Ecole thématique CNRS

Mécanismes Moléculaires Fondamentaux en Biologie

VTF Domaine de Françon, Biarritz

8 – 12 décembre 2008

Organisée avec le soutien de :

- GDR 2758
- Société Française de Spectrométrie de Masse (SFSM)

Programme de la semaine

Heure	**Lundi 8 décembre**	**Mardi 9 décembre**	**Mercredi 10 décembre**	**Jeudi 11 décembre**	**Vendredi 12 décembre**
9:00 – 10:30	(Arrivée du train de Paris à 15:06)	Introduction à la biologie moléculaire Techniques physicochimiques de l'ADN *C. Escudé*	Introduction à la biologie cellulaire *C. Bouzigues*	Processus photoinduits *C. Herrero*	Biophotonique *L. Cognet*
10:30 – 11:00		Pause	Pause	Pause	Pause
11:00 – 12:30		Qu'est-ce qu'un laboratoire de biologie aujourd'hui? *J.L. Mergny*	Techniques physico-chimiques pour la biologie *H. Rezaei*	Photodomage *J. Cadet*	La relation structure-dynamique-fonction: l'apport des modes normaux de vibration *Y.-H. Sanejouand*
					Bilan de l'école
12:30 – 14:00		Repas	Repas	Repas	Repas
14:00 – 15:30		Mécanismes moléculaires en biochimie *G. Dives*	Après-midi libre	Agrégats d'intérêt biologiques *H. Rezaei*	(Départ du train pour Paris 14:40)
15:30 – 16:30	Arrivée au VTF	Posters (1)		Posters (2)	
16:30 – 17:00		Pause		Pause	
17:00 – 18:30	Introduction de la semaine et des participants	Les protéines: de la structure à la fonction. Quelques apports de la modélisation. *Y.-H. Sanejouand*	Spectrométrie de masse: technique et exemples analytiques *V. Gabelica / G. van der Rest*	Spectrométrie de masse: technique et exemples analytiques *V. Gabelica / G. van der Rest*	
19:30 – 20:30	Repas	Repas	Repas	Repas	
20:30 – 22:00		Conseil scientifique du GDR 2758	Séance poster / discussions avec « open bar »		

Présentations par affiches

Virgile Bernigaud : *Fragmentation de biomolécules à l'échelle moléculaire et en phase gazeuse: de la molécule isolée à la prise en compte d'un premier environnement biochimique.*

Pierre Çarçabal : *Ionisation et fragmentation induites par collision de protons de 100 keV avec des molécules radio-sensibilisantes: les Halouracils.*

Magalie Duchateau : *Mise au point d'une approche combinant échange hydrogène/deutérium, ECD et IRMPD pour l'analyse "top-down" de la structure du complexe aIF2.*

Michael Capron : *Etude de la phase physique de l'irradiation par les ions de molécules d'intérêt biologique : caractérisation du rôle de l'environnement cellulaire à l'échelle moléculaire.*

Jacqueline Fayeton, Marie Pérot : *La photo-fragmentation des molécules protonées.*

Jacqueline Fayeton, Marie Pérot : *Mécanisme de Photo-fragmentation de dipeptides protonés.*

Gilles Frison : *Modélisation de sites actifs d'enzymes à zinc.*

Marie-Pierre Gageot : *Simulations de dynamique moléculaire ab initio pour la spectroscopie optique de peptides.*

Gustavo Garcia : *Photoionisation en couche de valence de molécules d'intérêt biologique à l'aide du rayonnement synchrotron couplé aux coïncidences électron/ion.*

Eric Gloaguen : *Etude de petits peptides en phase gazeuse : influence de l'interaction entre chaînes latérales sur la structure secondaire.*

Gilles Grégoire : *Etude de la reconnaissance spécifique récepteur-ligand par spectroscopie IT d'ions biomoléculaires en phase gazeuse.*

Minh Huong Ha-Thi, Lionel Poisson, Benoit Soep, Niloufar Shafizadeh : *Etude de la relaxation ultra-rapide des métalloporphyrines en phase gaz et déposées sur agrégat d'argon.*

Marie-Catherine Heitz : *étude de processus élémentaires photo-induits dans des systèmes complexes par dynamique quantique et dynamique mixte*

classique-quantique.

