-403 (1998).
- Lommerse P.H.M., Blab G.H., Cognet L., Harms G.S., Snaar-Jagalska B.E., Spaink H.P., Schmidt T.; Single Molecule imaging of the H-Ras membrane-anchor reveals domains in the cytoplasmic leaflet of the cell membrane. *Biophys. J.* **86**, 609-616 (2004a).
- Lommerse P.H.M., Spaink H.P., Schmidt T.; In vivo plasma membrane organization: results of biophysical approaches. *Biochim. Biophys. Acta* **1664**, 119-131 (2004b).
- Lu W., Man H., Ju W., Trimble W.S., MacDonald J.F. et Wang Y.T.; Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **29**, 243-254 (2001).
- Luscher C., Xia H., Beattie E.C., Carroll R.C., von Zastrow M. Malenka R.C., Nicoll R.A. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* **24**, 649-58 (1999).
- Madden D.R.; The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nature Rev. Neuro.* **3**, 91-101 (2002).
- Malashkevich V. N., Kammerer R. A., Efimov V. P., Schulthess T., Engel J.; The crystal structure of a five-stranded coiled-coil in COMP: a prototype ion channel? *Science* **274**, 761-5 (1996).
- Malenka R.C., Kauer J.A., Perkel D.J., Mauk M.D., Kelly P.T., Nicoll R.A., Waxham M.N.; An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* **340**, 554-7 (1989)
- Malenka R.C., Nicoll R.A.; Silent synapses speak up. *Neuron* **19**, 473-476 (1997).
- Man Y.H., Lin J.W., Ju W.H., Ahmadian G., Liu L., Becker L.E., Sheng M. et Wang Y.T. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalisation. *Neuron* **25**, 649-662 (2000).
- Mayford M. et al.; *Science* **274**, 1678-1683 (1996).
- Meier J., Vannier C., Sergé A., Triller A., Choquet D. ; Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nature Neuro.* **4**, 253-60 (2001).

- Migaud M., Charlesworth P., Dempster M., Webster L.C., Watabe A.M., Makhinson M., He Y., Ramsay M.F., Morris R.G., Morrison J.H., O'Dell T.J., Grant S.G.; Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**, 433-439 (1998).
- Milner B., Corkin S. et Teuber H.-L.; Further analysis of the hippocampal syndrome : fourteen year follow-up study of H.M. *Neuropsychologia* **6**, 215-234 (1968).
- Muséum national d'histoire naturelle; Pas si bêtes! Mille cerveaux mille mondes. Nathan (1999).
- Noel J., Ralph G.S., Pickard L., Williams J., Molnar E., Uney J.B., Collinbridge G.L., Henley J.M.; Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependant mechanism. *Neuron* **23**, 365-376 (1999).
- Nusser Z.; AMPA et NMDA receptors: similarities and differences in their synaptic distribution. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 337-341 (2000).
- O'Brien R., Xu D., Mi R., Tang X., Hopf C., Worley P.; Synaptically targeted narp plays an essential role in the aggregation of AMPA receptors at excitatory synaptic in cultured spinal neurons. *J. Neurosci.* **22**, 4487-98 (2002).
- Ogston A.G., The space in a uniform random suspension of fibres. *Trans. Farad. Soc.* **54**, 1754-7 (1958)
- Osten P., et al.; Mutagenesis reveals a role for ABP/GRIP binding to GluR2 in synaptic surface accumulation of the AMPA receptor. *Neuron* **27**, 313-325 (2000).
- Pakalnis S., Sitas V., Schneckenburger H., Rotomskis R.; *Photobiology* (2000).
- Passafaro M., Piëch V., Sheng M.; Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nature Neuro.* **4**, 917-926 (2001).
- Peterman E.J.G.S., Brasselet S., Moerner W.E.; The fluorescence dynamics of single molecules of green fluorescent protein. *J. Phys. Chem. A* **103**, 10553-60 (1999).
- Petralia R.S., Wang Y.X., Wenthold R.J.; Internalization at glutamatergic synapses during development. *Eur. J. Neuro.* **18**, 3207-3217 (2003).
- Platenik J., Kuramoto N., Yoneda Y.; Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* **67**, 335-64 (2000).
- Pluen A., Netti P.A., Jain R.K., Berk D.A. ; Diffusion of macromolecules in agarose gels : comparison of linear and globular configurations. *Biophys. J.* **77**, 542-552 (1999).
- Pralle A., Keller P., Florin E.L., Simmons K., Horber J.K.; *J. Cell Biol.* **148**, 997 (2000).
- Rosenmund C., Stern-Bach Y., Stevens C.F. ; The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* **280**, 1596-99 (1998).
- Ryan T.A.; Presynaptic imaging techniques. *Curr. Op. Neuro.* **11**, 544-549 (2001).
- Saffman P.G., Delbrück M.; Brownian motion in biological membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 3111-3 (1975).
- Saxton M.J. Lateral diffusion in a mixture of mobile and immobile particles: a Monte Carlo study. *Biophys. J.* **58**, 1303-06 (1990).
- Saxton M.J. Lateral diffusion in an archipelago : dependence on tracer size. *Biophys. J.* **64**, 1766-80 (1993).
- Saxton M.J. Anomalous diffusion due to obstacles : a Monte Carlo study. *Biophys. J.* **66**, 394-401 (1994).
- Saxton M.J. Single particle tracking : effects of corrals. *Biophys. J.* **69**, 389-98 (1995).
- Saxton M.J. ; Anomalous diffusion due to binding : a Monte Carlo study. *Biophys. J.* **70**, 1250-62 (1996).

- Schorge S., Colquhoun D. *J. Neurosci.* **23**, 1151 (2003).
- Schutz G.J., Schindler H., Schmidt Th.; Single-Molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophys. J.* **73**, 1073-80 (1997).
- Scoville W.B., Milner B.; Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **20**, 11-21 (1957).
- Sergé A., Fourgeaud L., Hémar A., Choquet D.; Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of mGluR5 in the neuronal membrane. *J. Neurosci.* **22**, 3910-20 (2002)
- Sheets E.D., Lee G.M., Simson R., Jacobson K.; Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma. *Biochemistry* **36**, 12449-12458 (1997).
- Shi S.H., Hayashi Y., Esteban J.A., Malinow R.; Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* **105**, 331-343 (2001).
- Shikorski T., Stevens C.F.; Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci.* **17**, 5858-67 (1997).
- Shutz G.J., Kada G., Pastushenko V.P., Schindler H.; *EMBO J.* **19**, 892 (2000).
- Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).
- Song J.Y., Ichtchenko K., Sudhof T.C., Brose N.; Neuroligin 1 is a post synaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1100-5 (1999).
- Squire, Kandel. La mémoire (De l'esprit aux molécules). 1^{ère} édition, DeBoeck Université (2002).
- Stryer L., Berg J.M., Tymoczko J.L., Biochimie, 5^{ème} édition, Médecine-Sciences, Flammarion.
- Subczynski W.K., Kusumi A. Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labelling and single molecule optical microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1610**, 231-243 (2003).
- Südhof T.; The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interaction. *Nature* **375**, 645-653 (1995).
- Takumi Y., Ramirez-Leon V., Laake P., Rinvik E., Ottersen O.P.; Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat. Neurosci.* **2**, 618-624 (1999).
- Tomita S., Fukata M. Nicoll R.A., Brecht D.S. Dynamic interaction of stargazing-like TARPs with cycling AMPA receptors at synapses. *Science* **303**, 1508-11 (2004).
- Tovar K.R., Westbrook G.L.; Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* **34**, 255-264 (2002).
- Tsien J.Z., Huerta P.T., Tonegawa S.; The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* **87** (1996).
- Uchida N., Honjo Y., Johnson K.R., Wheelock M.J., Takeicji M.; The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol.* **135**, 767-79 (1996).
- Vissel B. et al.; A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nat. Neurosci.* **4**, 587-596 (2001).
- Watt A.J., Sjöström P.J., Häusser M., Nelson S.B., Turrigiano G.G.; A proportional but slower NMDA potentiation follows AMPA potentiation in LTP. *Nat. Neuro.* **7**, 518-524 (2004).
- Wenthold R.J., Petralia R.S., Blahos J., Niedzielski A.S.; Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J. Neurosci.* **16**, 1982-1989 (1996).

- Weston K.D., Dyck M., Tinnefeld P., Muller C., Herten D.P., Sauer M. ; Measuring the number of independent emitters in single-molecule fluorescence images and trajectories using coincident photons. *Anal Chem.* **74**, 5342-49 (2002).
- Xiao M.Y., Wasling P., Hanse E., Gustafsson B.; Creation of AMPA-silent synapses in the neonatal hippocampus. *Nat. Neurosci.* **7**, 236-243 (2004).
- Yoshikami D., Okun L.M.; Staining of living presynaptic nerve terminals with selective fluorescent dyes. *Nature* **310**, 53-6 (1984).
- Zhou Q., Xiao M., Nicoll R.A., Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1261-1266 (2001).
- Zhu J.J., Qin Y., Zhao M., Van Aelst L., Malinow R.; Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during Synaptic plasticity. *Cell* **110**, 443-455 (2002).

Chapitre 3

Imagerie photothermique

L'observation d'une biomolécule, telle qu'une protéine, un lipide, un ARN messager ou autre, requiert le marquage de ces biomolécules, selon des techniques évoquées dans le Chapitre 1. Les marqueurs doivent remplir plusieurs conditions : ils doivent à la fois présenter un signal intense et durable, être solubles dans un milieu aqueux, pouvoir être liés de façon spécifique à la biomolécule d'intérêt, et être les moins perturbateurs possibles.

L'imagerie la plus couramment employée en biologie est la microscopie de fluorescence, pour laquelle les marqueurs usuels sont des fluorophores ou des protéines fluorescentes. Cependant, comme nous l'avons présenté antérieurement, le photoblanchiment rapide de ces marqueurs ne permet pas de réaliser de longues observations des biomolécules. Aussi, l'apparition des nanoparticules semi-conductrices, très résistantes au photoblanchiment a-t-il suscité un intérêt grandissant [Dabbousi 1997]. Ces particules, dont la taille initiale est de l'ordre de quelques nanomètres, doivent être fonctionnalisées avant de pouvoir servir de marqueurs biologiques. Si cette étape obligatoire diminue légèrement les propriétés photophysiques de ces nanocristaux semi conducteurs, elle augmente surtout leur diamètre, qui excède alors 15 nm [Chan 2002]. De plus, les nanoparticules semi conductrices ont une émission peu stable.

Un autre type de particules a connu un fort développement, en vue de son utilisation comme marqueur biologique : ce sont les particules d'or. En effet, depuis trente ans, elles sont utilisées dans des expériences d'immunocytochimie et observées en microscopie électronique [Faulk 1971]. Des particules d'or, de diamètre aussi faible que 5 nm, peuvent ainsi être détectées. Ce sont des colloïdes, sur lesquels est adsorbée toute une variété d'anticorps secondaires ou de la streptavidine. Les particules d'or existent aussi sous forme d'agrégats de 0.8 nm ou 1.4 nm, contenant respectivement 11 et 67 atomes d'or, qui ne s'agrègent pas et dont la taille est parfaitement contrôlée [Hainfeld 2000]. Ces agrégats sont pourvus de groupements extérieurs, déterminés lors de leur synthèse, qui permettent leur fusion avec les biomolécules choisies, comme c'est le cas avec les fluorophores de synthèse. Ils peuvent, de plus, pénétrer jusqu'à une profondeur de 40 μm dans des tissus biologiques.

Optiquement, la technique basée sur la détection du champ diffusé, qui utilise un dispositif D.I.C. couplé à une amplification du signal vidéo, a permis de suivre le mouvement

de protéines membranaires, dans des cellules vivantes [Sheetz 1989]. Cependant, il est impossible de détecter des particules d'or de diamètre inférieur à 40 nm de diamètre, du fait de la grande sensibilité au fond, de cette méthode.

Dans ce contexte, a été développé, par notre groupe, un nouveau type d'imagerie, basée sur l'effet photothermique [Boyer 2002]. Nous présenterons d'abord le principe de cette nouvelle technique. Nous détaillerons ensuite un modèle permettant d'évaluer le signal et la résolution de cette technique. Puis, nous présenterons les premiers essais d'imagerie photothermique sur des systèmes biologiques. Enfin, nous évoquerons les perspectives et limitations de la technique.

I. Détection de nanoparticules d'or par effet photothermique

L'attrait pour les nanoparticules d'or, en optique, trouve son origine dans l'existence d'un processus d'absorption important, qui est amplifié par le phénomène de résonance plasmon de surface. Celui-ci correspond à une oscillation cohérente des électrons de conduction, engendrée par l'interaction avec un champ électromagnétique extérieur. Dans ce chapitre, nous allons d'abord décrire cette interaction, puis présenter le principe de la technique photothermique.

A. Interaction d'un champ électromagnétique avec une nanoparticule métallique

Une fraction de l'énergie électromagnétique incidente est à l'origine d'un champ diffusé, le reste est absorbé par la particule métallique.

L'interaction avec un champ électromagnétique plan et monochromatique, noté \vec{E}_i , d'une sphère métallique homogène, de diamètre a et de constante diélectrique complexe ϵ_p , plongée dans un milieu diélectrique homogène de constante diélectrique ϵ_m , est décrite dans le cadre de la théorie de Mie (Figure 108). Celle-ci consiste à résoudre les équations de Maxwell, en prenant en compte la symétrie sphérique du système, les relations de passage à la surface de la sphère, et les conditions aux limites [Born & Wolf 1980].

