



HAL
open science

Nanocristaux semiconducteurs: des sources de lumière pour l'optique et la biologie

Maxime Dahan

► **To cite this version:**

Maxime Dahan. Nanocristaux semiconducteurs: des sources de lumière pour l'optique et la biologie. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. tel-00113908

HAL Id: tel-00113908

<https://theses.hal.science/tel-00113908>

Submitted on 14 Nov 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Laboratoire Kastler Brossel

Habilitation à diriger des recherches
de l'Université Paris VI Pierre et Marie Curie

présentée par

Maxime Dahan

Sujet :

Nanocristaux semiconducteurs : des sources de lumière pour l'optique et la biologie

Soutenue le 2 novembre 2005
devant le jury composé de :

M. Mounji BAWENDI	Membre invité
M. Daniel CHOQUET	Rapporteur
M. Jean-Francois JOANNY	Rapporteur
M. Jean-Louis MARTIN	Membre invité
M. Alain PROCHIANTZ	Membre invité
M. Vahid SANDOGHDAR	Membre invité

Table des matières

1	Introduction	3
2	Photophysique de nanocristaux individuels	8
2.1	Intermittence de la fluorescence et vols de Lévy	8
2.2	Dégrouperment de la fluorescence	13
2.3	Mesure de l'orientation d'un nanocristal	14
2.4	Mesure des taux de recombinaison radiatif et non-radiatif d'un nanocristal unique	16
3	Solubilisation et fonctionnalisation des nanocristaux	18
3.1	Enjeux et difficultés	18
3.2	Solubilisation avec des polymères amphiphiles	20
3.3	Vers des sondes sélectives et fonctionnellement actives.	22
4	Dynamique cellulaire à l'échelle de la molécule unique	24
4.1	Suivi de molécules individuelles en milieu vivant avec des nanocristaux semiconducteurs	24
4.2	Diffusion membranaire du récepteur de la glycine.	32
4.3	Dynamique du récepteur du GABA dans le cône de croissance	40
4.4	Vers un suivi en molécule unique du mouvement intracellulaire de déterminants de la division asymétrique	45
5	Conclusion	50
A	Autres travaux	59
A.1	Travail de doctorat : effets quantiques dans des gaz de césium ultrafroids .	59
A.2	Mesure de distance en molécule unique par transfert d'énergie	60
A.3	Etude optique de la dynamique des interactions ADN-Protéine	62
B	Liste complète des productions et activités scientifiques	65
C	Curriculum Vitae	71

1 Introduction

Les nanocristaux semiconducteurs (NCs) sont une illustration des progrès spectaculaires réalisés dans la synthèse de nanomatériaux. Au cours des années 1990, plusieurs laboratoires ont mis au point des techniques de synthèse colloïdale de nanoparticules permettant d'obtenir des échantillons de grande qualité, tant par leurs propriétés optiques que par leur monodispersité en taille [1, 2, 3, 4]. Ces objets composés de quelques centaines à quelques dizaines de milliers d'atomes représentent l'équivalent en solution des boîtes quantiques auto-organisées réalisées en épitaxie par jet moléculaire et étudiées par les physiciens du solide depuis la fin des années 80 [5]. Grâce à un contrôle précis de leur taille à l'échelle nanométrique, les boîtes quantiques colloïdales permettent d'explorer la modification des propriétés physiques (optiques, électriques, structurales, . . .) lorsque l'on passe progressivement de l'échelle atomique à celle du matériau massif [6].

Le changement des propriétés d'émission des nanocristaux semiconducteurs en fonction de leur taille est certainement l'une des manifestations les plus spectaculaires des effets quantiques à l'échelle nanométrique dans ces systèmes. A cause du confinement quantique des paires électron-trou dans la structure, la longueur d'onde d'émission correspondant à leur recombinaison radiative se décale vers les basses énergies lorsqu'on augmente la taille du nanocristal. Dans le cas du séléniure de cadmium très fréquemment utilisé, il est possible de varier ainsi le pic d'émission de 480 nm à 650 nm, passant continument du bleu au rouge, lorsque le diamètre de la particule croît de 2 à 10 nm. Afin en d'augmenter le rendement quantique, les nanocristaux sont le plus souvent recouverts de quelques couches atomiques d'un semiconducteur de plus grand gap. En servant de barrière de potentiel, cette coquille empêche les porteurs de charge de venir se piéger à la surface. Elle réduit ainsi les processus de recombinaison non radiative et permet d'obtenir des échantillons dont le rendement de fluorescence dépasse 50 %. Pour les nanoparticules de CdSe dont l'énergie de recombinaison varie entre 1.9 et 2.6 eV suivant la taille, le matériau protecteur le plus souvent utilisé est le sulfure de zinc dont le gap dans le massif est 3.8 eV. Les résultats présentés dans ce manuscrit ont ainsi été obtenus avec des échantillons de nanocristaux cœur-coquille de CdSe/ZnS. L'ensemble des techniques de synthèse permet donc de préparer des chromophores inorganiques brillants, de longueur d'onde ajustable, susceptibles d'être modifiés chimiquement et pouvant être incorporés dans des environnements variés.



FIG. 1 – A) Structure d'un nanocristal de CdSe visualisé en microscopie électronique à transmission (cliché A. Kadavanich, laboratoire de P. Alivisatos, UC Berkeley), B) Echantillons de nanocristaux de CdSe/ZnS de taille croissante.

De manière fortuite, le développement des méthodes de synthèse de nanoparticules semiconductrices a coïncidé avec l'avènement d'un autre domaine de recherche : *la détection optique de molécules individuelles*. Initié par les travaux de W.E. Moerner et M. Orrit à la fin des années 80 [7, 8], ce champ de recherche a connu depuis un essor considérable. Les expériences, qui portaient initialement sur la spectroscopie de molécules à basse température, ont évolué progressivement vers des mesures à température ambiante puis des applications à l'étude de systèmes biologiques [9, 10]. L'un des attraits des expériences de molécules uniques est de pouvoir sonder des propriétés qui sont habituellement moyennées dans les mesures d'ensemble. Les variations des grandeurs physiques, qu'elles résultent d'inhomogénéités au sein de l'échantillon ou de fluctuations dynamiques stochastiques, deviennent alors accessibles.

Les nanocristaux semiconducteurs, en tant que nouvelle classe d'émetteur fluorescent, sont naturellement devenus objet d'étude en molécule unique, notamment dans le laboratoire de M. Bawendi au MIT [11]. Réalisée à l'échelle d'une seule nanoparticule, la spectroscopie optique des nanocristaux a révélé des phénomènes insoupçonnés tels que l'intermittence de fluorescence [12] ou la diffusion spectrale [13] et a mis en avant le rôle de l'environnement du nanocristal sur les modifications de ses propriétés de fluorescence. De manière générale, ces expériences ont renforcé l'image des NCs comme des quasi-atomes tout en soulignant les interactions dynamiques auxquelles ils sont soumis.

Initialement, la synthèse et l'étude des propriétés optiques des NCs étaient en partie motivées par leur utilisation à la place des molécules organiques dans des dispositifs optiques ou optoélectroniques. Dans ce but, la possibilité de les manipuler dans des solvants et de les incorporer dans de multiples environnements (polymères, gel, . . .) est un avantage par rapport aux boîtes épitaxiées qui sont préparées dans une matrice solide. Au nombre des dispositifs récents, on peut ainsi citer la réalisation de diodes électroluminescentes [14, 15], de capteurs solaires [16], l'observation de l'émission laser à température ambiante et cryogénique [17, 18] ou l'incorporation de nanocristaux dans des cristaux photoniques [19].