Jean-Louis Heully : *Photochimie des complexes de ruthénium pour la biologie.*

Christophe Jouvet : *Dynamique photoinduite du tryptophane protoné.*

Rémi Maisonny : *Etude de l'ionisation et de la fragmentation d'agrégats d'eau induites par collision.*

Jean-Christophe Poully : *Charge localization and Structure of protonated peptides, DNA strands and Amyloid-beta protein by means of IRMP spectroscopy.*

Jean-Yves Salpin : *Etude des interactions en phase gazeuse entre cations métalliques et molécules d'intérêt biologique par spectrométrie de masse et calculs quantiques.*

Sylvain Vidal : *Dynamique d'agrégats et de molécules d'intérêt biologique sous irradiation.*

Liste des intervenants

Nom	Prénom	Laboratoire	Mail
BEROFF	Karine	LCAM, Université d'Orsay	karine.beroff@u-psud.fr
BOUZIGUES	Cédric	LOB, Ecole Polytechnique	cedric.bouzigues@polytechnique.edu
CADET	Jean	LLAN, CEA, Grenoble	jean.cadet@cea.fr
COGNET	Laurent	CPMOH, Université de Bordeaux	l.cognet@cpmoh.u-bordeaux1.fr
DIVES	Georges	Université de Liège	GDive@ulg.ac.be
DUGOURD	Philippe	LASIM, Université Lyon-I	dugourd@lasim.univ-lyon1.fr
ESCUDE	Christophe	Muséum National d'Histoire Naturelle	escude@mnhn.fr
GABELICA	Valérie	LSM, Université de Liège	v.gabelica@ulg.ac.be
HERRERO	Christian	IbiTec-S, CEA, Saclay	Christian.HERRERO@cea.fr
MERGNY	Jean-Louis	Muséum National d'Histoire Naturelle	mergny@mnhn.fr
REZAEI	Human	VIM, INRA, Jouy en Josas	human.rezaei@jouy.inra.fr
SANEJOUAND	Yves-Henri	LBBB, Université de Natntes	yves-henri.sanejouand@ens-lyon.fr
VAN DER REST	Guillaume	DCMR, Ecole Polytechnique	gvdr@dcmr.polytechnique.fr