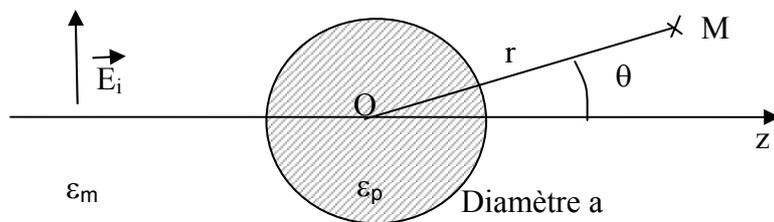


Figure 108: schéma de la nanoparticule en présence d'un champ électrique

Lorsque la taille des particules devient très inférieure à la longueur d'onde, le premier ordre du développement de la théorie de Mie suffit à décrire les phénomènes observés. Pour des particules d'or, cette approximation est valable pour des diamètres inférieurs à 25 nm [Link 1999]. Les champs diffusés sont alors ceux calculés à partir du modèle simplifié de la diffusion Rayleigh.

Le champ incident de longueur d'onde λ induit dans la particule un moment dipolaire, qui s'obtient comme dans le cas électrostatique. La résolution de l'équation de Laplace à l'extérieur et à l'intérieur de la particule, avec les conditions aux limites en $r \rightarrow \infty$ et en $r=a$, donne, pour le moment dipolaire, l'expression suivante :

$$\vec{p} = 4\pi\epsilon_0 \vec{E}_i (a/2)^3 \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m} \quad \text{Équation 33}$$

Ce dipôle donne lieu à un champ diffusé, qui, à longue distance, s'écrit :

$$\vec{E}_{\text{dif}} = (k^2/4\pi\epsilon_0 r) e^{ikr} (\vec{u}_r \times \vec{p}) \times \vec{u}_r \quad \text{Équation 34}$$

On peut en déduire l'expression des sections efficaces de diffusion σ_{dif} et d'absorption σ_{abs} :

$$\sigma_{\text{dif}} = (128\pi^5/3\lambda^4) (a/2)^6 \left| \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m} \right|^2 \quad \text{Équation 35}$$

$$\sigma_{\text{abs}} \approx \sigma_{\text{ext}} = (8\pi^2/\lambda) (a/2)^3 \text{Im} \left(\frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m} \right) \quad \text{Équation 36}$$

où σ_{ext} , section efficace d'extinction, est la somme des sections efficaces de diffusion et d'absorption.

Ces sections efficaces de diffusion et d'absorption présentent un maximum lorsque $\epsilon_p \rightarrow -2\epsilon_m$, la particule est alors à résonance plasmon. Pour une particule d'or plongée dans l'eau, elle est située autour de 520 nm. Pour des particules d'or de faible diamètre, décrites dans l'approximation de Rayleigh, la position spectrale de la résonance est indépendante de la taille des particules. Quant au maximum d'absorption de la section efficace d'absorption, il est d'autant plus élevé que l'indice du milieu est grand (Figure 109).

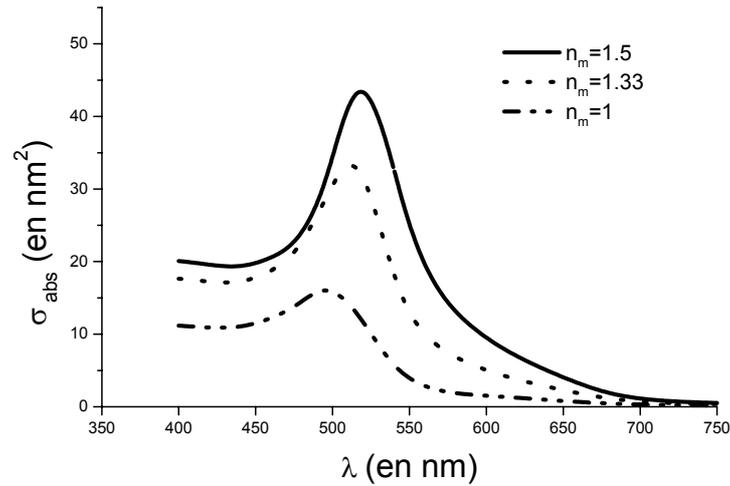


Figure 109 : Calcul, dans la théorie de Rayleigh, de la section efficace d'absorption d'une particule de 10 nm de diamètre, insérée dans des milieux d'indices différents, en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente.

De plus, la section efficace d'absorption, variant en a^3 , l'emporte sur la section de diffusion, qui varie en a^6 (Figure 110). Par exemple, des particules d'or de 10 nm de diamètre ont une section efficace d'absorption, à $\lambda=514$ nm, plus de 1000 fois plus importante que la section efficace de diffusion. Cet effet explique la difficulté de détecter le champ diffusé par des particules d'or de diamètre inférieur à 40nm.

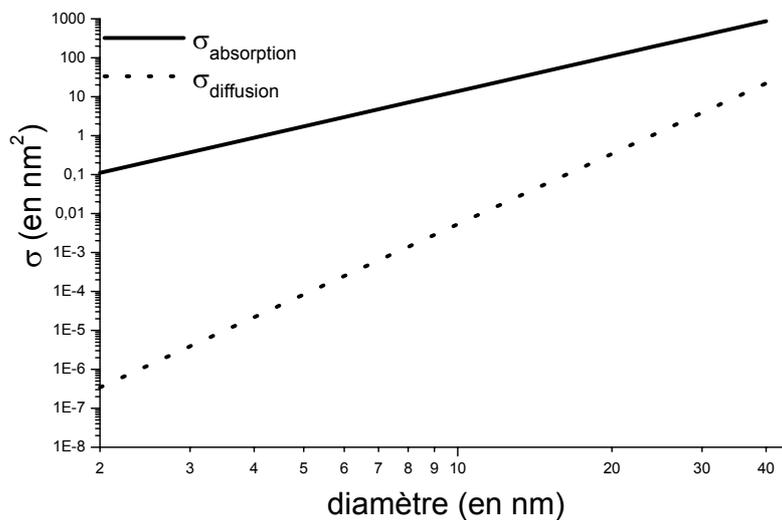


Figure 110: Calcul, dans la théorie de Rayleigh, des sections efficaces d'une particule dans l'air, soumise à une lumière incidente de longueur d'onde égale à 514nm, en fonction de son rayon

B. Détection de l'effet photothermique

L'imagerie photothermique tire profit des valeurs relativement élevées de la section efficace d'absorption pour des particules nanoscopiques

1. Principe

Les particules métalliques ne luminescent pas ou peu. L'absorption d'énergie, dans ces nanoparticules, induit tout d'abord l'excitation des électrons de conduction du métal. S'en suit une thermalisation de ce gaz d'électrons grâce à des interactions électrons-électrons, qui se produisent sur des durées de l'ordre de la femtoseconde, et à des interactions électrons-phonons du réseau métallique qui sont achevées sur des durées de plusieurs picosecondes. Les phonons du réseau métallique interagissent ensuite avec les phonons du milieu environnant, donnant lieu à un transfert thermique [Link 1999]. Ainsi, les particules deviennent des sources de chaleur, et induisent une élévation locale de la température du milieu environnant, et par suite une modification de l'indice du milieu.

Différentes méthodes ont été mises en œuvre pour détecter cette variation locale d'indice [Boccaro 1996, Kitamori 1989, Mawatari 1998]. La méthode interférentielle s'est avérée la plus sensible, nous l'avons reprise dans notre méthode de détection. La source de chaleur est modulée afin de s'affranchir des variations d'indices dues à la topologie. La variation locale d'indice induite et modulée périodiquement est alors sondée par un faisceau laser. Nous avons dénommé notre méthode de détection PIC, pour *Photothermal Interferential Contrast*.

2. Dispositifs expérimentaux et caractérisation

a) Observation d'échantillons fins : montage en réflexion

(1) Montage optique

Les premiers échantillons observés, en détection photothermique, sont des colloïdes d'or dilués dans une solution de PVOH à 1% et étalés par 'spin coating' sur des lamelles de verre. Ces échantillons minces ont été imagés dans un montage en réflexion (Figure 111).

La modulation de la source de chaleur est réalisée grâce à un faisceau laser de chauffage, de longueur d'onde ($\lambda=514$ nm) voisine de la résonance plasmon de l'or dans l'eau, qui est modulé à des fréquences de plusieurs centaines de kHz, à l'aide d'un modulateur acousto-optique. Le premier ordre de la diffraction est envoyé dans le microscope à l'aide d'un miroir dichroïque, et focalisé sur l'échantillon ($\times 100$, $NA=1.4$). L'intensité du faisceau de chauffage, atteignant l'échantillon, est de l'ordre de quelques milliwatts, lorsque l'on image des particules de 10 nm de diamètre. Son alignement sur l'un des faisceaux sonde est réalisé grâce à deux miroirs placés devant le miroir dichroïque.

Le faisceau sonde, polarisé linéairement, traverse un cube de polarisation, et arrive sur un prisme de Wollaston dont les axes sont orientés à $\pm 45^\circ$ de la polarisation du faisceau. Le faisceau sonde est donc divisé en deux faisceaux d'égale intensité, de l'ordre de quelques milliwatts, avec un angle de séparation d'environ 0.1° . Les deux faisceaux sondes sont focalisés sur l'échantillon, avec une distance de séparation des deux taches de diffraction d'environ $1 \mu\text{m}$.

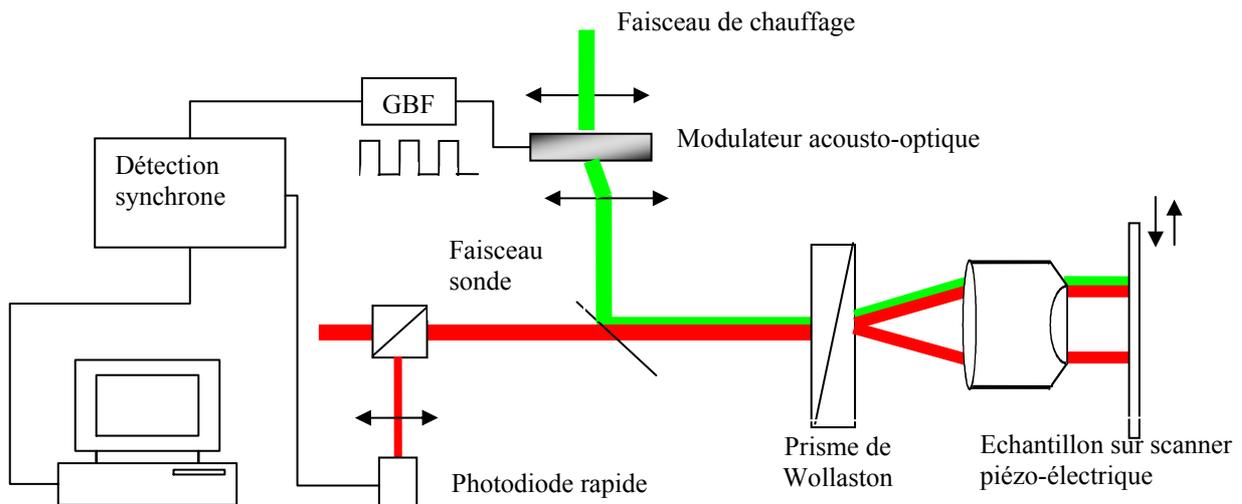


Figure 111: schéma de principe du dispositif photothermique

Les deux faisceaux sondes sont réfléchis à l'interface air/ lamelle, sur laquelle les nanoparticules d'or sont étalées, ce qui représente environ 4% du faisceau incident. Les deux faisceaux sont ensuite recombinaés par le prisme de Wollaston. La fraction du faisceau recombinaé, qui est polarisée perpendiculairement au faisceau incident, est dirigée sur un filtre coloré Shott, puis focalisée sur la photodiode rapide. Le signal recueilli, de l'ordre d'une centaine de μW , est ensuite démodulé à la fréquence de modulation du faisceau pompe. Une zone de l'échantillon est ensuite visualisée grâce au déplacement du scanner portant l'échantillon.

La qualité du signal interférométrique dépend principalement de la recombinaison correcte des deux faisceaux sondes. La meilleure recombinaison se produit lorsque les faisceaux empruntent le même chemin avant et après réflexion, ce qui impose que les deux faisceaux coupent l'axe optique au plan focal arrière de l'objectif, comme nous l'avons expliqué dans la présentation du DIC (Figure 2). Pour un objectif de fort grossissement ($\times 100$, $NA=1.4$), le plan focal arrière est inaccessible, il est nécessaire alors d'ajouter un système télécentrique (Figure 112).