En 1998, les équipes de P. Alivisatos (UC Berkeley) et S. Nie (Indiana University) ont fait émerger un champ nouveau d'applications en démontrant qu'en plus de leur intérêt fondamental, les nanocristaux semiconducteurs pouvaient être utilisés comme sondes pour la biologie [20, 21]. Leurs propriétés optiques, intermédiaires entre celles du cristal massif et celles d'atomes individuels, en font des objets très favorables pour le marquage fluorescent pour les raisons suivantes :

- A la différence des fluorophores organiques, le spectre d'absorption des NCs est très large permettant d'exciter optiquement la nanoparticule très au-dessus du gap et de filtrer efficacement l'émission de l'excitation.
- Le spectre d'émission est au contraire étroit et symétrique, sans les décalages vers le rouge dus aux niveaux vibrationnels dans les molécules organiques.
- La photostabilité des nanocristaux semiconducteurs est bien supérieure à celle des fluorophores organiques.

L'ensemble de ces caractéristiques rend possible la détection multicolore avec une

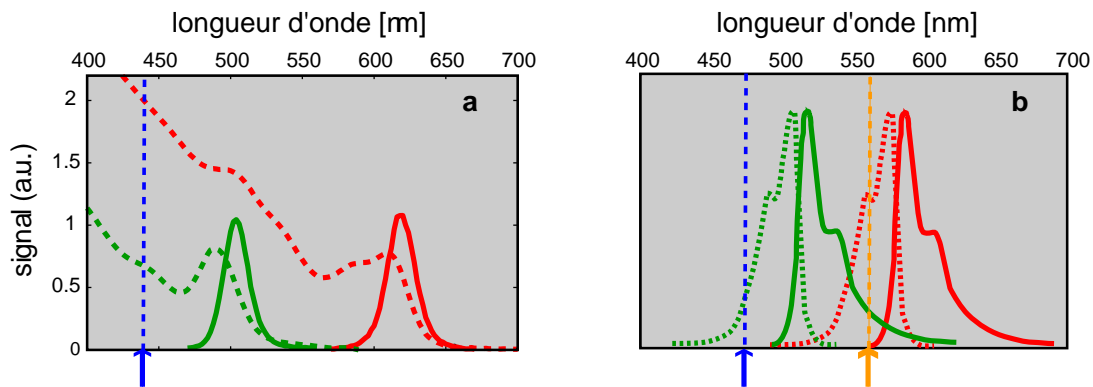


FIG. 2 – Spectres d’émission (traits pleins) et d’absorption (en pointillé) : A) de deux échantillons de nanocristaux de CdSe/ZnS : (i) de diamètre 2.2 nm et d’émission à 500 nm (en vert), (ii) de diamètre 5.0 nm et d’émission à 620 nm (en rouge), B) de deux colorants organiques.

seule source d’excitation et sans effet de photoblanchiment, ouvrant des perspectives nouvelles pour explorer les propriétés d’échantillons biologiques avec une grande sensibilité. Si quelques années ont été nécessaires pour que les promesses annoncées commencent à se réaliser, les utilisations des NCs en biologie sont aujourd’hui en plein essor [22, 23, 24], que cela soit pour améliorer les performances de techniques pré-existantes ou pour développer des applications entièrement nouvelles. Les applications à la biologie cellulaire sont particulièrement intéressantes dans la mesure où : (i) l’imagerie est identifiée comme un enjeu important pour le développement de la biologie cellulaire [25], (ii) ce sont pour les systèmes cellulaires que les propriétés des NCs sont le plus nettement supérieures à celles des marqueurs organiques traditionnels.

Mon travail dans ce domaine de recherche a commencé fin 1997 lors d’un séjour post-doctoral au Lawrence Berkeley National Laboratory dans l’équipe de S. Weiss où j’ai notamment été initié aux méthodes de synthèse inorganique. A mon retour en France, je me suis orienté vers une application nouvelle : l’utilisation des nanocristaux semiconducteurs pour l’étude en molécule unique de la dynamique cellulaire. En tirant partie des techniques d’imagerie ultrasensible et en bénéficiant de la photostabilité des NCs, le but était de suivre le mouvement de molécules biologiques dans des cellules vivantes avec une grande sensibilité. Comme il est discuté dans ce manuscrit, cette approche a pu être validée expérimentalement, au moins dans le cas de la dynamique de protéines membranaires. L’imagerie de nanocristaux individuels en milieu vivant est désormais réalisable et permet l’observation des mouvements à une échelle moléculaire pendant des durées sans précédent. Les NCs rendent aujourd’hui possibles des expériences en biologie cellulaire qui n’auraient sans doute pas été envisageables sans l’usage de ces nanomatériaux.

De manière générale, la mise au point des applications des nanocristaux en opto-électronique ou en biologie met en jeu un ensemble varié de domaines de recherche allant de la chimie inorganique à la biologie cellulaire en passant par l’optique ou la physique des

colloïdes. La figure 3 résumer les problèmes scientifiques qui apparaissent et leurs liens réciproques. De manière naturelle, la synthèse de nouvelles nanoparticules soulève des questions sur leurs propriétés optiques et éventuellement leur incorporation dans des dispositifs optiques ou opto-électroniques. De même, les conditions de synthèse affectent les méthodes de solubilisation et fonctionnalisation qui elles-même déterminent les mesures de biologie cellulaire qui peuvent être envisagées. Dans le cas des expériences de suivi de molécules uniques, nous verrons que cela débouche en plus sur des questions difficiles de traitement et d'analyse d'images.

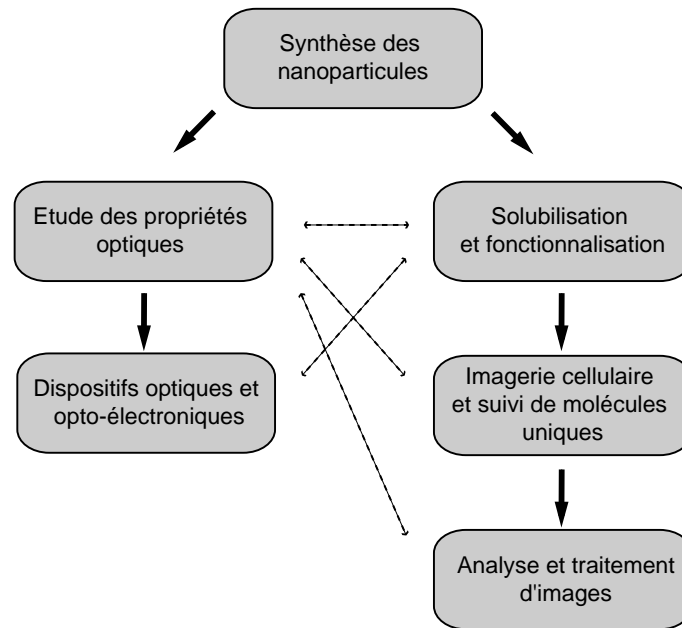


FIG. 3 – Ensemble de questions mises en jeu dans l'étude et les applications des nanocristaux semiconducteurs. Les liens thématiques naturels sont indiqués par les flèches en traits pleins tandis que les flèches en pointillé désignent des relations "transversales".