Liste des participants

NOM	Prénom	Laboratoire	Mail
ANTOINE	Rodolphe	LASIM, Université Lyon-I	rantoine@lasim.univ-lyon1.fr
BERNIGAUD	Virgile	CIMAP-GANIL, Université de Caen	bernigaud@ganil.fr
BRUNY	Guillaume	IPN, Villeurbanne	g.bruny@ipnl.in2p3.fr
CAPRON	Michael	CIMAP-GANIL, Université de Caen	capron@ganil.fr
ÇARÇABAL	Pierre	LPPM, Université d'Orsay	pierre.carcabal@u-psud.fr
CHABOT	Marin	IPN, Orsay	chabot@ipno.in2p3.fr
CHIROT	Fabien	Université de Lyon I	fab_chirot@yahoo.fr
DUCHATEAU	Magalie	DCMR, Ecole Polytechnique	magalie@dcmr.polytechnique.fr
FAYETON	Jacqueline	LCAM, Université d'Orsay	jacqueline.fayeton@u-psud.fr
FEIL	Stefan	IPN, Villeurbanne	sfeil@ipnl.in2p3.fr
FRISON	Gilles	DCMR, Ecole Polytechnique	frison@dcmr.polytechnique.fr
GAIGEOT	Marie-Pierre	LAMBE, Université d'Evry – Val d'Essonne	mgaigeot@univ-evry.fr
GARCIA	Gustavo	Synchrotron Soleil	gustavo.garcia@synchrotron-soleil.fr
GLOAGUEN	Eric	DSM/IRAMIS/SPAM, CEA Saclay	eric.gloaguen@cea.fr
GREGOIRE	Gilles	LPL, Université Paris XIII	gilles.gregoire@univ-paris13.fr
HA THI	Minh Huong	LPPM, Université d'Orsay	minh-huong.ha-thi@u-psud.fr
HEITZ	Marie-Hélène	IRSAMC-LCPQ, Toulouse	heitz@irsamc.ups-tlse.fr
HEULLY	Jean-Louis	IRSAMC-LCPQ, Toulouse	heully@irsamc.ups-tlse.fr
JOLY	Laure	LASIM, Université Lyon-I	ljoly@lasim.univ-lyon1.fr
JOUVET	Christophe	LPPM, Université d'Orsay	christophe.jouvet@ppm.u-psud.fr
MAISONNY	Rémi	CIMAP-GANIL, Université de Caen	maisonny@ganil.fr
MONTANO	Carla	IPN, Villeurbanne	montano@ipnl.in2p3.fr
NIEUWJAER	Nicolas	LPL, Université Paris XIII	nicolas.nieuwjaer@univ-paris13.fr
OHANESSIAN	Gilles	DCMR, Ecole Polytechnique	gilles@dcmr.polytechnique.fr
PEROT	Marie	LCAM, Université d'Orsay	marie.perot@u-psud.fr
POULLY	Jean-Christophe	LPL, Université Paris XIII	jean-christophe.poully@univ-paris13.fr
RANGAMA	Jimmy	CIMAP-GANIL, Université de Caen	rangama@ganil.fr
ROSU	Frédéric	LSM, Université de Liège	f.rosu@ulg.ac.be
SALPIN	Jean-Yves	LAMBE, Université d'Evry – Val d'Essonne	jean-yves.salpin@univ-evry.fr
SCHERMANN	Jean-Pierre	LPL, Université Paris XIII	jean-pierre.schermann@univ-paris13.fr
SHAFIZAADEH	Niloufar	LPPM, Université d'Orsay	niloufar.shafizadeh
USELI BACHITA	Francesca	CESR, Toulouse	francesca.useli@cesr.fr
VIDAL	Sylvain	IRSAMC-LPTT, Toulouse	vidal@irsamc.ups-tlse.fr
ZEHNACKER-RENTIEN	Anne	LPPM, Université d'Orsay	anne.zehnacker-rentien@u-psud.fr

Mardi 8, 11h00: Jean-Louis Mergny (mergny@mnhn.fr)

Qu'est-ce qu'un laboratoire de biologie aujourd'hui?

La biologie a connu plusieurs véritables révolutions techniques et conceptuelles ces dernières décennies. Ces bouleversements ont profondément modifié les méthodes de travail et les compétences requises. Face à une discipline sans cesse en évolution, le biologiste ne peut se contenter d'une compétence acquise, sous peine de voir son expertise dépassée en quelques années. Des méthodes de haute technicité sans cesse améliorées sont implantées sur des plateaux techniques dont le coût croît rapidement, sans atteindre toutefois celui de grands instruments de physique. L'environnement scientifique autour du laboratoire devient alors déterminant ; il tend à aggraver les inégalités entre laboratoires performants et médiocres. Cet environnement peut bien sûr être local, dans un institut, mais les méthodes de communication actuelles permettent de tisser un réseau collaboratif efficace sur de longues distances.

En caricaturant, la biologie est passée d'un stade « qualitatif » à presque *trop* quantitatif : le chercheur peut maintenant être noyé sous une avalanche de données qu'il ne peut appréhender sans l'aide d'outils appropriés ou de spécialistes de la bioinformatique et des statistiques. Initialement obscures, ces interfaces entre informatique et biologie proposent maintenant un niveau de convivialité satisfaisant, et un accès à l'information presque universel. Les données génomiques et les nouvelles techniques de séquençage vont bouleverser la génétique comme la biologie fondamentale et nouvelles disciplines comme la biologie des systèmes font leur apparition. Mais comment réagir face à une seul « run » de séquençage, qui peut générer jusqu'à 30 Giga bases de données (dix fois la taille du génome humain) ? Peut-on poser une question scientifique *après* avoir réalisé l'expérience ?