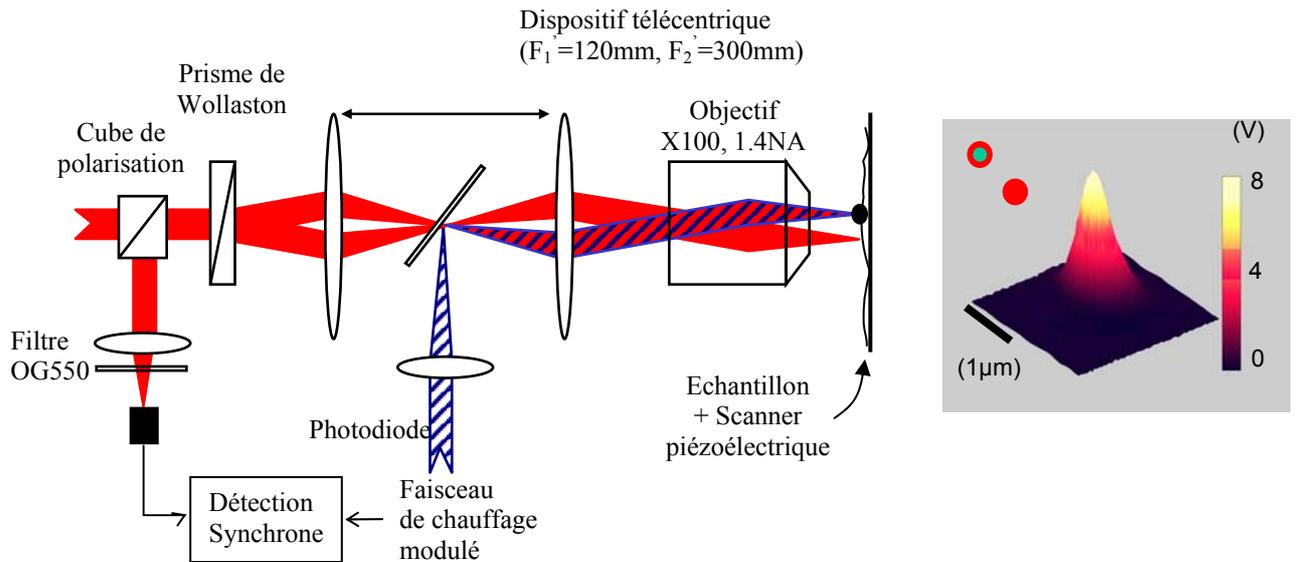


Figure 112 : montage PIC en réflexion et image d'une particule d'or de 20 nm

(2) Résultats

Ce montage en réflexion a permis d'observer avec un rapport signal sur bruit de 10 des billes d'or de 5 nm de diamètre (Figure 113).

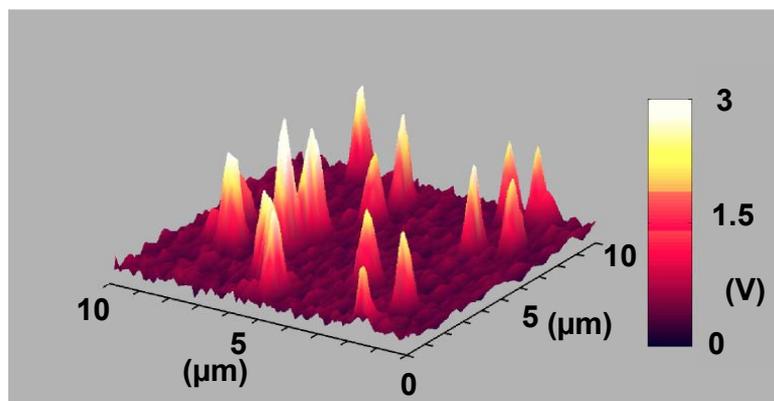


Figure 113 : Détection PIC, dans le montage en réflexion, de particules d'or de 5 nm de diamètre dans un film mince de PVA (100*100 pixels, 10 ms/pixel, $f_{mod} = 800\text{ kHz}$, $I \sim 20\text{ MW.cm}^{-2}$) [Boyer 2002].

Le signal détecté est dû à un effet photothermique. En effet, il varie linéairement avec le volume de la particule, et avec l'intensité de chauffage. De plus, le signal ne sature pas aux intensités employées, qui peuvent atteindre plusieurs dizaines de $\text{MW}\cdot\text{cm}^{-2}$.

En détection de molécule unique, le critère permettant d'affirmer, que l'on observe un fluorophore individuel, est donné par son extinction instantanée (Figure 40). Dans le cas de la détection PIC, les nanoparticules ne photoblanchissent pas, il est nécessaire de définir un nouveau critère : la distribution des signaux détectés. Comme le signal photothermique est proportionnel au cube du diamètre des particules, on s'attend à trouver une distribution unimodale de largeur égale à trois fois la dispersion, sur la taille des particules. Les signaux détectés sur des échantillons faiblement concentrés, contenant des particules d'une taille donnée, forment effectivement une telle distribution (Figure 114). Cette technique PIC permet donc d'observer des nanoparticules d'or individuelles.

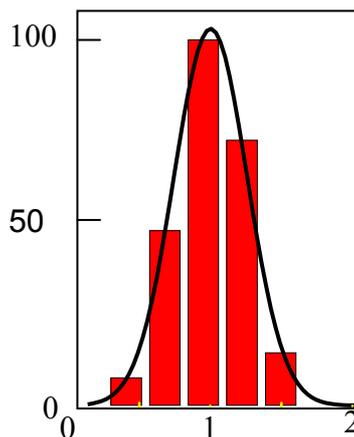


Figure 114 : distribution des signaux détectés pour des particules de 10 nm

Le signal détecté, en imagerie photothermique est insensible à la diffusion parasite. Ceci a pu être montré grâce à la visualisation d'un échantillon contenant à la fois des billes de latex de 300 nm, d'or de 80 nm, dont la diffusion est observable grâce au DIC (Figure 115 (a)), et des particules d'or de 10 nm uniquement détectables en imagerie photothermique. Dans les images PIC, les billes de latex restent invisibles (Figure 115 (b)). Cette insensibilité à la diffusion se maintient même à des puissances de chauffage élevées ($1.5 \text{ MW}\cdot\text{cm}^{-2}$), pour lesquelles les signaux issus des billes de 80 nm sont saturés.

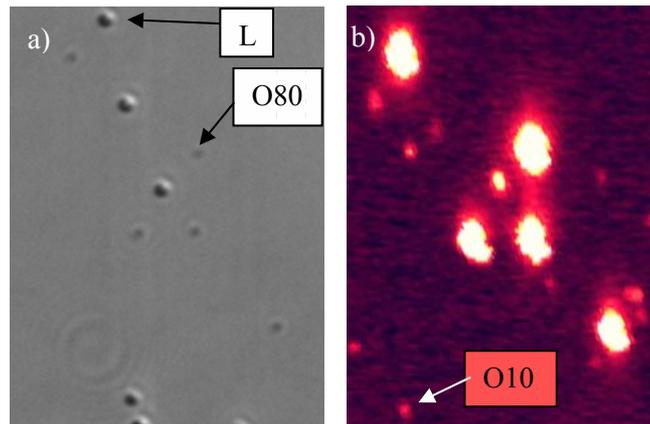


Figure 115 : échantillons contenant des billes de latex de 300 nm (L), d'or de 80 nm (O80), de 10 nm (O10), (a) observées en DIC, (b) en imagerie photothermique avec une puissance de chauffage de 1.5 MW.cm^{-2}

b) Observation d'échantillons épais : montage en transmission

Les nanoparticules d'or, qui marquent des biomolécules contenues dans des cellules, ne se trouvent pas nécessairement à l'interface air lamelle. L'observation d'échantillons biologiques, généralement maintenus entre deux lamelles de verre, a donc nécessité la mise en œuvre d'un système monté en transmission (Figure 116). Nous avons choisi d'ajouter, au dispositif précédent, un système afocal permettant la rétroflexion des faisceaux sondes après leur traversée de l'échantillon. Ce système afocal est formé par un objectif ($\times 100$, $\text{NA}=0.8$), permettant la collecte des deux faisceaux transmis, et une seconde lentille ($f=100\text{mm}$) assurant comme précédemment la focalisation des faisceaux sur le miroir avec une incidence normale. Afin de détecter les particules avec un rapport signal sur bruit de 10, l'intensité faisceau de chauffage, arrivant sur l'échantillon, est de l'ordre de 1 MW.cm^{-2} .

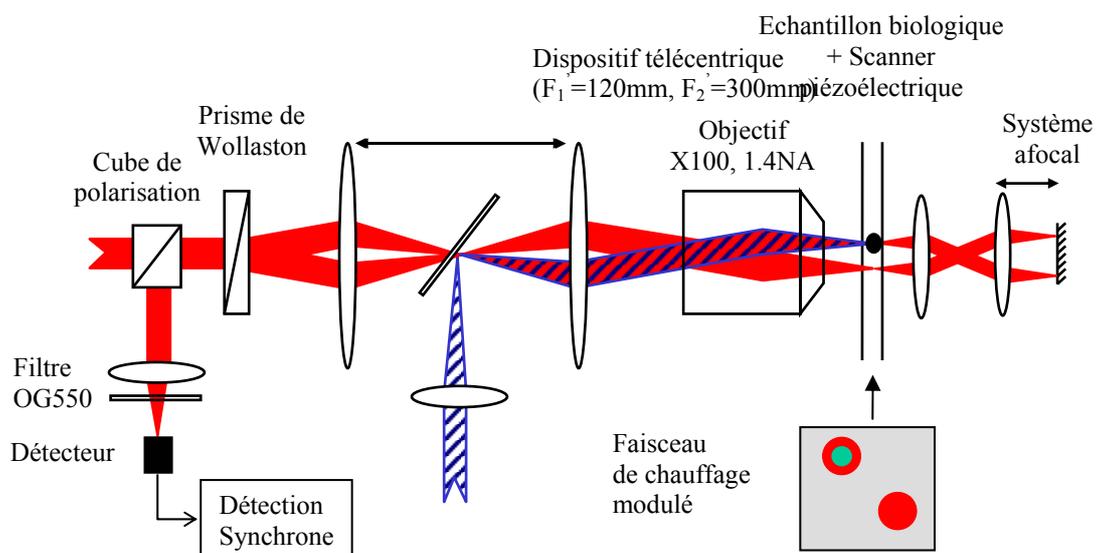


Figure 116: montage PIC en transmission

C. Signal détecté dans le montage en transmission

En vue d'une utilisation sur des systèmes biologiques, il est important de connaître la résolution de cette méthode pour évaluer sa capacité à visualiser en trois dimensions. Nous tenterons aussi de calculer le déphasage maximal induit par une nanoparticule d'or chauffée.

1. Température et indice du milieu

En première approximation, nous assimilons la particule à une source ponctuelle de chaleur placée à l'origine de notre système de coordonnées $\vec{r}_0 = \vec{0}$.

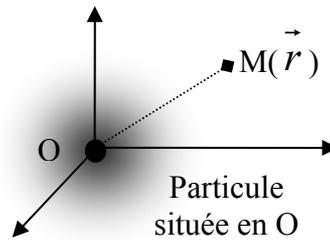


Figure 117: Localisation de la particule et point M où est calculée la température

Afin d'évaluer l'élévation de température au voisinage de la particule, nous effectuons un bilan de l'énergie thermique à travers une surface sphérique centrée sur la particule. La variation d'énergie interne à l'intérieur de cette surface par unité de temps est due à l'échange d'énergie à travers cette surface et à l'énergie produite à l'intérieur de cette surface. Le terme de production d'énergie thermique correspond à l'énergie absorbée par la particule qui est dissipée dans le milieu. Le faisceau incident, utilisé pour « chauffer » la particule, étant modulé à la pulsation ω , la puissance absorbée par la particule est égale à :

$$P_{abs} = \sigma_{abs} I_{Chauffage} (1 + \cos(\omega t)) \quad \text{Équation 37}$$

L'équation de la chaleur, régissant la température du milieu, s'écrit donc, pour un point du milieu localisé en \vec{r} :

$$C \frac{\partial T}{\partial t} + K \Delta T = \sigma_{abs} I_{Chauffage} (1 + \cos(\omega t)) \delta(\vec{r}) \quad \text{Équation 38}$$

avec $\lim_{r \rightarrow \infty} T = T_0$, où T_0 est la température du milieu très loin de la particule, C la capacité calorifique du milieu ($4,2 \cdot 10^6 \text{ J.K}^{-1}.\text{m}^{-3}$ pour l'eau), et K sa conductivité thermique ($0,6 \text{ W.K}^{-1}.\text{m}^{-1}$ pour l'eau).

On résout cette équation en se plaçant en régime permanent, et en tenant compte de la symétrie sphérique du système [Carslaw 1986]. La température du milieu, à une distance r de la particule, est donnée par l'expression suivante :

$$T(r, t) - T_0 = \frac{\sigma_{\text{abs}} I_{\text{Chauffage}}}{4\pi K r} [1 + \exp(-r / R_{\text{th}}) \cos(\omega t - r / R_{\text{th}})] \quad \text{Équation 39}$$

où R_{th} est la longueur caractéristique de diffusion thermique, et est égale à $\sqrt{2K/\omega C}$. Elle vaut environ 300 nm, dans un milieu constitué d'eau et pour une fréquence de modulation égale à 1 MHz.

L'élévation de la température du milieu varie donc proportionnellement à la section efficace d'absorption de la particule, i.e. au volume de la particule, à l'intensité du faisceau de chauffage, et à l'inverse de la distance à la particule.

L'élévation locale de la température provoque une dilatation du milieu, qui se traduit par une variation de son indice de réfraction au voisinage de la particule. En première approximation, nous considérons que l'indice du milieu varie linéairement avec la température, avec pour l'eau $\frac{\partial n}{\partial T} \approx 10^{-4} K^{-1}$ à température ambiante [Tilton 1938]. L'indice du milieu s'écrit donc :

$$\Delta n(r, t) = \frac{\partial n}{\partial T} \cdot \frac{\sigma_{\text{abs}} I_{\text{chauffage}}(0)}{4\pi K R_{\text{th}}} \cdot \frac{\exp(-r/R_{\text{th}}) \cos(\omega t - r / R_{\text{th}})}{r} \quad \text{Équation 40}$$

L'indice du milieu chute rapidement lorsqu'on s'éloigne de la particule.