Il pourrait être tentant d'aborder chacune des questions de manière autonome. L'un des buts de ce mémoire est cependant d'illustrer à quel point les enjeux sont souvent reliés entre eux et qu'il est plus fructueux de conserver une approche globale. Au cours des dernières années, j'ai pu constater à plusieurs reprises dans quelle mesure la compréhension détaillée des propriétés optiques à l'échelle du NC individuel était importante pour la mise au point de méthode efficace d'imagerie cellulaire, combien la nature exacte des groupes fonctionnels pouvait influencer sur l'analyse de la dynamique des molécules ou comment la caractérisation colloïdales des NCs pouvait être affectée par leurs propriétés photophysiques.

La démarche suivie a donc consisté à aborder plusieurs aspects en parallèle : (i) l'étude des propriétés optiques des NCs, (ii) leur caractérisation physico-chimique, (iii) l'analyse de la dynamique de mécanismes cellulaires. Faute de place et de moyen appropriés, peu d'efforts ont été consacré à la synthèse des nanoparticules. Il s'agit pourtant d'un domaine

qui connaît de développements spectaculaires. En changeant la nature ou l'ingénierie des matériaux, il est possible d'explorer d'autres gammes de longueurs d'onde d'émission, notamment dans le proche infra-rouge (800-1200 nm) [26, 27] pour lequel il existe peu de marqueurs organiques et qui permet d'imager plus profondément dans les tissus.

Des progrès tout aussi spectaculaires ont eu lieu sur le contrôle de forme des nano-objets. Au cours des dernières années, on a vu tour à tour apparaître des nanobatonnets semiconducteurs [28], des tétrapodes [29], des nanofils [30], des nanosphères creuses [31] ou des nanomatériaux hybrides or-semiconducteur [32]. L'intérêt pour la biologie a été suggéré dans certains cas, comme par exemple pour les mesures d'orientation avec des nanobatonnets [33] ou la détection électrique de virus avec des nanofils [30]. Dans bien d'autres cas, la possibilité et l'utilité d'intégrer ces nanoparticules dans des expériences sur systèmes biologiques sont aujourd'hui plus hypothétiques. Ces nano-objets restent pourtant un sujet de fascination qui laisse une grande part à l'imagination.

L'essentiel du travail décrit dans ce mémoire a été mené au sein de l'équipe "Optique et Biologie" du Laboratoire Kastler Brossel. Cette équipe, que j'anime avec Pierre Desbiolles, a été créée à l'automne 2000 autour d'un thème de recherche principal portant sur la détection optique de molécules individuelles, notamment pour la biologie. En plus de l'étude des NCs et de leur applications en milieu vivant, notre équipe étudie également des méthodes de visualisation des interactions ADN-Protéines. Notre approche consiste à étendre et à accrocher des molécules d'ADN à proximité d'une surface en s'inspirant des techniques de peignage moléculaire développées par V. Croquette et D. Bensimon à l'ENS. Ce projet, dont P. Desbiolles a plus spécifiquement la charge, consiste à visualiser directement le mouvement le long de la molécule d'ADN d'une protéine marquée, réalisant ainsi un "motility assay" similaire à ceux obtenus avec des moteurs moléculaires (kinésine, myosine, . . .) se déplaçant le long de microtubules ou de filaments d'actine. Soulignons ici que tous ces projets, de nature pluridisciplinaire, ont entraîné de nombreuses collaborations sans lesquelles il n'aurait pas été possible d'aboutir.

Ce manuscrit est organisé de la manière suivante : dans les sections 2, 3 et 4, je présente successivement le travail réalisé sur la photophysique de nanocristaux individuels, les processus de solubilisation et fonctionnalisation, l'imagerie en molécule unique de la dynamique cellulaire. Pour chacune des parties, je me suis efforcé de résumer les résultats obtenus et d'indiquer des questions ouvertes et les directions qui seront suivies dans un proche avenir. En annexe, je présente très succinctement d'autres travaux de recherche et notamment un bref résumé de ma thèse de doctorat. Une liste complète des productions et activités scientifiques est également jointe.

2 Etude photophysique de nanocristaux individuels

Au cours des années 90, de multiples expériences ont démontré que l'étude de molécules fluorescentes à l'échelle de l'objet unique révélait des processus photophysiques nouveaux tels que des fluctuations spontanées d'intensité, de position spectrale ou de durée de vie des émetteurs [7, 8]. De par leur nature aléatoire, ces fluctuations sont rapidement moyennées dans des mesures d'ensemble et restent ainsi cachées dans des expériences conventionnelles. Tant d'un point de vue fondamental que du point de vue des applications en biologie, il est essentiel de comprendre les caractéristiques des sondes fluorescentes utilisées afin de distinguer ultérieurement les effets liés à leurs propriétés intrinsèques de ceux liés aux molécules auxquelles on souhaite les attacher.

Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés à plusieurs propriétés de l'émission de NCs semiconducteurs individuels et nous présentons ici les résultats obtenus sur les aspects suivants : (i) l'intermittence de la fluorescence, (ii) le dégrouement de photons de fluorescence, (iii) la mesure de l'orientation de nanocristaux individuels, (iv) l'étude résolue en temps de la recombinaison radiative et non radiative. De nombreux aspects de ces expériences sont décrits plus en détail dans la thèse de X. Brokmann [34]. Comme il est expliqué dans le manuscrit, ces mesures ont souvent eu des implications importantes pour les expériences en cours de suivi de protéines individuelles en milieu vivant et ont également suggéré de nouvelles expériences sur des molécules biologiques.

2.1 Intermittence de la fluorescence et vols de Lévy

Observé individuellement, un nanocristal est un objet fluorescent intermittent [12] : l'intensité émise alterne de manière aléatoire entre des phases d'allumage et d'extinction pour lesquelles on collecte un très faible nombre de photons (fig. 4a). Cette intermittence (également appelé clignotement) est un phénomène recurrent dans l'étude d'émetteurs fluorescents et a été observé dans une large gamme de systèmes : protéines fluorescentes [35], fluorophores organiques [36], agrégats métalliques [37], polymères fluorescents [38], nanotubes de carbone [39], nanocristaux de CdTe [40], de InAs [41], de Si [42]... A une échelle microscopique, l'origine de l'intermittence n'est pas entièrement élucidée et dépend sans doute de la nature du système étudié. Avant d'en discuter brièvement les causes possibles dans le cas des NCs, nous présentons l'approche développée en collaboration avec J.-P. Bouchaud (CEA) pour décrire les propriétés statistiques du clignotement [49].