Si le laboratoire de biologie a changé, ses relations avec la société également. Les réticences face aux O.G.M. et la remise en cause du concept même de progrès ont compliqué l'idylle avec le public, dont les attentes, majoritairement médicales, sont relayées par des politiques scientifiques – et bureaucratiques - de plus en plus dirigistes.

J'introduirai ici quelques une de ces évolutions :

- d'un point de vue méthodologique, les approches en molécule unique, en protéomique, en microfluidique, sur puces à ADN et, plus récemment encore, avec les nouvelles technologies de séquençage.
- D'un point de vue conceptuel, on découvre maintenant que l'essentiel du génome est transcrit. La fonction de certains de ces ARN non codants est maintenant établie et a pu déboucher sur la conception d'outils comme l'ARN interférant.

Mercredi 9, 9h00: Cédric Bouzigues (cedric.bouzingues@polytechnique.edu)

Introduction à la biologie cellulaire

L'observation de la première cellule est presque contemporaine de l'invention du microscope optique au 17ème siècle, marquant la naissance de la biologie cellulaire. Cette discipline a depuis eu vocation à expliquer les fonctions physiologiques fondamentales : organisation, communication, migration,… à l'échelle de la cellule. Après le séquençage du génome humain et l'identification d'interactions protéines-protéines toujours plus nombreuse, quel est l'objet de cette discipline aujourd'hui ? Dans le cadre cette introduction à la biologie cellulaire, nous essaierons de montrer comment est aujourd'hui apparue une véritable biologie moléculaire de la cellule visant à comprendre l'intégration d'éléments moléculaires pour la réalisation d'une fonction physiologique.

Nous présenterons tout d'abord l'organisation de la cellule eukaryotes et de ses différents organites et leurs grandes fonctions : production et stockage d'énergie, production, adressage et exocytose de protéines. Nous nous intéresserons particulièrement au cytosquelette : sa structure, sa dynamique et son rôle physiologique dans la migration cellulaire, ainsi qu'aux moteurs moléculaires responsables du transport intracellulaire. Nous discuterons de façon générale différentes modalités de transduction du signal dans la cellule (récepteurs membranaires, signalisation calcique et redox). Nous évoquerons la morphogénèse au cours du développement et la différenciation cellulaire permettant la formation d'organes fonctionnels dans un organisme mature.

Nous introduirons quelques outils modernes de biologie cellulaire, qui nous permettrons d'évoquer des sujets actuels en biologie cellulaire : le chimiotactisme de cellules eukaryotes et la compartimentation dans la transduction du signal par la cellule.

Vendredi 12, 9h00: Laurent Cognet (l.cognet@cpmoh.u-bordeaux1.fr)

Détection de nano-objets individuels en biologie cellulaire

Laurent Cognet
Centre de Physique Moléculaire Optique et Hertzienne, CNRS – Université de Bordeaux
33405 Talence Cedex France

Introduction

Après le séquençage du génome, la compréhension de la structure intime des protéines, de leurs fonctions et du réseau de leurs interactions est un des grands défis de la recherche en biologie; on parle alors de protéomique et de génomique fonctionnelle. Ces problématiques utilisent principalement les approches de biochimie et de biologie moléculaire. Elles permettent d'obtenir des valeurs moyennes sur un grand nombre d'objets observés, mais souffrent du manque d'informations sur l'influence de leur environnement nanoscopique. Aujourd'hui, ces données peuvent être accessibles grâce aux savoir-faire combinés issus de l'optique et des nanosciences.