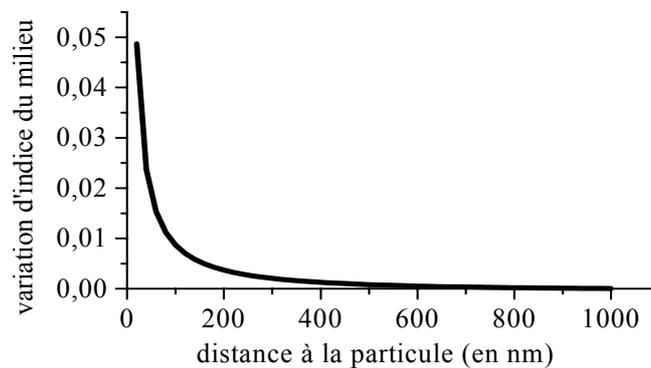


Figure 118 : variation de l'indice en fonction de la distance par rapport à la particule

La variation d'indice, en un point situé en \vec{r} , est le produit de l'intensité du faisceau de chauffage, à la position de la particule localisée en O, par une fonction dépendant de la distance à la particule et du temps.

$$\Delta n(\vec{r}, t) = I_{\text{Chauffage}}(0) \times f(|\vec{r}|, t) \quad \text{Équation 41}$$

2. Modélisation du signal détecté

Nous considérons que, l'épaisseur du milieu diffusant autour de la bille et la variation d'indice sont suffisamment faibles pour assimiler le milieu traversé par les faisceaux, à un objet de phase. La particule est localisée dans la zone de focalisation du faisceau laser sonde. On fait alors l'hypothèse que le front d'onde du faisceau incident est plan au niveau de l'échantillon.

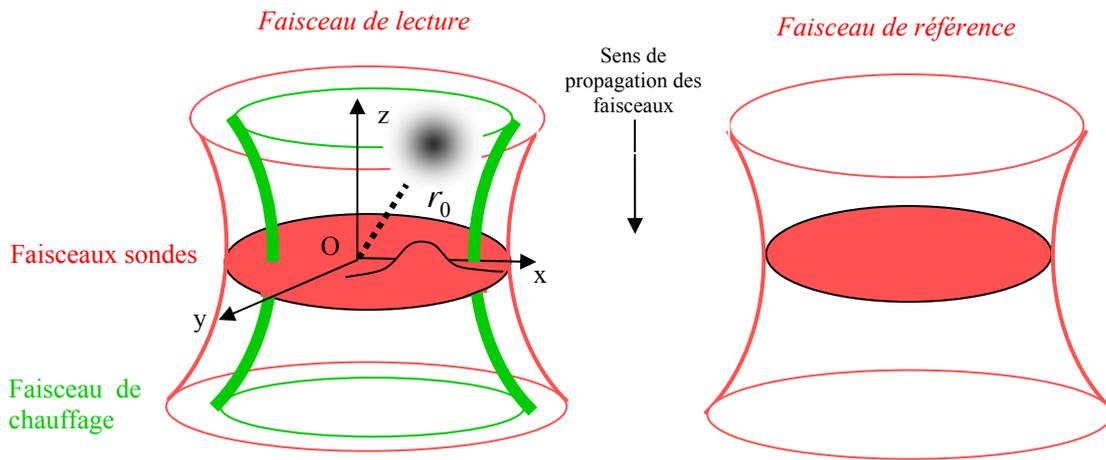


Figure 119: repère utilisé pour la modélisation, les faisceaux sonde et de chauffage étant centrés en O.

Nous nous plaçons, pour ce calcul, dans le repère fixe et centré par rapport aux faisceaux incidents, dans lequel la particule est localisée en \vec{r}_0 . La puissance, recueillie par le détecteur, est égale à :

$$P(\vec{r}_0) = \iint \eta I_{\text{sonde}}(\vec{r}) [1 + \cos(\Phi + \delta_{\text{chauffage}}(\vec{r}, \vec{r}_0, t))] d^2s \quad \text{Équation 42}$$

Les déphasages, qui interviennent dans le signal interférométrique, sont le déphasage $\delta_{\text{chauffage}}$ dû au chauffage de la particule, et le déphasage Φ . Celui-ci apparaît entre les deux faisceaux sondes en l'absence de chauffage, et provient de la traversée de l'échantillon et du prisme de Wollaston. Les phases sont ajustées, grâce au réglage fin du Wollaston, de telle sorte que la

sensibilité soit maximale. On se place à mi frange i.e. $\Phi \approx \pi/2$. Le facteur η tient compte des facteurs de transmission à travers le système optique et de la réflexion sur le miroir.

De plus, comme le déphasage induit par le chauffage, est très faible, nous pouvons nous contenter du premier ordre du développement. Le signal détecté, après démodulation, a pour expression :

$$P(\vec{r}_0) \approx \iint \eta I_{sonde}(\vec{r}) \delta_{chauffage}(\vec{r}, \vec{r}_0, t) d^2s \quad \text{Équation 43}$$

avec $\delta_{chauffage}(x, y) = \int \frac{2\pi}{\lambda} \Delta n(|\vec{r} - \vec{r}_0|, \vec{r}_0) dz = \frac{2\pi}{\lambda} I_{chauffage}(\vec{r}_0) \int f(|\vec{r} - \vec{r}_0|, t) dz$

On constate que le signal est le produit du profil de chauffage, par le produit de convolution du profil du faisceau sonde et de la variation d'indice. Cette expression va nous permettre d'évaluer la résolution du dispositif photothermique, obtenue quand on balaie l'échantillon, i.e. quand la particule se déplace par rapport aux faisceaux laser.

Cette expression peut être évaluée à l'aide d'une simulation numérique. Nous souhaitons comprendre qualitativement l'influence de la focalisation du faisceau de chauffage sur la résolution et évaluer le déphasage induit par la particule, aussi faisons-nous appel à une modélisation du système. Nous assimilons la zone où se produit cette variation rapide d'indice, modulée dans le temps, à une sphère de rayon ρ_{Th} et d'indice homogène $\overline{\Delta n}(\vec{r}_0)$, modulé de façon identique (Figure 120).

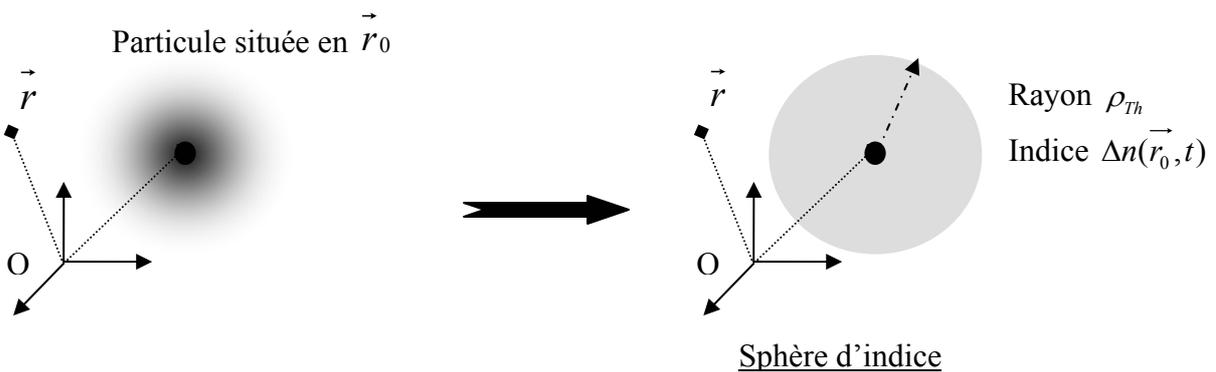


Figure 120: modèle de la sphère d'indice

Le rayon ρ_{Th} de la sphère d'indice est défini comme la distance moyenne au centre de la particule, pondérée par la variation d'indice :

$$\rho_{Th} = \frac{\iiint r \times \Delta n(|\vec{r} - \vec{r}_0|, \vec{r}_0) d^3 \vec{r}}{\iiint \Delta n(|\vec{r} - \vec{r}_0|, \vec{r}_0) d^3 \vec{r}} = \sqrt{2}R \quad \text{Équation 44}$$

Quant à l'indice moyen défini dans cette sphère, $\overline{\Delta n(\vec{r}_0)}$, il correspond à la valeur moyenne de l'indice calculée sur le volume de la sphère d'indice, soit finalement :

$$\overline{\Delta n(\vec{r}_0)} = 0.34 \frac{\partial n}{\partial T} \cdot \frac{\sigma_{abs} I_{chauffage}(\vec{r}_0)}{4KR_{th}} \quad \text{Équation 45}$$

Dans ce modèle, la puissance du signal détecté, en fonction de la position de la particule par rapport au centre des faisceaux (\vec{r}_0), s'écrit:

$$I_{détectée}(\vec{r}_0) = \frac{4\pi}{\lambda} \eta' \times I_{chauffage}(\vec{r}_0) \iint I_{sonde}(x, y, z_0) \sqrt{\rho_{Th}^2 - (x - x_0)^2 - (y - y_0)^2} dx dy \quad \text{Équation 46}$$

$$\text{avec } \eta' = \eta \times 0.34 \frac{\partial n}{\partial T} \cdot \frac{\sigma_{abs}}{4KR_{th}}$$

Il apparaît que la résolution axiale est donnée directement par le produit des profils des faisceaux de chauffage et sonde, dans cette approximation du front d'onde plan.

A partir de ce calcul simplifié, nous pouvons aussi évaluer la phase maximale, qui est obtenue lorsque le faisceau de chauffage est centré sur la nanoparticule. Nous la calculons dans le cas où le faisceau sonde est uniforme à l'intérieur de la sphère d'indice, soit :

$$\Phi_{\max} = \frac{2\pi}{\lambda} \overline{\Delta n(\vec{r}_0)} \frac{\int_0^{\rho_{Th}} \sqrt{\rho_{Th}^2 - \rho^2} 2\pi\rho d\rho}{\int_0^{\rho_{Th}} 2\pi\rho d\rho} = \frac{16\pi}{3} \overline{\Delta n(\vec{r}_0)} \frac{\rho_{Th}}{\lambda}$$

Φ_{\max} , calculé dans le cas d'une intensité absorbée de 300 nW, et modulé à 1MHz, vaut $16 \cdot 10^{-5}$ rad.

D. Comparaison du modèle avec les résultats expérimentaux

Comme nous allons le voir, ce modèle conduit à une estimation du déphasage en bon accord avec la mesure expérimentale et permet d'accéder à la résolution de cette technique d'imagerie.

1. Mesure du déphasage

Nous avons mesuré le déphasage en introduisant un modulateur électrooptique, à l'intérieur du dispositif télécentrique (Figure 121), ses axes étant positionnés parallèlement à ceux du Wollaston. Ce déphasage, introduit entre les deux faisceaux, intervient, dans le signal interférométrique, de façon semblable à celui généré par la variation d'indice du milieu dû au chauffage de la bille.

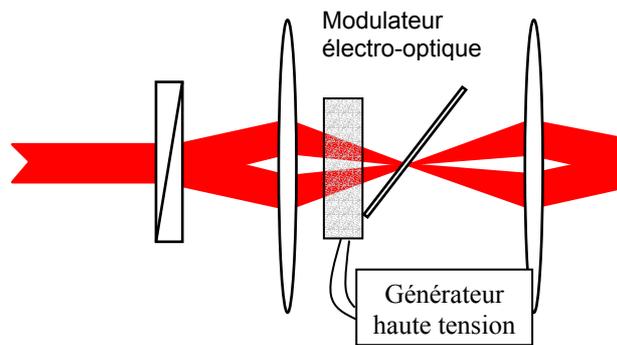


Figure 121: mesure de la phase

Le module est positionné dans le montage, et l'image d'une particule est enregistrée, afin de mesurer la hauteur du signal détecté. Le faisceau de chauffage est ensuite éteint et une tension carrée, de fréquence égale à la fréquence de modulation du faisceau de chauffage, est appliquée aux bornes du module électro-optique. Nous avons mesuré l'amplitude de la tension requise pour égaler le signal détecté précédemment par la méthode PIC.

Nous connaissons le facteur de proportionnalité entre la tension et le déphasage induit, à savoir $1,26 \cdot 10^{-2} \text{ rad} \cdot \text{V}^{-1}$, et nous déterminons celui existant entre la tension et le signal détecté, dans nos conditions de réglages de la détection synchrone. Après mesure, le déphasage, qui permet de générer un signal égal à celui produit par des particules de 10nm de diamètre absorbant une puissance de 300 nW, modulée à 1 MHz, vaut $\Delta\phi = 8 \pm 2 \cdot 10^{-5} \text{ rad}$. Ce résultat expérimental est cohérent avec l'estimation théorique précédente. Notre modèle de sphère d'indice, quoique simple, décrit de façon relativement fiable le système.