Du fait de leur photostabilité, il est possible d'observer des nanocristaux individuels pendant des durées atteignant ou dépassant plusieurs dizaines de minutes. Les distributions P_{on} et P_{off} des durées des phases d'allumage et d'extinction peuvent ainsi être mesurées précisément. Il s'avère que ces distributions correspondent à des lois de puissance $1/t^{1+\mu}$ avec des exposants $\mu < 1$ (fig. 4b et 4c) [40, 43, 44]. De telles lois, souvent appelées "statistiques de Lévy" ou lois "larges", ont des propriétés particulières telles que l'absence de valeur moyenne $\langle t \rangle$. Elles diffèrent ainsi des lois "étroites" pour lesquelles $\langle t \rangle$ est définie. Ces statistiques anormales ont été largement étudiées au LKB dans le groupe "Atomes Ultra-froids" par C. Cohen-Tannoudji pour décrire les propriétés du refroidisse-

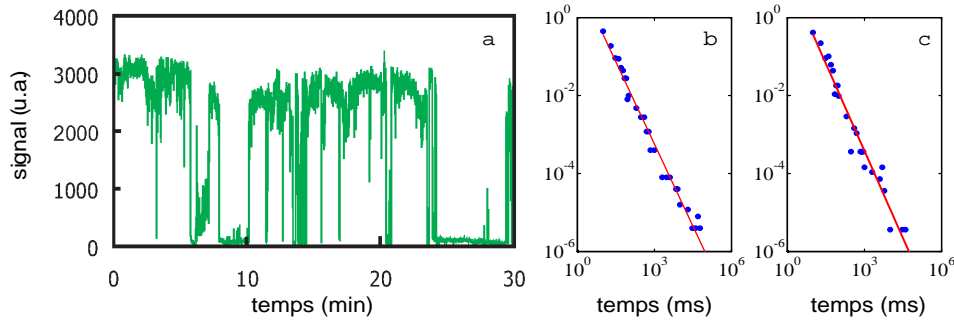


FIG. 4 – a) Intermittence de la fluorescence d’un nanocristal unique, b) densité de probabilité P_{on} , c) densité de probabilité P_{off} .

ment subrecul [45]. Au cours de ma thèse, j’avais participé à ce travail [46] et été ainsi sensibilisé aux caractéristiques inhabituelles des processus de Lévy.

Dans le cas des nanocristaux, nous avons développé une description purement statistique de la fluorescence formellement semblable à celle de marches aléatoires ou de phénomènes de persistance en physique statistique [45, 48]. Un nanocristal est décrit comme un système à deux états, allumé (“on”) ou éteint (“off”), dont on cherche à analyser les fluctuations temporelles. A partir de chaque mesure de l’intensité d’un nanocristal individuel, on déduit une séquence temporelle :

$$\{\tau_{\text{on}}^{(1)}, \tau_{\text{off}}^{(1)}, \tau_{\text{on}}^{(2)}, \tau_{\text{off}}^{(2)}, \dots, \tau_{\text{on}}^{(n)}, \tau_{\text{off}}^{(n)}\} \quad (1)$$

correspondant aux durées successives des périodes “on” et “off”. Les exposants μ_{on} et μ_{off} des lois de puissance que nous avons ainsi déterminées valent respectivement 0.58 (0.17) and 0.48 (0.15), en accord avec des mesures précédentes [40, 43, 44].

Notre analyse porte sur les propriétés statistiques de ces séquences et fait appel à la théorie statistique du renouvellement. Cette théorie est fréquemment employée pour décrire par exemple les phénomènes de panne de composants et dépend de la statistique temporelle des processus étudiés [47]. Initialement développée pour des lois étroites, elle a été récemment étendue au cas des lois larges [48] pour lequel les prédictions sont largement modifiées.

D’un point de vue expérimental, notons tout de suite que l’on dispose ici de trajectoires individuelles, enregistrées pour un grand nombre de nanoparticules, qui peuvent être ultérieurement moyennées pour “reconstruire” les valeurs d’ensemble. Dans les mesures avec de nanocristaux, il est ainsi possible de tester directement le lien, central dans la notion d’ergodicité, entre moyenne temporelle et moyenne d’ensemble. Ceci diffère des expériences de refroidissement laser pour lesquelles les mesures portent simultanément sur un grand nombre d’atomes.

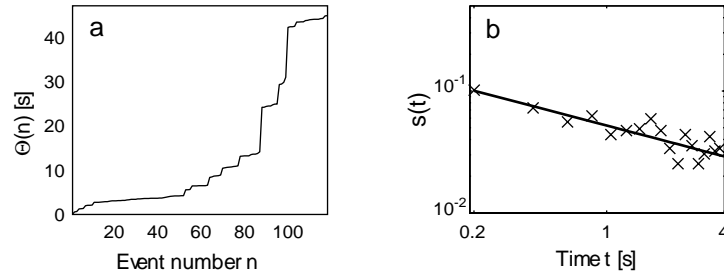


FIG. 5 – a) “Devil’s staircase”; b) Densité de probabilité $s(t)$ pour qu’un NC bascule d’un état “on” à un état “off” après avoir passé un temps t dans l’état éteint.

Caractéristique fondamentale des lois larges

Considérons un échantillon $\{\tau_i\}_{1 \leq i \leq n}$ de n variables aléatoires indépendantes provenant d’une distribution statistique $f(\tau)$. Si f est une loi étroite, la plus grande valeur de l’échantillon τ^{\max} s’écarte peu de la valeur moyenne $\langle \tau \rangle$. Par exemple, pour la loi exponentielle $ae^{-a\tau}$ (de moyenne $1/a$), τ^{\max} est de l’ordre de $\log(n)/a$. A contrario, pour une loi de puissance $t_0^\mu/t^{1+\mu}$ ($\mu < 1$), τ^{\max} est de l’ordre de $\Theta(n) = \sum_1^n \tau_i$ la somme de toutes les variables aléatoires. La somme $\Theta(n)$ peut être évaluée au moyen du théorème centrale limite généralisé qui stipule que la variable réduite $\Theta(n)/t_0 n^{1/\mu}$ est distribuée suivant une loi de Lévy de paramètre μ [45]. Ainsi, au lieu de varier comme n , Θ croît plus rapidement en $n^{1/\mu}$.

Le fait que τ^{\max} soit comparable à Θ peut être observé expérimentalement en traçant $\Theta(n)$ en fonction de n . Ceci fait apparaître une figure désignée parfois par le terme d’“escalier du diable” (en anglais “devil’s staircase”) : chaque décrochement brusque correspond à un évènement dont la durée est comparable à la durée totale (fig. 5a). Cette caractéristique essentielle des lois larges permet d’appréhender qualitativement bon nombre de leurs propriétés. Puisque l’évènement dominant a une durée de l’ordre de la durée totale de l’expérience, cela signifie que :

- les propriétés statistiques du processus temporel vont évoluer au cours du temps et cela même si la loi génératrice est stationnaire. Il apparait ainsi de manière implicite l’idée de *vieillesse statistique* dans la dynamique du système.
- il n’existe pas d’échelle de temps typique sur laquelle effectuer une moyenne temporelle que l’on pourrait comparer à une moyenne d’ensemble. La question de l’*ergodicité* du système se pose donc naturellement.

Vieillesse statistique

Pour illustrer le phénomène de vieillissement statistique, on considère $s(t)$ la densité de probabilité qu’un NC bascule d’un état éteint à un état allumé après avoir passé le temps t dans un état éteint. Dans le cas d’une loi étroite, $s(t)$ est constante et égale à $1/\langle t \rangle$. Pour une loi large, la situation change radicalement : $s(t)$ décroît avec le temps comme

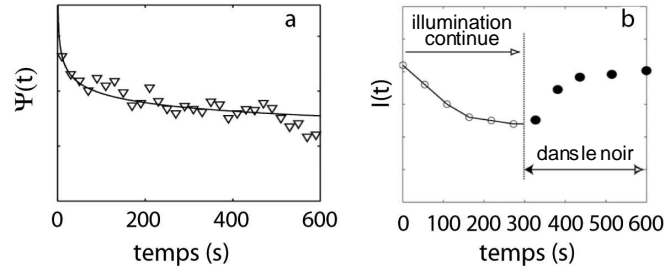


FIG. 6 – a) Fraction $\Phi(t)$ de NCs dans l'état "on" à l'instant t . La courbe plein correspond à une décroissance en $1/t^{0.13}$; b) Sous illumination continue, la fluorescence de l'échantillon diminue progressivement. Lorsque celui-ci est laissé dans le noir, la fluorescence (sondée pendant 100 ms toutes les minutes) revient à son niveau initial.