Les protéines évoluent dans un monde nanométrique et compartimentalisé. En effet, les protéines individuelles font souvent partie de complexes macromoléculaires de un à plusieurs dizaines de nanomètres et sont composés de dizaines de molécules. Ces complexes sont de surcroît localisés dans des compartiments cellulaires spécifiques, souvent très restreints, et qui sont le lieu d'interactions privilégiées entre molécules, jouant parfois le rôle de nano-réacteurs chimiques. Comprendre l'organisation et la fonction de ces compartiments et des protéines qui évoluent en leur sein est actuellement l'un des enjeux majeurs de la biologie.

Depuis une quinzaine d'années, l'avènement de l'observation et de la manipulation d'objets nanométriques individuels révolutionne le monde de la biophysique. Ce domaine est promis à jouer un rôle décisif dans la compréhension de la biologie à l'échelle nanométrique. Il permet en effet d'en étudier les acteurs dans leur environnement sans avoir recours à une synchronisation temporelle ni à une uniformisation de l'environnement spatial des évènements observés.

Depuis le début des années 1980, la manipulation de molécules individuelles permet de faire de la nano-mécanique sur des biomolécules individuelles *in vitro*. On a ainsi pu étudier le fonctionnement de (nano-)moteurs moléculaires(1) et d'enzymes (interagissant par exemple avec l'ADN ou l'ARN) qui transforment l'énergie chimique en travail mécanique(2). La vitesse, le nombre de cycles consécutifs et la mesure de la taille des pas effectués par les enzymes peuvent ainsi être mesurés, ainsi que la modulation de ces paramètres enzymatiques en fonction de l'environnement local(3). On a également pu mesurer les propriétés élastiques de l'ADN et sonder sa structure tertiaire(4). Ce faisant, on a montré que les modifications de cette structure jouent un rôle jusque dans la fonction de la molécule. En pratique, ces études utilisent des micro-tiges de verre ou bien des pinces optiques ou magnétiques pour manipuler des billes micrométriques accrochées aux molécules.

Les premières observations de biomolécules individuelles par microscopie de fluorescence, in vivo, i.e. directement dans des cellules vivantes ont quant à elles été réalisées à la fin des années 1990(5-8). Depuis, ce domaine est en pleine expansion et a permis de réaliser de réelles avancées biologiques. On citera par exemple l'étude du fonctionnement de la synapse de neurones vivants où la diffusion latérale de récepteurs de neurotransmetteurs a été révélée par des méthodes de molécules uniques(9-12). Ces méthodes ont de surcroît permis de montrer que contrairement à ce que l'on pensait depuis plusieurs décades, les récepteurs de neurotransmetteurs - qui permettent le signal au niveau de la synapse - se déplacent tellement rapidement que ce mouvement contrôle la transmission de l'influx nerveux à l'échelle de la

milliseconde. La mobilité des récepteurs contrôle donc la fidélité de transfert de l'information au niveau synaptique. Outre l'aspect fondamental majeur pour la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la transmission neuronale, ces travaux ouvrent la voie vers l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans des troubles neurologiques et psychiatriques dépendants d'une mauvaise communication entre neurones(13).

Détection de molécule fluorescentes individuelles

Intérêts

La détection de molécules individuelles en biologie permet d'accéder à plusieurs types d'informations fournies par aucune autre méthode. En premier lieu, cela permet de connaître la distribution complète d'un paramètre sans se limiter à la connaissance de sa moyenne d'ensemble. Ainsi, des sous-populations même minoritaires, pourront être étudiées et des corrélations entre différents paramètres pourront être menées sur les différentes sous-populations. En reprenant l'exemple cité ci-dessus concernant les récepteurs de neurotransmetteurs dans les synapses de neurones vivants, les méthodes de molécule uniques ont non seulement révélées l'existence de plusieurs sous-populations en termes de diffusion latérale dans la membrane cellulaire, mais également permis d'étudier les caractéristiques de la diffusion des récepteurs mobiles(9). En deuxième lieu, les études effectuées sur des objets uniques permettent d'avoir accès aux fluctuations dynamiques d'un paramètre et de connaître ainsi toutes les sous-étapes de son évolution temporelle. En effet, il n'est alors pas nécessaire de synchroniser les molécules que l'on étudie (ce qui serait en pratique impossible dans des organismes vivants). Dans l'exemple précédent, l'existence d'échanges de récepteurs de neurotransmetteurs entre compartiments cellulaires (espaces synaptiques et extrasynaptiques) ont pu être révélés pour la première fois. Enfin, nous citerons un troisième apport de la détection de molécules uniques par méthode optique. Il concerne la précision sub-longueur d'onde avec laquelle on peut déterminer la position spatiale d'une molécule. Elle est entièrement déterminée par le rapport signal-à-bruit avec lequel on détecte la molécule(14, 15). Ainsi, en reprenant l'exemple précédent, la détection de récepteurs de neurotransmetteurs individuels a rendu possible de mesurer le mouvement des récepteurs dans la synapse de neurones dont le diamètre (~300nm) est de l'ordre de la longueur d'onde optique. La précision de pointé des molécules était de l'ordre de 45nm.