2. Résolution

Dans la mesure où nous souhaitons employer l'imagerie photothermique pour visualiser en trois dimensions des systèmes biologiques minces voire épais, nous nous sommes intéressés à la résolution de cette technique, en particulier à l'influence du faisceau sonde sur la résolution du dispositif. Nous avons comparé les résolutions obtenues dans deux cas, celui où le faisceau de chauffage est focalisé, on suppose qu'il est alors gaussien dans le

plan focal de l'objectif ($\times 100$, $ON=1,4$), et celui où il est uniforme (Figure 122). Le faisceau sonde est considéré focalisé donc gaussien dans les deux cas.

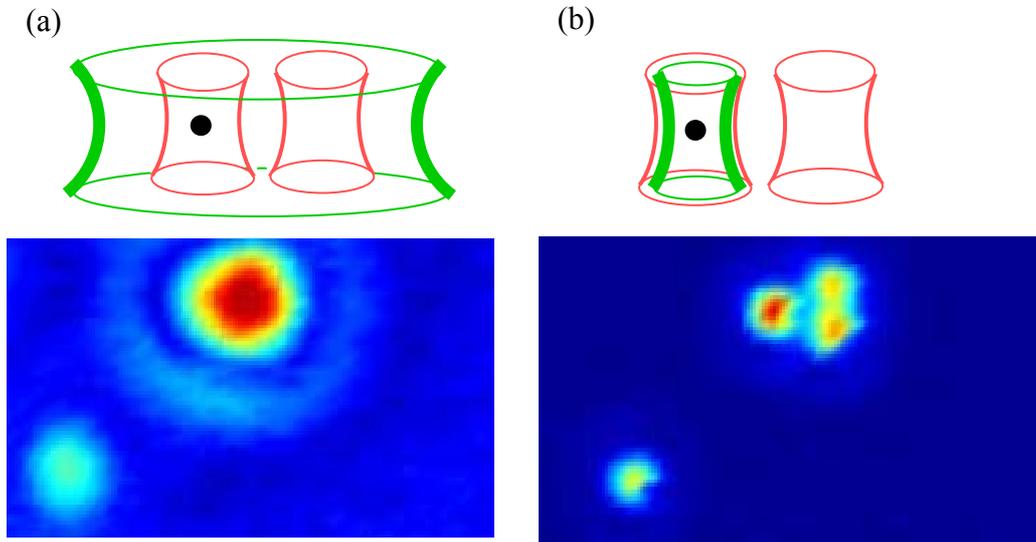


Figure 122: Images photothermiques du même échantillon obtenues le faisceau de chauffage (vert) étant (a) uniforme, (b) focalisé. Les faisceaux de lecture sont représentés en rouge

Nous évaluons tout d'abord les caractéristiques de ces faisceaux. Le faisceau de chauffage remplissant complètement la face arrière de l'objectif, sa largeur transverse totale à mi-hauteur est limitée par diffraction et est égale à :

$$W_{\text{Chauffage}} = 1,22 \lambda_{\text{chauffage}} / 2 ON \approx 224 \text{ nm} .$$

On en déduit la dimension axiale totale à mi-hauteur :

$$\Delta l = 1,22^2 \pi \lambda_{\text{chauffage}} / 2 ON^2 \approx 0,6 \mu\text{m} .$$

Quant au faisceau sonde, sa largeur transverse totale à mi-hauteur a été mesurée à la sortie de l'objectif et est égale à $W_0 = 550 \pm 50 \text{ nm}$.

Sa dimension axiale totale à mi-hauteur est donc égale à $\Delta l = 2\pi W_0^2 / \lambda = 3,0 \pm 0,9 \mu\text{m}$.

Afin de mesurer la résolution axiale, nous avons positionné l'échantillon épais sur une platine piézoélectrique permettant de le déplacer selon z , avec une précision d'une dizaine de nanomètres, et nous avons enregistré les images à différentes hauteurs (Figure 124 (a)). Le calcul numérique des expressions données en C.2b (Équation 46) a permis de tracer les graphes représentant le signal détecté en fonction de la position de la particule par rapport au centre des faisceaux. Les courbes ont été tracées pour le cas d'un faisceau de chauffage

uniforme et pour le cas d'un faisceau de chauffage focalisé. A partir de ces courbes, et du critère de limite de séparation de deux images, défini dans le chapitre 1 II, nous avons pu obtenir les valeurs théoriques de la résolution.

Lorsque le faisceau de chauffage est uniforme, les résolutions transverse et axiale sont essentiellement données par le profil du faisceau sonde, leurs valeurs sont donc relativement importantes. Nous attendions respectivement 530 ± 70 nm et 5.0 ± 0.9 μm et nous avons mesuré des valeurs en bon accord, à savoir 460 ± 25 nm et 6.0 ± 0.5 μm .

Dans le cas où le faisceau de chauffage est focalisé, nos calculs conduisent à une résolution transverse (Figure 123) de 209 ± 2 nm et une résolution axiale (Figure 124) de $0.85\pm 0.05\mu\text{m}$, et nous avons mesuré respectivement 215 ± 5 nm, et 1.2 ± 0.2 μm . L'incertitude sur les valeurs théoriques proviennent de celles portant sur les largeurs transverses et axiales du faisceau sonde. Ces valeurs expérimentales sont en bon accord avec les résultats donnés par notre modèle.

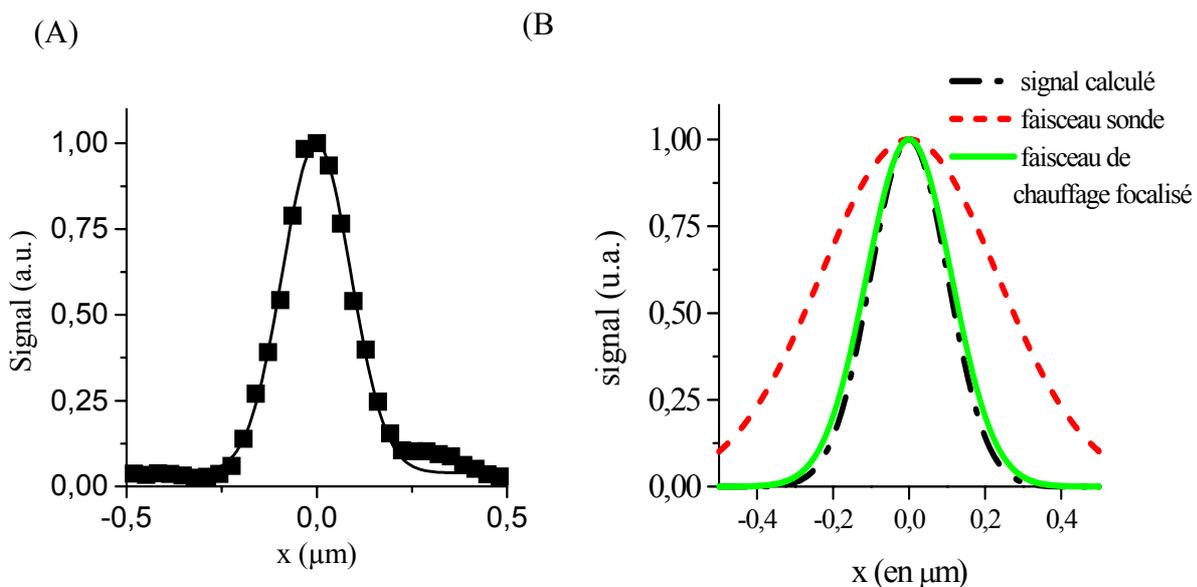


Figure 123: résolution transverse du dispositif PIC dans le cas du faisceau de chauffage focalisé : (a) signal mesuré en fonction du déplacement latéral ajusté par une fonction gaussienne, (b) courbes théoriques

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, la résolution transverse d'un système confocal, utilisé à 633 nm, est donnée par $\Delta R_C = 0,875 \lambda/2 ON$ et vaut, avec l'objectif utilisé ici, 198 nm, tandis que celle d'un microscope éclairé en champ large, donnée par $\Delta R_C = 1,22 \lambda/2 ON$, est de 276 nm. Ainsi, la résolution de la technique PIC se rapproche de celle de la microscopie confocale, dans le cas d'un faisceau de chauffage focalisé.

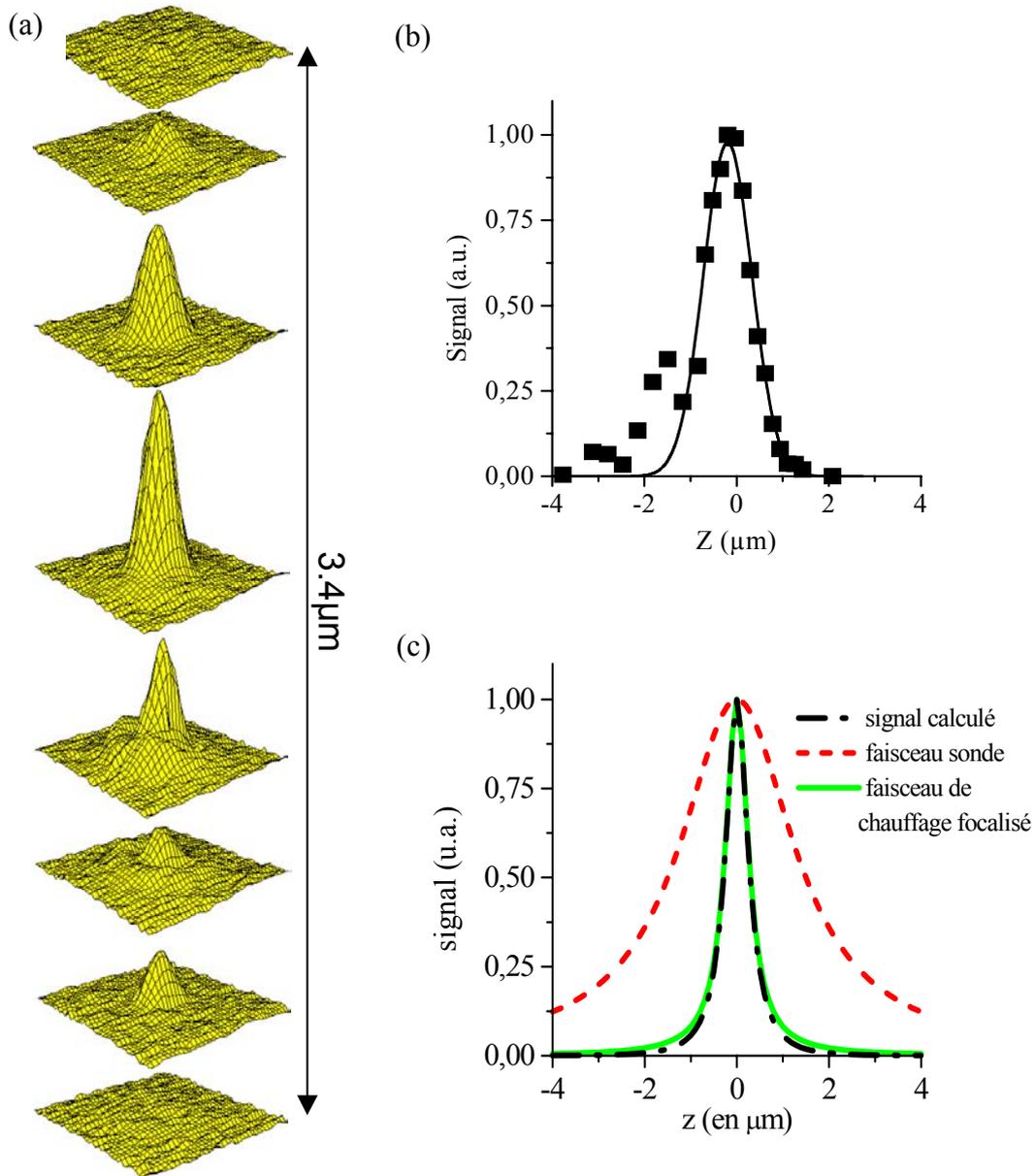


Figure 124: résolution axiale dans le cas où le faisceau de chauffage est focalisé : (a) mesure du signal dans les plans successifs, (b) signal mesuré en fonction de la profondeur ajusté par une fonction gaussienne, (c) courbe théorique

Dans le système PIC, la résolution est due à un effet couplé du faisceau sonde et du faisceau de chauffage. La résolution, mesurée ici, aurait donc pu être améliorée en élargissant le faisceau sonde de sorte qu'il remplisse la face arrière de l'objectif, ce qui aurait eu comme effet de réduire la taille de la tache de diffraction sur l'échantillon à 278 nm, et d'augmenter la résolution.

3. Précision de pointé

La microscopie confocale permet d'atteindre des rapports signaux sur bruits élevés grâce à l'utilisation d'un diaphragme devant le photodétecteur qui réduit la contribution du fond au signal. Un compromis doit être fait entre la réduction du bruit et une collection suffisante de photons issus d'une molécule unique. Dans la technique PIC, le bruit provient essentiellement du faisceau sonde, et il n'y a pas de rejet de signal.

La détection des particules d'or de 10 nm, chauffées avec un faisceau d'intensité de 3 MW.cm^{-2} , et avec des durées d'intégration du signal de 10 ms, produit des images avec un rapport signal sur bruit important, supérieur à 20. De plus, les pics détectés peuvent être ajustés correctement par une gaussienne. L'imagerie photothermique doit donc permettre de mesurer la position d'une particule seule avec une précision de pointé semblable à celle obtenue détection de molécules uniques, i.e. d'environ quelques dizaines de nanomètres (p.162). De plus, ce rapport signal sur bruit peut être amplifié en augmentant l'intensité de chauffage, puisqu'en effet, les particules d'or ne saturent pas aux intensités utilisées ici, et ne photoblanchissent pas.