$t^{\mu_{\text{off}}-1}$ [45]. En d'autres termes, $s(t)$ dépend du temps préalablement passé dans l'état noir. Nous avons testé expérimentalement cette prédiction et trouvé un bon accord entre la décroissance expérimentale en $t^{-0.5}$ et la valeur attendue d'après notre détermination de μ_{off} (fig. 5b).

Evolution de l'intensité de fluorescence d'un ensemble de nanocristaux

L'effet de vieillissement statistique a des conséquences importantes sur l'interprétation de grandeurs aussi élémentaires que l'intensité $I(t)$ émise par un ensemble de nanocristaux. Pour illustrer cela, on considère $\Phi(t)$ la fraction de NCs dans l'état "on" à l'instant t . Si on fait l'hypothèse que tous les nanocristaux émettent avec la même intensité, $\Phi(t)$ est simplement proportionnel à $I(t)$.

Dans le cas de lois étroites, le système est à l'équilibre à tout instant. $\Phi(t)$ ne dépend pas de t et est égal à $\langle \tau_{\text{on}} \rangle / (\langle \tau_{\text{on}} \rangle + \langle \tau_{\text{off}} \rangle)$. Dans le cas de lois larges, $\Phi(t)$ dépend des temps $\Theta_{\text{on}}(n) = \sum_1^n \tau_{\text{on}}^i$ et $\Theta_{\text{off}}(n) = \sum_1^n \tau_{\text{off}}^i$ passés respectivement dans les états "on" et "off" et donc des valeurs relatives des exposants μ_{on} et μ_{off} . Ainsi, pour $\mu_{\text{on}} > \mu_{\text{off}}$, le temps passé dans l'état éteint augmente plus rapidement avec le nombre d'allumage n . Θ_{off} va ainsi finir par dominer et l'intensité de fluorescence va décroître. On montre plus précisément que $\Phi(t)$ varie comme $t^{-(\mu_{\text{on}}-\mu_{\text{off}})}$ [45].

Nous avons testé cette prédiction expérimentalement et mesuré une décroissance en $t^{-0.13}$ en accord avec les mesures des exposants μ_{on} et μ_{off} (fig; 6a). Nous avons également observé que cette décroissance est réversible : après une illumination continue pendant 10 minutes, si on éteint le laser et on laisse l'échantillon dans le noir pendant 10-15 minutes, on récupère le niveau initial de la fluorescence (fig; 6b). Ce résultat important indique qu'une décroissance de la fluorescence n'a pas nécessairement comme origine un processus irréversible tel que la photodestruction, mais peut avoir pour cause des fluctuations temporelles entre deux états. Des observations récentes suggèrent qu'un tel effet puisse également jouer un rôle dans le photoblanchiment d'autres émetteurs fluorescents (fluorophores, GFP, ...) [50, 51, 52].

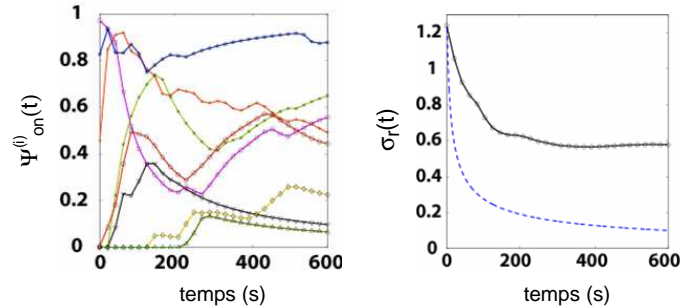


FIG. 7 – a) Exemple pour 8 trajectoires de la variation temporelle de $\Psi_{\text{on}}^i(t)$, la fraction passée dans l'état “on” entre 0 et t , b) Ecart quadratique $\sigma_r(t)$ de la distribution des $\Psi_{\text{on}}^i(t)$ relatif à la valeur moyenne ($\sigma_r(t)$ est calculé à partir de 230 trajectoires). La courbe en pointillé correspond à la décroissance de $\sigma_r(t)$ attendue lorsque l'intermittence est gouvernée par des lois étroites.

Non-ergodicité

Pour illustrer la différence entre moyenne temporelle et moyenne d'ensemble, nous avons comparé la fraction $\Psi(t)$ de NCs dans l'état allumé à l'instant t à $\Psi_{\text{on}}^i(t)$, la fraction du temps passé dans l'état allumé entre 0 et t pour le $i^{\text{ème}}$ NC. On observe expérimentalement que les valeurs $\Psi_{\text{on}}^i(t)$ ne convergent pas vers $\Psi(t)$ (fig; 7a). Au contraire, elles fluctuent largement, avec un écart quadratique de l'ordre de l'unité (fig; 7b). Moyenne temporelle et moyenne d'ensemble ne coïncident donc pas, fournissant une manifestation explicite de la non-ergodicité du système.

Origine de l'intermittence

Si la nature des mécanismes d'intermittence des nanocristaux n'est pas encore entièrement comprise, plusieurs aspects sont cependant bien établis. Il a été ainsi démontré par plusieurs méthodes que le passage d'un état “on” à un état “off” correspond à une ionisation du nanocristal [53, 54]. Cette ionisation a lieu par transfert tunnel de l'électron (ou du trou) vers un état piège accepteur à la surface de la particule. Dans ce mécanisme, la distribution en loi de puissance des durées “on” provient de reconfigurations dynamiques de l'environnement de la nanoparticule [34]. La neutralisation ultérieure du NC résulte de la réinjection, par effet tunnel résonnant, d'un électron par un piège donneur avec un taux de couplage $k \propto e^{-d/\lambda}$ (λ est la longueur tunnel du porteur dans le piège). Si on fait l'hypothèse que la densité de probabilité de distance tunnel d varie exponentiellement $e^{-d/\delta}$, alors la durée des états “off” est distribuée suivant une loi de puissance $1/\tau^{1+\mu}$ avec $\mu = \lambda/\delta$.

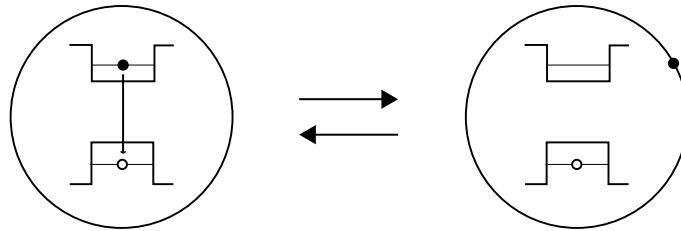


FIG. 8 – L’intermittence résulte de passages entre un état neutre (“on”) et un état ionisé (“off”).

Pour autant que cette discussion soit compatible avec certaines observations expérimentales, de nombreux points restent à préciser. Il n’est notamment pas clair de savoir pourquoi les exposants mesurés sont presque toujours de l’ordre de $1/2$, quelque soit l’échantillon utilisé ou l’équipe ayant réalisé les expériences. On ne peut donc exclure qu’un mécanisme plus “universel” explique les caractéristiques de l’intermittence de la fluorescence, indépendamment des détails microscopiques du système. Une étude expérimentale plus approfondie nécessiterait de sonder précisément l’environnement des nanoparticules afin d’en corrélérer les propriétés avec la fluorescence mesurée mais ceci reste en pratique difficile à réaliser. Un autre point qui n’est pas décrit par ce modèle d’ionisation concerne l’apparition de troncature dans la distribution des durées “on” : lorsqu’on augmente l’intensité d’excitation, la distribution P_{on} tend à décroître plus vite qu’une loi de puissance au temps long ($> 1-10$ s) [34], sans toutefois correspondre à une loi exponentielle.