Cette propriété est également à l'origine de nouvelles microscopies super-résolutives basées sur le contrôle de l'émission de molécules individuelles(16, 17). On peut d'ores et déjà entrevoir que ces nouvelles microscopies seront amenées à jouer un rôle déterminant en biologie dans les années à venir(18).

Marqueurs fluorescents « traditionnels »

Lorsque l'on souhaite observer une biomolécule évoluer dans son environnement physiologique, il est nécessaire de pouvoir la distinguer du grand nombre d'autres molécules constituant son entourage. La tâche devient plus ardue si l'on souhaite la détecter au niveau de la molécule individuelle. Les méthodes optiques, et en particulier la microscopie de fluorescence qui a l'avantage d'être peut invasive, ont permis de réaliser ce souhait.

Même s'il existe des biomolécules naturellement fluorescentes (les acides aminées contenant un cycle benzénique absorbent dans l'ultraviolet, et des cofacteurs d'enzyme tels que les NADH et FAD dans le bleu du spectre visible), on a généralement recours à l'utilisation de marqueurs fluorescents extrinsèques pour visualiser une biomolécule au niveau de l'objet individuel.

Le marquage de type immunologique utilise des anticorps dont l'affinité détermine la spécificité avec laquelle la biomolécule que l'on souhaite étudier est reconnue. Au préalable, on aura lié chimiquement un fluorophore à ces anticorps. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que l'on peut choisir le fluorophore que l'on utilise. Ainsi, on prend soin d'utiliser les fluorophores les plus brillants et qui émettent dans des domaines de longueur d'onde éloignés de l'autofluorescence des constituants de la cellule. Parmi les meilleurs choix on peut citer les Cyanines Cy3 et Cy5.

Tableau 1: Propriétés photophysiques de quelques fluorophores organiques

	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Quantum Yield (H_2O)	Intensité de saturation (kW/cm^2)	Taux maximum d'émission (photons/ms)	Nmax photons émis ($x10^8$)
Fluorescein	488	520	0.71	-		<0.1
Tetramethyl rhodamine	514	580	0.28	5.6±1.6	4000±1500	0.6±0.2
Cy3	532	568	0.14			>0.7
Cy5	630	670	0.18	2.2±1.0	2300±300	0.67±0.11
Cy7	695	800	0.02	0.6±0.2	900±80	1.5±0.5

A la fin des années 1990, une protéine de méduse naturellement fluorescente, la « green fluorescent protein » (GFP) a été clonée. Après quelques modifications génétiques, il a ainsi pu être produit un ensemble de variants de cette GFP, des protéines fluorescentes dîtes cyan (eCFP), verte (eGFP) et jaune (eYFP) en rapport avec le domaine spectral de leur spectre d'émission. Depuis, d'autres protéines fluorescentes on été identifiées dont le spectre d'émission est situé dans le rouge du spectre visible (DsRed …).