II. Imagerie de systèmes biologiques

Plusieurs raisons font de l'imagerie photothermique une technique de visualisation à 3D adaptée aux systèmes biologiques épais. Comme nous venons de le voir, elle est insensible aux fonds diffusants, permet d'atteindre la sensibilité de la particule unique, et sa résolution est comparable à celle de la microscopie confocale. Enfin, les particules d'or existent couramment sous des formes biofonctionnalisées, ne photoblanchissent pas, et peuvent être détectées à des tailles aussi faibles que 5 nm, qui sont peu perturbatrices.

Nous avons donc utilisé la technique photothermique pour visualiser un système biologique constitué de cellules fixées marquées selon un marquage immunocytochimique classique.

Pour cela, nous avons transfecté des cellules de type COS avec un plasmide codant pour une protéine membranaire non produite normalement par cette lignée cellulaire, à savoir le récepteur mGluR5-myc. Les cellules ont ensuite été fixées au paraformaldéhyde, et soumises à un double marquage (Figure 125).

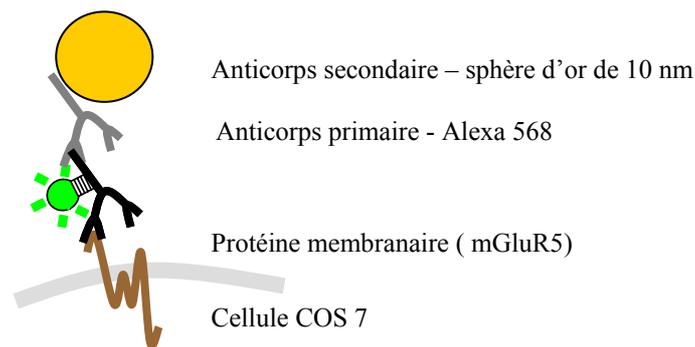


Figure 125 : marquage immunohistochimique

Pour cela, nous avons utilisé un anticorps de souris, dirigé contre l'étiquette Myc située à la partie N-terminale de la protéine mGluR5. Ce premier anticorps, fusionné avec un fluorophore Alexa 568, est introduit à la concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les cellules sont ensuite incubées en présence d'un second anticorps, dirigé contre le premier anticorps, l'anticorps de souris anti-Myc, qui est adsorbé à des billes d'or de 10 nm. Ainsi, tout signal détecté en photothermique doit correspondre à un signal fluorescent.

Afin de collecter la fluorescence émise par les fluorophores Alexa 568, nous avons ajouté au système PIC un dispositif de type confocal (Figure 126). Les fluorophores ont été excités par le faisceau vert de chauffage focalisé sur l'échantillon avec une puissance d'environ $10 \mu\text{W}$, leur émission a été récoltée à travers un filtre OG550 et une lentille de focalisation sur une

photodiode à avalanche, en mode comptage de photons. Enfin l'image a été enregistrée grâce à la translation de la platine piézo électrique.

Le signal diffusé, à 514 nm, par les cellules en présence du seul faisceau de chauffage modulé, a été collecté sur le détecteur, le filtre OG550 ayant été retiré. Ce signal démodulé fournit l'image de diffusion de l'échantillon qui fait apparaître la morphologie des cellules (Figure 127 A, D, G)

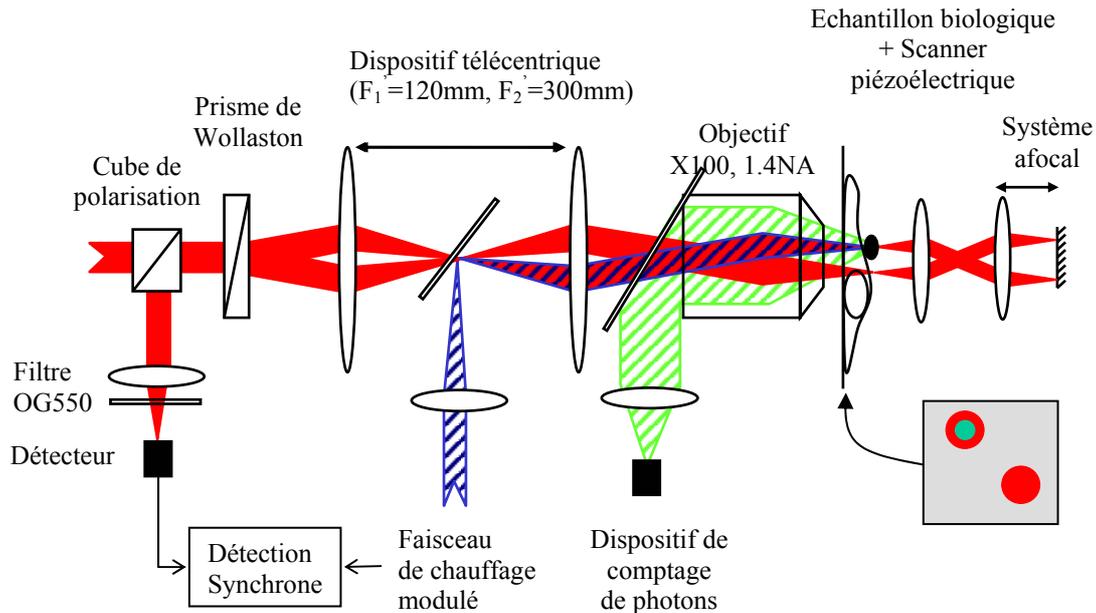


Figure 126: montage expérimental comprenant le système PIC et la détection confocale de fluorescence

Nous avons d'abord vérifié la spécificité du marquage avec les anticorps adsorbés sur les particules d'or. Pour cela, les anticorps portant les billes d'or ont été introduits à très forte concentration, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de sorte qu'à un anticorps primaire interagissant avec un récepteur mGluR5 peuvent être liés plusieurs anticorps secondaires, et donc un grand nombre de particules d'or. Le signal détecté en photothermique est ainsi notablement amplifié. Le marquage est spécifique car lorsque les cellules ne sont pas transfectées, ce qui se traduit par l'absence de signal fluorescent, aucune particule d'or n'est détectée (Figure 127 A, B, C comparées à D, E, F).

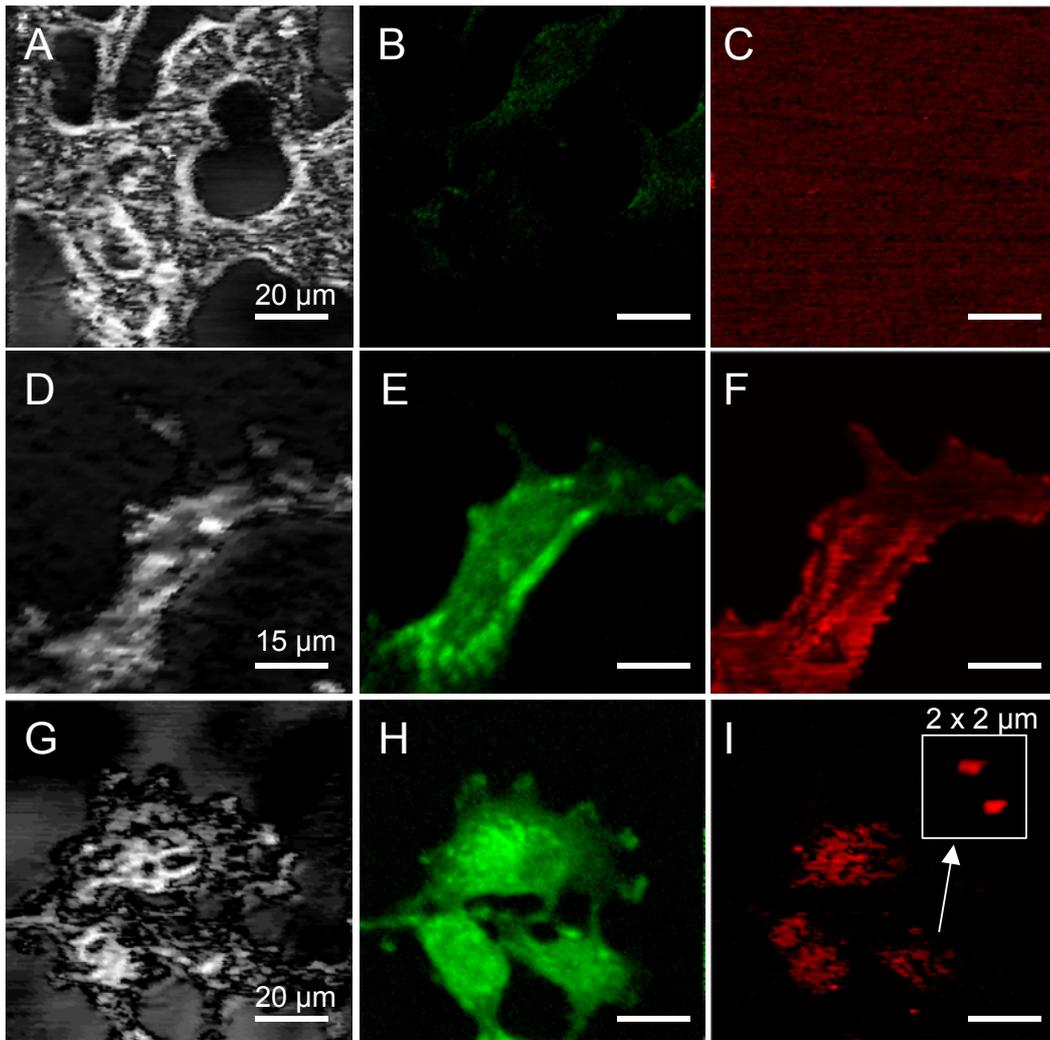


Figure 127: Visualisation des cellules COS grâce aux images de diffusion (A,D,G), et du marquage immunocytochimique des protéines membranaires mGluR5 exprimées dans les cellules transfectées qui sont révélées par la détection de la fluorescence (B,E,H). Visualisation photothermique de ce marquage membranaire(C,F,I)

Pour pouvoir atteindre la sensibilité de la molécule unique, nous avons diminué la quantité d'anticorps secondaires en les utilisant désormais à une concentration égale à $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure 127 G, H, I). Ainsi, un très faible nombre de particules d'or est lié à un récepteur.

A cette concentration, nous pouvons observer des récepteurs individuels. En effet, lorsque la puissance de chauffage est augmentée, passant de 3 MW.cm^{-2} , et de 15 MW.cm^{-2} , il n'apparaît pas de nouveaux pics (Figure 128).

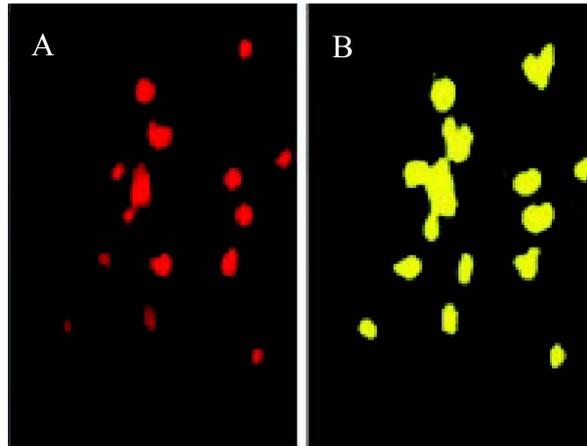


Figure 128: Pics détectés à l'intérieur des cellules avec une intensité de chauffage de 3 MW.cm^{-2} (A), et de 15 MW.cm^{-2} (B)

Afin de confirmer quantitativement cette observation, nous nous intéressons aux histogrammes des intensités des pics détectés. Nous vérifions dans ce montage que, pour un échantillon constitué de billes de 10 nm piégées dans un film de PVOH et étalées sur une lamelle de verre, l'histogramme des intensités des pics (Figure 129) forme bien une gaussienne dont la largeur est égale à 30% soit 3 fois la dispersion de son diamètre donnée par le fabricant, comme le prévoit la dépendance en a^3 de la section efficace d'absorption. Notre dispositif en transmission PIC permet aussi de détecter des particules individuelles. Le même histogramme a été construit pour les anticorps couplés avec des billes d'or de 10 nm, piégés dans un film de PVOH et étalés sur une lamelle de verre. Il apparaît dans ce cas une distribution bimodale. La fonction, notée $F(s)$, utilisée pour l'ajustement, est la somme de deux gaussiennes, dont les centres et les largeurs sont laissés libres. Finalement, les gaussiennes sont centrées autour de $s_1 = 1$ et $s_2 = 2$, tandis que la largeur du second pic est égale à $W_2 \approx \sqrt{2} \cdot W_1$ comme attendu pour des signaux indépendants (p. 140).

$$F(s) = \sum_{p=1}^2 \alpha_p \frac{1}{\sqrt{2\pi W_p^2}} \exp\left(-\frac{(s - s_p)^2}{2W_p^2}\right) \quad \text{Équation 47}$$

D'après les proportions d'agrégats de p particules mesurés sur les signaux, notées α_p , il semble que l'échantillon soit composé, à environ 60%, d'anticorps adsorbés à 1 particule, et 40% d'anticorps adsorbés à 2 particules. La proportion de signaux provenant de trois ou plus particules est particulièrement faible. Ce résultat s'explique par la présence d'une étape de filtrage des marqueurs, qui permet au fabricant de ces anticorps marqués (Auroprobe, d'Amercham Biosciences) de certifier que moins de 5% des anticorps sont couplés à des

agrégats de trois particules d'or ou plus. Le fabricant assure que moins de 25 % des anticorps sont marqués par deux particules d'or. Ces signaux doivent donc correspondre à la fois à une double adsorption sur les anticorps et à l'agrégation d'anticorps marqués par une seule particule.