Signalons pour terminer qu’un papier récent [55] a montré qu’il était possible de diminuer, sinon d’éliminer, les phénomènes de scintillement *in vitro* en rajoutant en solution une haute concentration (10 à 100 mM) d’un agent réducteur tel que le beta-mercaptoéthanol ou le dithiothreitol (DTT) dont l’effet serait de remplir les pièges électroniques en surface de la particule et de réduire ainsi les possibilités d’ionisation photoinduite. Le groupe de S. Xie à Harvard a également indiqué avoir observé une suppression du scintillement pour des NCs dans des compartiments endosomaux de cellules vivantes, peut être due à une forte concentration locale de cystéine ou d’histidine.

2.2 Dégrouperement de la fluorescence

Notre équipe, de manière concomittante à d’autres groupes [56, 57], a effectué des mesures de dégroupement de la fluorescence sur des nanocristaux uniques. Le grand nombre de photons qui peut être collecté permet d’obtenir des données avec un très bon signal sur bruit. Nous avons d’abord effectué ces mesures en excitation continue et observé un “anti-bunching” dépassant 99 % à température ambiante (fig. 9a) [58]. A la différence des boîtes quantiques épitaxiées, il n’y a pas d’émission bi-excitonique, ce qui évite notamment de sélectionner spectralement les photons¹. Les nanocristaux sont ainsi de bons candidats

¹Une étude récente du groupe de M. Bawendi (MIT) a montré que pour des nanoparticules de rayon $R \sim 5$ nm (émettant à 655 nm), il est possible d’observer l’émission de l’état à trois excitons [59]. Pour

pour la réalisation de sources de photons uniques, notamment importantes pour la cryptographie quantique. La poursuite de cette étude a été réalisée avec J.-P. Hermier (équipe “Optique Quantique” du LKB) en étendant ces mesures à une excitation pulsée [62, 63]. Grâce à une caractérisation précise du taux de collection de la fluorescence, il a été notamment démontré que la probabilité de détection d’un photon par pulse d’excitation atteint 3 % dans le cas des nanocristaux semiconducteurs, comparable ou supérieure aux cas des autres sources de photons uniques (atomes, fluorophores organiques, boîtes quantiques épitaxiées, centres colorés du diamant, ...).

La mesure de la fonction d’autocorrélation $g^{(2)}(t)$, dont le dégroupement de photons ($g^{(2)}(t) < 1$) est la caractéristique à temps courts ($t \leq 100$ ns), fait aussi apparaître des phénomènes de groupement de photons ($g^{(2)}(t) > 1$) à temps longs (de la μ s à plusieurs dizaines de minutes). Ces phénomènes de groupement sont directement liés au scintillement et aux statistiques de Lévy qui le gouvernent. Nous avons pu mesurer la fonction de corrélation d’un nanocristal unique sur presque 12 ordres de grandeurs, donnant une image complète des fluctuations de l’émetteur (fig. 9b). Nous avons également mis en évidence la non-stationnarité de la fonction d’autocorrélation mais sans en faire une description quantitative [58]. Plusieurs études théoriques ont été menées depuis sur ce sujet [61] et fournissent aujourd’hui une description analytique des propriétés de la fonction d’autocorrélation temporelle dans le cas de lois larges.

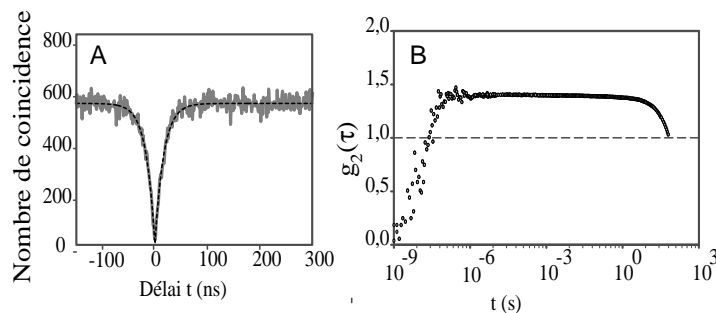


FIG. 9 – *Fonction de corrélation de l’intensité de fluorescence d’un nanocristal individuel. A) Dégroupement de photons en excitation continue. B) $g^{(2)}(t)$ sur 12 ordres de grandeurs.*

2.3 Mesure de l’orientation d’un nanocristal

Afin de caractériser la collection de la fluorescence de nanocristaux déposés sur des lamelles de verre, nous nous sommes intéressés à leurs propriétés d’émission au voisinage d’une interface diélectrique et notamment les modifications du diagramme de rayonnement. Ces résultats qui sont un prolongement de ceux obtenus pour des fluorophores ou

des particules plus petites, telles que celles utilisées dans nos expériences, ce processus tri-excitonique est masqué par les effets de recombinaison non radiative Auger dont le taux varie en $1/R^3$ [60].

des atomes [64, 65], font directement intervenir le dipôle d'émission des nanocristaux et son orientation à l'interface. Dans le cas des nanoparticules de CdSe, ce dipôle est dit "2D dégénéré", correspondant au fait les niveaux excitoniques émetteurs sont dégénérés et ont un moment cinétique $\pm\hbar$ le long du "c-axis" de leur structure cristalline hexagonale [34, 66].

La détermination expérimentale de cette orientation a fait l'objet de plusieurs études par des mesures de polarisation de la fluorescence [67, 68]. Nous avons utilisé ici une méthode d'imagerie [69, 70] pour déterminer le diagramme de rayonnement complet de la nanoparticule et accéder à son orientation tridimensionnelle (fig. 10a et b) [71]. Cette méthode consiste à déplacer l'objectif, initialement en position focalisée, vers l'échantillon d'une distance de 0.5 à 1 μm . L'image défocalisée que l'on obtient reflète le diagramme de rayonnement du dipôle et son anisotropie permet de déterminer l'orientation 3D du NC.

La technique d'imagerie défocalisée est expérimentalement plus simple que les mesures de polarisation et ne nécessite pas la correction délicate des effets de dépolarisation de la lumière dans l'objectif de grande ouverture numérique. Elle peut être également combinée aisément avec les montages optiques pour la détection d'objets biologiques, ouvrant ainsi la voie à des mesures nouvelles de suivi orientationnel *in vitro* ou *in vivo*. A titre de démonstration, nous avons déterminé l'orientation d'un récepteur de la glycine marqué avec un NC unique (voir section 4 pour plus de détails). Au cours du temps, on peut repérer les orientations successives de la sonde, suggérant que le récepteur ne tourne pas vite dans la membrane (fig. 10c). Notons également qu'à position de l'objectif fixée, la mesure du rayon de la tache défocalisée permet un suivi axial de la position de l'émetteur. On dispose donc d'une méthode de suivi à six dimensions d'une sonde fluorescente.

A son détriment, cette technique d'imagerie : (i) n'est pas très rapide (temps d'acquisition $\sim 50\text{-}100$ ms), d'autant plus que le signal est réparti sur plusieurs pixels de la caméra, (ii) ne fonctionne pas pour des échantillons trop denses pour lesquels les figures défocalisées peuvent se chevaucher. Par ailleurs, elle requiert un objectif de grande qualité, sans aberration sphérique.