Il est alors possible par génie génétique, de rendre fluorescente n'importe qu'elle protéine en ajoutant à la séquence d'ADN codant pour cette protéine celle de la protéine fluorescente choisie. En lisant le brin d'ADN, la cellule produira donc une protéine chimérique constituée de la protéine d'origine et de la protéine fluorescente. Ici, l'avantage réside dans la spécificité intrinsèque de la méthode mais aussi dans le rapport 1 :1 entre la protéine étudiée et le fluorophore qui lui est accroché. Nous ne décrirons pas plus en détail l'utilisation des protéines fluorescentes en biologie dans ce cours, et je renvoie le lecteur à la très abondante littérature sur le sujet.

Malgré des propriétés photophysiques initialement non optimales pour les détections de molécules individuelles(19), les protéines fluorescentes connaissent un regain d'intérêt spectaculaire en microscopie de molécules uniques, grâce à la réalisation de protéines photo-activables(20), en particulier pour réaliser des images super-résolutives(16).

Méthodes expérimentales

La difficulté principale dans l'obtention de signaux issus de fluorophores individuels provient du fait qu'à température ambiante, les fluorophores n'émettent qu'un nombre limité de photons avant de subir le phénomène de photoblanchiment. Il en résulte qu'on ne pourra pas imager une molécule individuelle pendant un temps arbitrairement long. En pratique, les meilleurs fluorophores peuvent être imagés pendant typiquement quelques secondes (en milieu physiologique, contenant en particulier de l'oxygène) et jusqu'à la centaine de secondes en milieu privé d'oxygène.

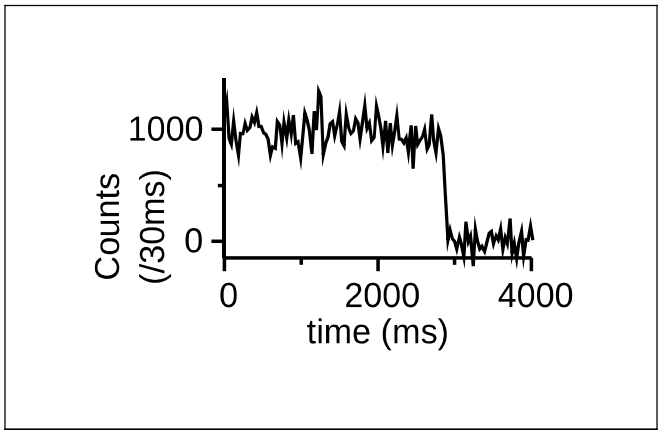

Figure 1 : signal émis par un molécule Cy5 individuelle. Le photoblanchiment digital de la molécule interrompt le signal recueilli.

Pour être détectés efficacement, les fluorophores doivent :

- Emettre un nombre de photons suffisant pour être identifiés dans la fenêtre temporelle utilisée, d'où l'utilisation de détecteur très bas bruits. Il convient de noter que le phénomène de saturation de l'émission de la fluorescence interdit d'accéder à des dynamiques temporelles supérieures au kHz à l'aide des détecteurs actuels car il impose une limite supérieure au temps d'acquisition minimum qui permet de collecter le nombre nécessaire de photons pour identifier une molécule individuelle,.
- Emettre un nombre des photons supérieur à celui émis par les molécules de leur environnement dans la bande spectrale utilisée, d'où l'utilisation de lasers et de géométries de détection particulières.

Trois types de montages expérimentaux sont couramment utilisés pour détecter des molécules individuelles :

- la microscopie confocale : cela permet de collecter les photons issus exclusivement d'un volume extrêmement réduit autour du fluorophore rejetant ainsi les photons émis par des molécules environnantes. Désavantage : cette méthode étant une méthode de balayage, elle ne permet pas d'accéder à des dynamiques trop rapides sur de grands champs. Ainsi, dans des échantillons biologiques vivants, où les molécules peuvent diffuser spatialement, cette méthode est dans la plupart des cas inappropriée. Dans le cas où l'on se contente de champs plus restreints, la méthode d'analyse consistant à effectuer à une spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS) permet d'accéder à des dynamiques plus rapides(21-23).
- la microscopie à onde évanescente : l'illumination des échantillons par ondes évanescentes permet de réduire la zone d'illumination à quelques centaines de nanomètres au dessus d'une surface ce qui limite le fond issu de l'autofluorescence de l'échantillon. Par essence cette méthode se limite donc à la visualisation de molécules au voisinage direct de la surface(24).
- La microscopie d'épifluroescence en champ large(14, 25) : un large champ est éclairé, mais aucune sélection spatiale de la zone de l'échantillon imagée n'est réalisée. Il doit donc être intrinsèquement peu autofluorescent.