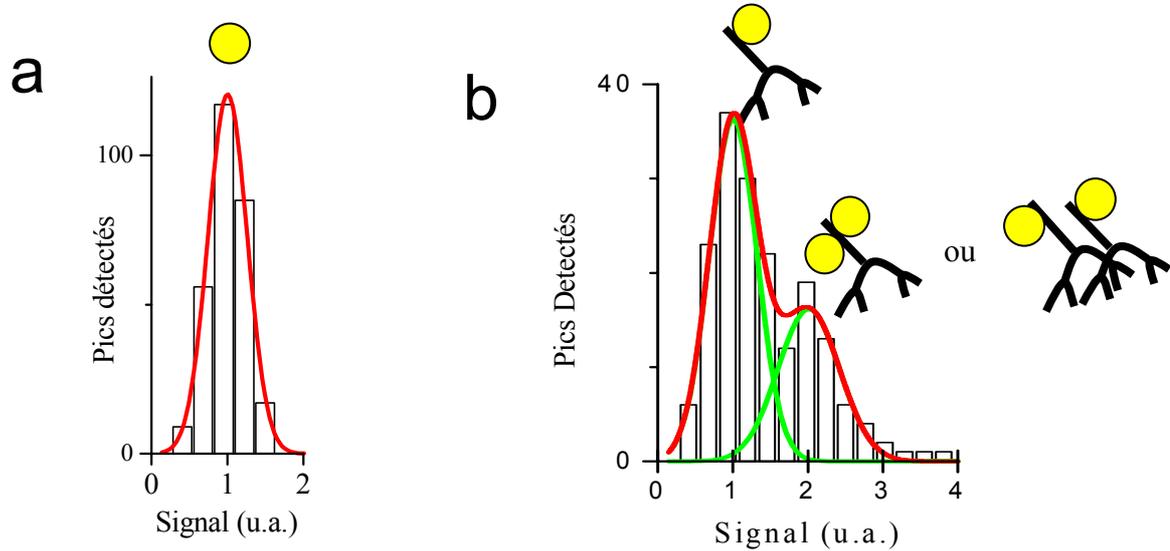


Figure 129: Histogramme des signaux émis par des nanoparticules de 10 nm, étalées dans du PVOH, (a) provenant d'une suspension colloïdale ou, (b) adsorbées aux anticorps

Enfin, nous construisons l'historgramme des intensités des pics détectés dans les cellules. Il présente plusieurs pics que l'on peut ajuster correctement par des gaussiennes (Figure 130). La largeur du $p^{\text{ième}}$ pic est imposée égale à $\sqrt{p}W_0$, tandis que la position des pics n'est pas fixée, ni la largeur du premier pic. On constate que les positions des pics, obtenues par ajustement, varient linéairement avec leur numéro, ie le signal du $p^{\text{ième}}$ pic est égal à p fois le signal du premier pic, comme attendu pour p particules agrégées. Il est donc possible d'observer des anticorps individuels adsorbés sur une bille d'or unique sur des membranes de cellules, et d'accéder à leur stoechiométrie.

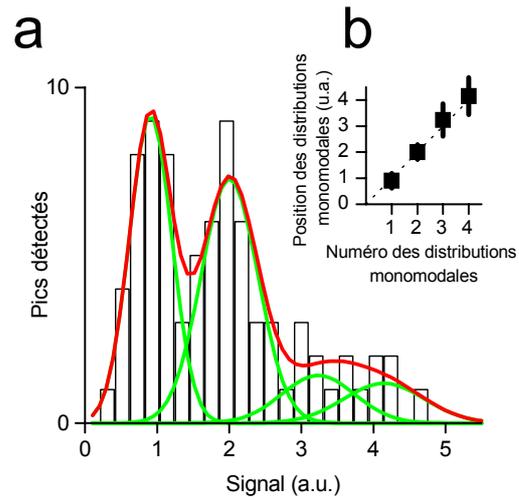


Figure 130: Pics détectés à l'intérieur des cellules : (a) Histogramme des signaux correspondants, (b) Graphe donnant la position mesurée des distributions monomodales composant l'historgramme en fonction de leur numéro.

III. Perspectives et limitations de l'imagerie photothermique en biologie

Nous allons évoquer ici plusieurs points importants concernant l'application de la technique d'imagerie photothermique en biologie. Tout d'abord, nous présenterons les limitations éventuelles de cette technique. Puis nous envisagerons deux domaines précis d'application dans le domaine de la biologie qui pourraient bénéficier des performances de cette méthode.

A. Température à la surface de la nanoparticule

Afin de préciser les éventuels dommages engendrés par l'imagerie photothermique, il est nécessaire d'évaluer la température atteinte par la surface de la particule. En effet, une augmentation importante de la température dans les organismes vivants pourrait perturber les équilibres thermodynamiques existant entre les différentes populations de biomolécules, voire provoquer des phénomènes de mort cellulaire.

En dehors de la surface de la bille, un bilan d'énergie thermique identique à celui de la partie I en l'absence de source de chaleur peut être effectué et la température du milieu est décrite par :

$C \frac{\partial T}{\partial t} + K\Delta T = 0$ avec les conditions aux limites $\lim_{r \rightarrow \infty} T = T_0$ et $\lim_{r \rightarrow a} T = T_0 + T_{surf}(t)$, où C est la conductivité thermique du milieu extérieur, et K sa constante de diffusion.

L'évaluation de la température à la surface de la particule se fait grâce à un bilan d'énergie classique pour le système constitué par la sphère métallique, la variation de l'énergie interne de la particule provenant donc du transfert d'énergie entre la sphère et le milieu extérieur et de l'absorption par effet photothermique:

$$\frac{4}{3} \pi a^3 C_p \left. \frac{\partial T(r,t)}{\partial t} \right|_{r=a} = 4 \pi a^2 K \left. \frac{\partial T(r,t)}{\partial r} \right|_{r=a} + \sigma_{abs} P_{chauffage} \quad \text{Équation 48}$$

où C_p est la conductivité du métal formant la particule,

A l'aide de la résolution de l'équation thermique dans le milieu [Fluckiger 1985], cette

équation se transforme en $\frac{\sigma_{abs} P_{chauffage}}{4 \pi K a} = T_{surf}(t) + \tau \frac{dT_{surf}(t)}{dt}$ et $\tau = \frac{a^2 C_p}{3K} \cong 10^{-12} s$ pour des

particules de 10 nm placées dans l'eau.

La période de modulation étant supérieure à $10^{-6} s$, la température à la surface d'une nanoparticule de 10 nm de diamètre est obtenue en se plaçant en régime permanent et a pour expression :

$$T_{surf} = \frac{\sigma_{abs} I_{chauffage}}{4\pi K \frac{a}{2}} \quad \text{Équation 49}$$

Pour un signal détecté avec un rapport signal sur bruit de 10, obtenu lorsque la puissance de chauffage est d'environ $I_{laser_chauffage}=1 \text{ MW.cm}^{-2}$, et sachant que $\sigma_{abs} \approx 50 \text{ nm}^2$, $K=K_{eau}=0.6 \text{ W.K}^{-1}.\text{m}^{-1}$, et le diamètre $a=10 \text{ nm}$, la surface de la particule connaît une élévation de 14 K. Même si la température décroît ensuite comme l'inverse de la distance à la particule, son élévation peut poser un problème lors de son utilisation sur des systèmes vivants. Il est donc nécessaire de pouvoir augmenter le rapport signal sur bruit de façon significative afin d'utiliser des intensités de chauffage réduites. Cela suppose des améliorations techniques mais aussi théoriques concernant la compréhension précise du signal observé. Une amélioration technique pourrait notamment consister à remplacer le prisme de Wollaston par un prisme de Nomarski (Figure 3), grâce auquel la recombinaison serait améliorée, puisqu'elle ne nécessiterait plus l'ajout du dispositif télécentrique.

Un autre problème concernant l'emploi de la technique PIC en imagerie sur cellules vivantes concerne la longueur d'onde où se produit la résonance plasmon de l'or à savoir aux environs de 520 nm. En effet, nous avons déjà vu que les cellules vivantes absorbent de façon importante à cette longueur d'onde, du fait de la présence de protéines autofluorescentes intrinsèques aux cellules, et l'échauffement produit nuit notablement à la viabilité des cellules observées. Face à cela, il convient de réduire l'intensité du faisceau de chauffage, ou bien d'utiliser des particules de type coeur couronne ou des alliages dont on peut modifier la composition et par suite la position spectrale de la résonance plasmon [Treguer 1998, Link 1999].

B. Détection ultra sensible et application

La détection photothermique pourrait être employée en hybridation *in situ* sur des tissus épais et constituer une alternative performante à l'autoradiographie classique.

En effet, traditionnellement, l'hybridation qui permet la détection de séquences précises d'ADN ou ARN, utilise des sondes, fragment d'ADN_c, d'ARN, ou des oligonucléotides marqués avec du soufre radioactif (³⁵S). La détection se fait ensuite soit sur une émulsion de bromure d'argent, la libération d'électrons par la source radioactive réduisant les ions argents, pour laquelle la résolution est sub-cellulaire, soit grâce à des écrans de phosphore dont la

résolution latérale est de l'ordre de 100 μm , soit enfin grâce enfin à l'association d'un scintillateur et d'une caméra CCD, pour laquelle la résolution peut atteindre 15 μm [Laniece 1998]. Une résolution latérale subcellulaire est donc possible grâce à l'utilisation de films radiographiques, mais elle requiert, pour être atteinte, un temps d'exposition d'au moins quinze jours. De plus, aucune de ces méthodes de détection ne permet une résolution en trois dimensions. Enfin, l'utilisation de sondes radioactives produit un marquage limité dans le temps, et impose à l'expérimentateur de prendre certaines précautions pour se protéger des rayonnements. Il s'est développé ces dernières années une technique d'hybridation utilisant des sondes fluorescentes [Moorman 2001], cependant elles souffrent d'une moins grande sensibilité. En effet, le marquage fluorescent doit être amplifié pour être détecté. Les sondes sont donc couplées à de la digoxygénine ou de la biotine qui conduisent soit à un marquage colorimétrique sensible mais peu résolutif, soit à un marquage immunocytochimique, qui est peu sensible, la taille importante des anticorps rendant difficile leur pénétration dans les tissus, et difficilement quantifiable.

L'utilisation de la technique PIC requiert l'emploi de sondes marquées par des particules d'or. La technique étant insensible au fond diffusant, une étape d'amplification n'est pas nécessaire, et les sondes peuvent être directement fusionnées ou adsorbées sur les particules. De plus, les agrégats de 0.8 ou 1.4 nm peuvent pénétrer jusqu'à environ 40 μm à l'intérieur d'un tissu épais. Enfin, cette méthode PIC devrait permettre non seulement de localiser ces sondes hybridées avec une résolution comparable à la microscopie confocale, mais aussi de quantifier leur nombre. Des premiers essais de quantification ont été réalisés, *in vitro*, sur des échantillons d'ADN de densités diverses, et marqués par des particules d'or. Les signaux détectés varient linéairement avec les densités de sondes, cependant cette technique souffre d'une certaine lenteur.

C. Suivi de particules uniques en imagerie photothermique

Nous avons pu montrer les performances remarquables de l'imagerie photothermique sur des systèmes biologiques fixés, dans lesquels les biomolécules observées sont immobiles. L'étape ultérieure consiste à visualiser des systèmes vivants et suivre les biomolécules dans leur mouvement. Pour réaliser ce suivi, il faut automatiser une procédure dans laquelle, l'ordinateur commande le déplacement de la platine en fonction du signal reçu à la photodiode. En fait, l'utilisation des montages confocaux pour la détection de molécules uniques a déjà donné lieu à l'établissement de procédures de localisation rapide des molécules

[Sabanayagam 2004, Ha 1997]. De cette façon, le nombre de photons perdus, pendant la durée de mise au point et de localisation, a pu être réduit, et le nombre de molécules détectées accru. La procédure est enclenchée dès que le signal détecté est supérieur au seuil fixé par l'utilisateur. La platine est alors déplacée d'un pas élémentaire dans une direction, le signal détecté est comparé avec celui lu précédemment, afin de décider du sens de déplacement de la platine. Ces données montrent l'importance du choix du pas élémentaire, et la dépendance de l'optimum avec la largeur du pic signal [Ha 1997]. La localisation est achevée, en général, en un ou deux cycles de 20 itérations, ce qui signifie 200 à 400 ms lorsque la durée d'enregistrement par pixel est de 10 ms, qui est le temps typique d'intégration en imagerie photothermique. Nous pouvons aussi imaginer une procédure de suivi utilisant la triangulation. Le mesure du signal, en trois points judicieusement choisis en fonction de la largeur attendue du signal, peut permettre une localisation directe en 2D de la particule.

En fait, lorsque le faisceau de chauffage est situé entre les deux faisceaux sondes, le signal a une allure dispersive selon cette direction, et la position de la particule correspond à un signal nul. La mesure du signal, à cette même position, après l'enregistrement de la première mesure, indique par son signe le sens dans lequel a eu lieu le déplacement, et ainsi le processus de suivi peut être accéléré. Afin d'enregistrer le déplacement dans les deux directions, un autre faisceau sonde doit être ajouté dans la direction perpendiculaire.