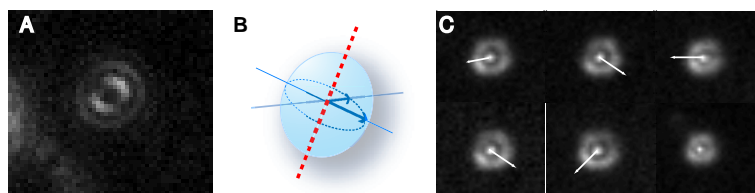


FIG. 10 – A,B : l'analyse de l'anisotropie de l'image défocalisée du NC permet la détermination de l'orientation tridimensionnelle (indiquée par l'axe en pointillé) de la nanoparticule. C : changement de l'orientation (indiquée par la flèche) d'un NC attaché à un récepteur glycine à des temps successifs (de gauche à droite et de haut en bas : 0, 4.25, 5.25, 14, 16.5 et 21.5 s).

2.4 Mesure des taux de recombinaison radiatif et non-radiatif d'un nanocristal unique

La présence d'une interface diélectrique ne modifie pas seulement le diagramme de rayonnement d'un émetteur mais aussi son taux de recombinaison radiative k_r . Nous avons tiré partie de cet effet pour mettre au point une méthode de détermination de l'efficacité quantique d'un nanocristal à l'échelle de l'objet individuel [72]. Pour cela, un nanocristal est déposé sur une lamelle de microscope et recouvert d'une fine couche de PMMA d'épaisseur connue ($d = 45 \pm 3$ nm) et d'indice ($n_{\text{PMMA}}=1.49$) semblable à celui du verre. La particule se trouve alors à la distance d d'une interface air/verre. Pour modifier les propriétés d'émission radiative, on rajoute une couche épaisse ($>200 \mu\text{m}$) de PDMS ($n_{\text{PDMS}}=1.45$). D'un point de vue optique, l'effet de cette couche est de déplacer l'interface à l'infini, de telle sorte que le NC se trouve alors dans un milieu d'indice ~ 1.5 (fig. 11a).

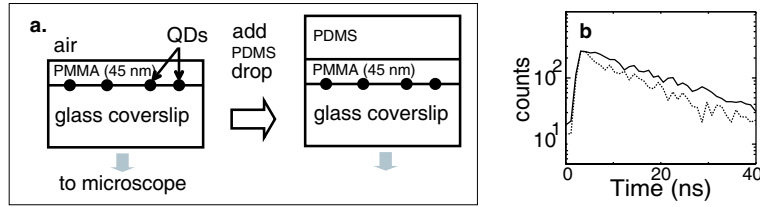


FIG. 11 – a : dépôt d'une goutte épaisse de PDMS; b : déclin de fluorescence d'un nanocristal unique avant (trait plein) et après (pointillé) le dépôt de la goutte.

Du fait de la couche protectrice de PMMA, le taux de recombinaison non-radiative k_{nr} est inchangé lorsqu'on ajoute la goutte de PDMS. A contrario, k_r est modifiée d'un facteur $\alpha = k_{\text{rad}}(d)/k_{\text{rad}}^\infty$ qui peut être calculée numériquement. α dépend non seulement de la distance d à l'interface mais également de l'orientation du nanocristal qui est obtenue expérimentalement par la méthode d'imagerie détaillée ci-dessus. Ce facteur se traduit par un changement $\beta = k(d)/k^\infty$ du taux de décroissance de la photoluminescence $k = k_r + k_{\text{nr}}$. L'expérience consiste à déterminer β en mesurant k pour un même nanocristal avant et après le dépôt de la couche de PDMS (fig. 11b et 12). Ainsi, à partir des mesures successives de :

$$\beta k^\infty = \alpha k_r^\infty + k_{\text{nr}} \quad (2)$$

$$k^\infty = k_r^\infty + k_{\text{nr}} \quad (3)$$

on déduit la valeur absolue des taux de recombinaison radiative et non radiative (calculés dans le milieu infini) ainsi que l'efficacité quantique $Q = k_r/(k_r + k_{\text{nr}})$:

$$k_r^\infty = k^\infty(\beta - 1)/(\alpha - 1) \quad (4)$$

$$k_{\text{nr}}^\infty = k^\infty(\alpha - \beta)/(\alpha - 1) \quad (5)$$

$$Q = (\beta - 1)/(\alpha - 1) \quad (6)$$

Les résultats de nos expériences indiquent que le taux de décroissance de l'état excité varie d'un facteur β entre 0.8 et 1 lorsqu'on rajoute la goutte. En corrélant la mesure de

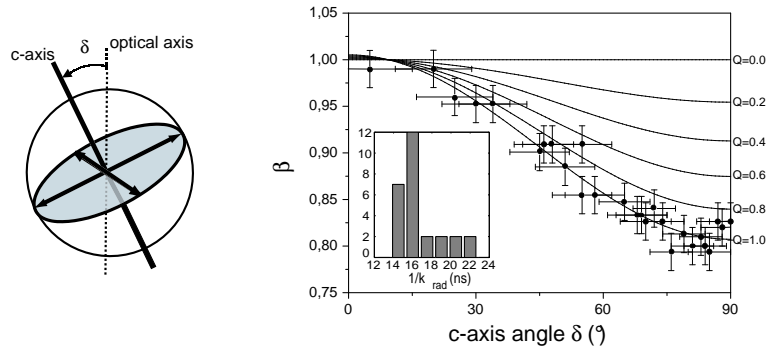


FIG. 12 – Mesure de β en fonction de l'orientation du NC repérée par δ l'angle entre l'axe optique et le c-axis.

β à la valeur de α correspondant à l'orientation de la nanoparticule, on en déduit que la durée de vie radiative $1/k_r$ est égale à 17 ± 2 ns. Les nanocristaux dans leur état allumé “on” ont de plus une efficacité quantique χ de $0.98 (\pm 0.1)$ (fig. 12). Cette valeur est bien plus grande que celle obtenue par des mesures en volume pour lesquelles χ est de l'ordre de 0.3-0.5. Cette différence est sans doute due au fait que les déterminations conventionnelles de χ ne font pas la distinction entre les particules éteintes et allumées et sous-estiment donc le rendement quantique. Cette observation illustre le rôle des expériences en molécule unique pour interpréter des mesures d'ensemble.

3 Solubilisation et fonctionnalisation des nanocristaux

3.1 Enjeux et difficultés

Les techniques de synthèse de nanocristaux semiconducteurs de CdSe/ZnS permettent aujourd'hui d'obtenir des échantillons de grande qualité (faible dispersion de taille, efficacité quantique de fluorescence élevée). Néanmoins, ces échantillons sont préparés dans des solvants organiques (tel que du butanol ou du toluène) incompatibles avec leur usage en milieu aqueux. La solubilisation et la fonctionnalisation des nanoparticules est donc une question cruciale pour les applications des NCs. De manière générale, le problème consiste à modifier la surface des particules avec des molécules qui vont : (i) assurer la dispersion dans un milieu de pH et concentration saline appropriés pour les échantillons biologiques *in vitro* et *in vivo*, (ii) maintenir les propriétés optiques des NCs et notamment leur rendement de fluorescence, (iii) permettre la fonctionnalisation ultérieure avec des molécules biologiques (protéines, acides nucléiques, ...).