Les deux dernières méthodes étant des méthodes de champ large, elles sont les plus utilisée sur des échantillons biologiques vivants.

Méthodes optiques utilisant des nanoparticules

Nanoparticules à semiconducteurs

Un type de marqueurs biologiques est apparu ces dernières années. Il s'agit de nanoparticules de semi conducteur. En particulier, celles composées de CdSe émettent des radiations dans le visible, ce qui les rend directement utilisables dans les microscopes des biologistes(26).

Ces nanoparticules tirent leurs propriétés optiques de leur taille nanoscopique. En effet, un cristal semi-conducteur voit ses propriétés radicalement modifiées lorsque ses dimensions sont inférieures au diamètre de Bohr. Sous l'action de la lumière, une paire électron-trou donne naissance à un exciton qui se retrouve dans un régime de fort confinement. Les niveaux d'énergie de l'électron et du trou ne sont plus des continuums mais sont quantifiés. L'excitons peut alors être assimilé à un atome artificiel d'où son appellation de quantum dot (« point quantique »)

A température ambiante, un photon d'énergie supérieure à l'énergie de gap du semi-conducteur sera absorbé, créant l'exciton qui après une relaxation rapide et non radiative vers le niveau excité de plus basse énergie, émettra un photon lors de la recombinaison électron trou. La durée de vie de cette transition radiative est de plusieurs nanoseconde, significativement plus longue que les fluorophores organiques. Cela a deux conséquences :

- La largeur spectrale de l'émission des quantum-dots est étroite et symétrique. Le rayonnement des quantum dot sera donc sensiblement plus facile à extraire de la lumière parasite d'un environnement autofluorescent cellulaire
- Il est possible de s'affranchir de l'autofluorescence de cellules en réalisant une détection déclenchée dans le temps : pour cela il a été proposé et démontré qu'en réalisant une excitation des quantum-dots à l'aide d'impulsions femtosecondes, et en utilisant un détecteur rapide, il est possible de réduire significativement le signal d'autofluorescence (facteur 100). En effet, il suffit de synchroniser la chaîne de détection de telle manière à ne collecter que les photons émis à des temps supérieurs aux durées de vies des molécules autofluorescentes mais inférieurs à celle des quantum-dots(27).

En fait, cette dernière possibilité n'est que très peu utilisée, en particulier car les quantum dots sont suffisamment brillants pour être facilement distingués de l'autofluorescence des cellules.

Comparés aux molécules organiques, les principaux avantages des quantum-dots résident dans la grande largeur de leur spectre d'excitation, l'étroitesse et l'accordabilité de leur spectre d'émission ainsi que dans leur brillance et dans leur grande résistance au photoblanchiment. Il en résulte qu'ils peuvent être facilement imagés au niveau individuel pendant des durées de plusieurs minutes. De plus, ils peuvent facilement être associés pour réaliser des marquages multicolores. Leur grande brillance permet également de pointer leur position avec des précisions de l'ordre de quelques nanomètres.

En revanche, ils présentent quelques désavantages. Fonctionnalisés afin d'être rendus biocompatibles, ils atteignent des tailles excédant la dizaine de nanomètres ce qui les rend sensiblement plus encombrants que les molécules organiques. L'étendue de leur utilisation dans des environnements cellulaires restreints peut alors être limitée(28). Ils ont également la particularité de clignoter fortement ce qui peut perturber l'identification d'objets en mouvement. Ils en restent néanmoins des marqueurs de biomolécules individuelles performants pour les applications en milieu cellulaire(10, 13).