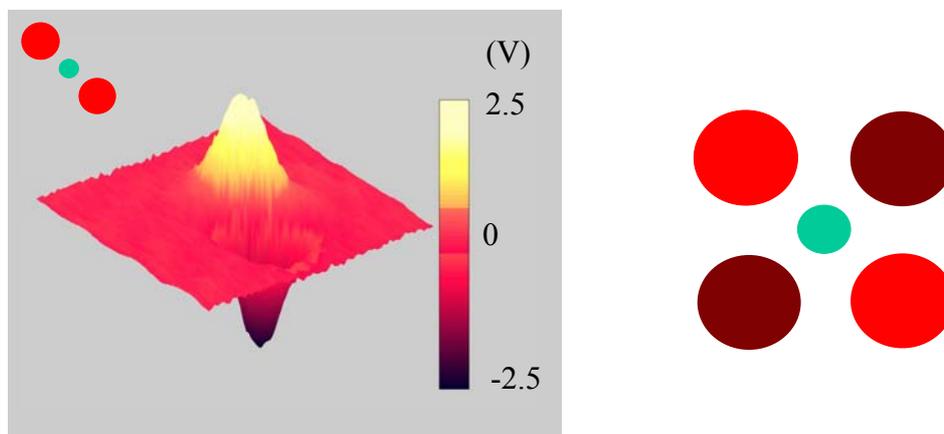


Figure 131: Signal dispersif, et position des faisceaux sondes et de chauffage pour le suivi de particules

Compte tenu de ces résultats, on peut penser que la technique PIC permettra de suivre les mouvements diffusifs des protéines membranaires, de coefficients de diffusion de l'ordre de $0.1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Références du chapitre 3

- Boccara A.C., Fournier D., Ecole thématique Optique instrumentale (1996).
- Born & Wolf. Principles of Optics, 5^{ième} édition, Pergamon Press (1980).
- Boyer D., Tamarat Ph., Maali A., Lounis B., Orrit M.; Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers. *Science* **297**, 1160-1163 (2002).
- Carslaw H.S., Jaeger J.C. Conduction of Heat in Solids. Oxford Univ. Press, Oxford, 2^{ème} édition (1986).
- Chan W.C.W., Maxwell D.J., Gao X., Bailey R.E., Han M., Nie S., *Curr. Op. Biotech.* **13**, 40-46 (2002).
- Dabbousi B.O., Rodriguez-Viejo J., Mikulec F.V., Heine J.R., Matoussi H., Ober R., Jensen K.F., Bawendi M.G. (CdSe) ZnS core-shell quantum dots : synthesis and characterization of a size series highly luminescent nanocrystallites. *J. Phys. Chem. B* **101**, 9463-9475 (1997).
- Dilhaire S., Thèse Université de Bordeaux 1 (1994).
- Faulk W.P., Taylor G.M. *Immunochemistry* **8**, 1081 (1971).
- Fluckiger D.U., Lin H-B., Marlow W.H. Composition measurement of aerosols of submicrometer particles by phase fluctuation absorption spectroscopy. *Applied optics* **24**, 1668-1681 (1985).
- Ha T., Chemla D.S., Enderle Th., Weiss S.; Single molecule spectroscopy with automated positioning. *Appl. Phys. Lett.* **70**, 782-4 (1997).
- Hainfeld J.F., Powell R.D.; New frontiers in gold labelling. *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 471-480 (2000).
- Kitamori T., Yokose K., Sakagami M., Sawada T. *Jpn. J. Appl. Phys.* **28**, 1195 (1989).
- Laniece P., Charon Y., Cardona A., Pinot L., Maitrejean S., Mastrippolito R., Sandkamp B., Valentin L.; A new resolution imager for the quantitative analysis of radiolabelled molecules in tissue section. *J. Neuro. Methods* **86** (1998)
- Link S., El-Sayed M.A.; Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *J. Phys. Chem. B* **103**, 8410-8426 (1999).
- Mawatari K., Kitamori T., Sawada T.; *Anal. Chem.* **70**, 5037 (1989).
- Moorman A.F.M., Houweling A.C., de Boer P., Christoffels V.; Sensitive nonradioactive detection of mRNA in tissue sections: Novel application of the whole mount *in situ* hybridisation protocol. *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 1-8 (2001)
- Sabanayagam C.R., Eid J.S., Meller A.; High-throughput scanning confocal microscope for single molecule for single molecule analysis. *Appl. Phys. Lett.* **84**, 1216-8 (2004).
- Treguer M. et al. *J. Phys. Chem. B* **102**, 4310 (1998)
- Sheetz M.P., Turney S., Qian H., Elson E.L.; Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not drive membrane glycoprotein movements. *Nature* **340**, 284-288 (1989)
- Tilton L.W., Taylor J.K. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **20**, 419-425 (1938)

Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans cette thèse démontrent la puissance de la microscopie de fluorescence de molécules uniques pour observer des phénomènes biologiques *in vivo*, à l'échelle de la biomolécule. Cependant, cette technique n'autorise pas le suivi de biomolécules sur des échelles de temps aussi longues que la minute. Aussi nous sommes-nous intéressés à l'imagerie photothermique, dont la capacité à prendre le relais de la microscopie de fluorescence pour observer des biomolécules uniques, est attestée par nos résultats.

En détection de molécules uniques, par microscopie de fluorescence, nous avons pu étudier les mouvements diffusifs d'un récepteur du glutamate, la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA, à la surface membranaire de neurones vivants d'hippocampe de rats. Nous nous sommes penchés plus particulièrement sur le cas des récepteurs AMPA, car le nombre de ces récepteurs à la synapse est fortement corrélé à l'efficacité synaptique, dont les variations seraient à l'origine de phénomènes globaux tels que la mémoire.

Tout d'abord, nous avons constaté sur des neurones au repos qu'à l'extérieur des synapses, ces récepteurs diffusent librement tandis qu'à l'intérieur des synapses, ils peuvent être immobiles, mais aussi de façon plus inattendue, soumis à un mouvement de diffusion confinée.

Lors de l'endocytose massive des récepteurs, induite par l'ajout d'une concentration élevée de glutamate, il apparaît que les récepteurs synaptiques mobiles sont plus nombreux, et qu'ils diffusent plus rapidement. De plus, la proportion de récepteurs extra-synaptiques qui sont localisés autour de la synapse, croît dans cette condition. Nous proposons en guise de modèle, que l'endocytose des récepteurs soit précédée par la libération des récepteurs hors des pièges présents dans la densité postsynaptique, et par l'accumulation de ces récepteurs dans la zone entourant les synapses, qui semble constituer un lieu privilégié pour l'endocytose.

Le processus inverse, à savoir l'exocytose massive de récepteurs provoquée par l'application d'un protocole pharmacologique spécifique, se traduit par une augmentation transitoire de la mobilité des récepteurs synaptiques. Cette observation peut être expliquée par l'entrée des récepteurs exocytés dans la synapse, où ils ne sont pas immobilisés de suite.

Au cours des expériences décrites ici, nous avons tenté de simuler différents processus moléculaires à l'aide d'applications globales de traitements pharmacologiques appropriés. Afin de s'approcher des conditions physiologiques, il serait important de pouvoir stimuler

localement les synapses à l'aide de protocoles d'activation de type électrophysiologique, tout en maintenant l'observation des récepteurs au niveau individuel. Des expériences récentes prouvent qu'il est désormais possible de coupler le suivi de récepteurs en microscopie de fluorescence de molécules uniques, avec des mesures d'électrophysiologie au niveau d'un récepteur canal unique [Ide 2002, Harms 2003, Sonnleitner 2002].

Enfin, pour élucider de façon précise les mécanismes moléculaires mis en jeu lors des processus de plasticité synaptiques, il est nous apparu indispensable de pouvoir quantifier le nombre de récepteurs assemblés dans des structures telles que la densité post-synaptique, ou les vésicules. Nous proposons, dans ce manuscrit, une méthode, qui, pour des assemblages de petite taille, semble pouvoir rendre accessible ce nombre de biomolécules avec précision. Nos résultats expérimentaux, obtenus sur des échantillons contenant différents types de multimères, fait apparaître la robustesse de la méthode. Pour des assemblages plus grands, notre méthode devrait fournir une estimation du nombre de récepteurs. Compte tenu de ces résultats prometteurs, il est envisagé d'appliquer cette méthode *in vivo*.

Afin d'augmenter les temps d'acquisition, nous avons imagé des systèmes biologiques à l'aide de techniques photothermiques. La résolution de ce système a alors été estimée théoriquement puis mesurée expérimentalement. Nos mesures se sont avérées être en accord avec nos prévisions, selon lesquelles la résolution de l'imagerie photothermique est comparable à celle de la microscopie confocale. De plus, nous avons pu montrer que ce système d'imagerie, insensible à la diffusion, donne accès à la biomolécule individuelle dans des systèmes biologiques, et rend possible la quantification des biomolécules marquées. Ce type d'imagerie devrait donc permettre de suivre les mouvements diffusifs, des récepteurs du glutamate individuels, sur des échelles de temps bien supérieures à celles accessibles aujourd'hui en microscopie de fluorescence. Pour cela, il est nécessaire tout d'abord d'optimiser un protocole automatisé de suivi qui peut être inspiré par les méthodes utilisées avec microscopie confocale pour la détection de molécules uniques [Sabanayagam 2004, Ha 1997].

Références de la conclusion

Ha T., Chemla D.S., Enderle Th., Weiss S.; Single molecule spectroscopy with automated positioning. *Appl. Phys. Lett.* **70**, 782-4 (1997).

-
- Harms G.S., Orr G., Montal M., Thrall B.D., Colson S.D., Lu H.P.; Probing the conformational changes of gramicidin ion channels by single-molecule patch-clamp fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **85**, 1826-38 (2003).
- Ide T., Takeuchi Y., Aoki T., Yanagida T.; Simultaneous optical and electrical recording of a single ion-channel. *Jap. J. Physiol.* **52**, 429-34 (2002).
- Sabanayagam C.R., Eid J.S., Meller A.; High-throughput scanning confocal microscope for single molecule for single molecule analysis. *Appl. Phys. Lett.* **84**, 1216-8 (2004).
- Sonnleitner A., Mannuzu L.M., Terakawa S., Isacoff E.Y.; Structural rearrangements in single ion channels detected optically in living cells. *Proc. Natl. Sci. USA* **99**, 12759-12764 (2002).

Publications

C. Tardin, L. Cognet, C. Bats, B. Lounis, D. Choquet ; Direct imaging of lateral AMPA receptors inside synapses. *EMBO J.* **22**, 4656-4665 (2003).

L. Cognet, C. Tardin, D. Boyer, P. Tamarat, B. Lounis ; Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells. *Proc. Natl. Sci. USA* **100**, 11350-5 (2003).

Résumé :

La circulation des récepteurs au glutamate entre les trois compartiments cellulaires, que sont les membranes synaptiques, extra-synaptiques, et le cytoplasme, joue un rôle crucial dans l'activité synaptique. Récemment encore, les études se concentraient sur les processus d'endo et d'exocytose, et sur la diffusion latérale des récepteurs extra-synaptiques.

La microscopie de fluorescence de molécules uniques permet de suivre les récepteurs sur toute la surface des neurones. Le suivi des GluR2, sous unité des récepteurs au glutamate de type AMPA, à la surface de neurones vivants a montré que la structure synaptique est dynamique, et que les phénomènes de plasticité post-synaptique sont corrélés avec des modifications de l'état diffusif des récepteurs synaptiques. Afin d'accéder à la stoechiométrie du nombre de récepteurs assemblés, dans des zones telles que la synapse ou les vésicules, une méthode de quantification robuste et applicable à des assemblées de protéines de taille quelconque est mise au point.

La durée de suivi des biomolécules, en microscopie de molécules uniques, est limitée par le photoblanchiment rapide des fluorophores. Pour y remédier, une nouvelle technique de visualisation, basée sur l'effet photothermique, a été développée et appliquée à l'imagerie de systèmes biologiques.

Mots-clés :

Molécules individuelles ; Nano-particules métalliques ; Effet photothermique ; Synapse glutamatergique ; Récepteur du glutamate AMPAR ; Diffusion membranaire

Summary :

The trafficking of the glutamate receptors between the three cellular compartments which are the synaptic membrane, the extra-synaptic membrane and the cytoplasm plays a major role in synaptic activity. Till recently, the studies were focused on endocytosis, exocytosis, and lateral diffusion of extra-synaptic receptors.

The microscopy of single molecule has enabled us to follow the receptors all along the neurons surface. The tracking of the AMPA receptor subunit called GluR2 on the surface of living neurons lead us to conclude that the synaptic structure is dynamic, and that post-synaptic plasticity processes are correlated to changes on the diffusive state of the synaptic receptors. In order to quantify the number of receptors gathered in place like the synapses or the vesicles, a robust method applicable to proteins assemblies of any size was established.

The duration of biomolecules tracking thanks to single molecule microscopy is limited by the fast photobleaching of the fluorophores. To overcome this problem, a new imaging technique based on the photothermal effect has been developed and applied to image biological samples.

Keywords:

Single molecules; Metallic nano-particles; Photothermal effect; Glutamatergic synapse; Glutamate receptor AMPAR; Membrane Diffusion