Les premiers travaux sur les applications biologiques des NCs [20, 21] avaient utilisé des méthodes de solubilisation qui se sont avérées difficiles à reproduire ou peu adaptées aux expériences. Pendant plusieurs années, les recherches sur les utilisations des NCs en biologie ont été grandement affectées par la nécessité de mettre au point des techniques efficaces de solubilisation et il a fallu attendre presque 5 ans pour qu'émergent des méthodes fiables et reproductibles. De manière succincte, on peut distinguer plusieurs approches permettant en principe de résoudre le problème :

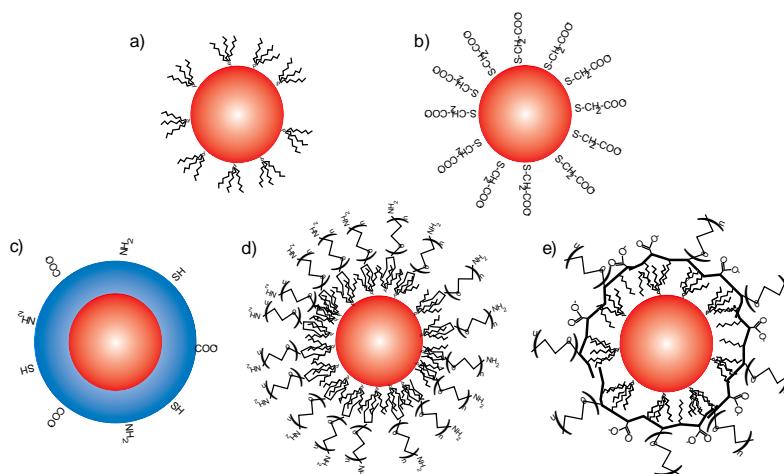


FIG. 13 – Méthodes de solubilisation des nanoparticules : a) recouvertes de molécules de TOPO en milieu organique, b) après échange de ligands de surface par un acide mercaptoalcanoïque, c) recouvertes par une coquille de silice sur laquelle se trouve des groupes réactifs, d) enrobées par une micelle de phospholipides, e) recouvertes par des polymères amphiphiles.

Echange de ligands : cela consiste à remplacer à la surface des NCs les molécules de trioctylphosphine (TOPO), qui assurent la solubilité en milieu organique, par des ligands bifonctionnels, pouvant s'accrocher d'un côté aux nanoparticules (souvent par l'intermédiaire de groupes sulfhydriles) et possédant de l'autre des groupes hydrophiles. C'est une approche que nous avons poursuivie, notamment avec l'aide d'I. Nabiev (Université de Reims). En greffant en surface des ligands tels que des acides mercaptalcanoïque [21, 73] ou la cystéine [74], on peut obtenir des nanoparticules solubles dans un milieu aqueux et fonctionnalisables (fig. 14). Leur stabilité à long terme n'est cependant pas très bonne car les ligands ont tendance à se détacher de la surface. De plus, nous n'avons jamais pu obtenir des marquages suffisamment spécifiques pour réaliser des expériences de suivi de molécules.



FIG. 14 – Migration de nanoparticules solubilisées au laboratoire avec de la cystéine dans un gel d'agarose (1%, TBE). a) déplacement au cours du temps pour un même échantillon, b) déplacement pour plusieurs échantillons correspondant à différentes couleurs d'émission.

Récemment, le groupe de S. Weiss (UCLA) a développé une méthode de solubilisation et de fonctionnalisation des NCs basées sur un échange des ligands TOPO par des peptides [75]. Dans ce cas, l'accrochage des peptides se fait grâce à une séquence adhésive contenant six cystéines. Pour plusieurs raisons discutées ci-dessous, il s'agit d'une approche extrêmement prometteuse ouvrant la voie à de multiples développements.

Coquille de silice : les molécules de TOPO sont remplacés par des mercaptosilanes que l'on fait ensuite réagir entre elles de manière à réaliser une coquille de verre autour de la nanoparticule semiconductrice [20]. Cette méthode est séduisante mais le contrôle précis de la couche de silice s'avère délicat à mettre en œuvre.

Molécules amphiphiles : c'est aujourd'hui la méthode la plus utilisée pour solubiliser efficacement des NCs semiconducteurs. Dans cette approche, les molécules de TOPO ne sont pas remplacées mais interagissent avec la partie hydrophobe de molécules amphiphiles dont la partie hydrophile est exposée vers le solvant aqueux. Deux publications ont quasi-simultanément démontré l'intérêt de cette approche : (i) en utilisant des lipides fonctionnalisés avec du PEG pour réaliser une micelle autour des NCs [76], (ii) en utilisant un polymère amphiphile qui vient réaliser une coquille "souple" autour des nanoparticules [77]. Les nanoparticules solubilisées de la sorte sont stables en milieu aqueux et peuvent être fonctionnalisés au moyen de groupes réactifs (carboxyles ou amines) présents en surface. Les produits commerciaux qui sont arrivés sur le marché à la fin de l'année 2002

[78] utilisent par exemple des polymères amphiphiles comme traitement de surface des nanoparticules. C'est grâce à de tels échantillons que nous avons pu mener avec succès les premières expériences de suivi de protéines individuelles en cellule vivante (cf. section 4).

Avec l'apparition des premières nanoparticules commerciales, nous nous sommes posés la question de la nécessité et/ou de l'intérêt de continuer des travaux sur la solubilisation de nanoparticules. Nous avons finalement décidé de poursuivre ces études pour les raisons suivantes :

- Peu d'informations sont disponibles sur les groupes chimiques présents à la surface des nanocristaux commerciaux. Ceci est un problème potentiel pour des études dans des milieux complexes tels que des cellules vivantes ou des tissus pour lesquelles il peut y avoir un grand nombre d'interactions parasites.
- Le rayon hydrodynamique des nanocristaux commerciaux atteint ou dépasse 15 nm, bien plus grand que la taille du cœur inorganique (3-5 nm). Ce sont donc des objets assez gros, ce qui est un inconvénient pour l'étude de compartiments cellulaires restreints ou des mesures intracellulaires.
- Il est difficile de contrôler précisément la stoechiométrie des couplages entre NCs commerciaux et molécules biologiques.
- De nombreux types de nanoparticules variant par leur géométrie (nanofil, nanobaton, nanoétoile) ou leur composition chimique ne sont pas disponibles sous forme fonctionnalisée alors qu'elles sont susceptibles d'avoir des applications particulières.
- Les groupes fonctionnels disponibles (streptavidine, protéine A, anticorps secondaires, ...) sont limités et ne couvrent qu'une petite partie des applications possibles.
- De manière générale, la capacité de contrôler finement les propriétés en solution de sondes telles que les NCs nous semble être une des clés essentielles dans les développements de ce domaine de recherche.

3.2 Solubilisation avec des polymères amphiphiles

En collaboration avec C. Tribet (ESPCI), nous avons utilisé un polymère amphiphile qu'il avait précédemment synthétisé pour la solubilisation de protéines membranaires [79, 80]. Ce polymère consiste en une chaîne polyacrylique (5000 MW) sur laquelle des chaînes octyles latérales ont été greffées (fig.15). La partie hydrophobe (les chaînes octyl) du polymère s'accroche aux molécules de TOPO en surface des NCs tandis les groupes carboxyles sont exposés au solvant. Ce polymère semble assez proche de celui utilisé dans les produits commerciaux [77] même si très peu d'information est disponible à ce sujet. La solubilisation se fait en mélangeant dans du chloroforme les NCs et le polymère, en évaporant le solvant organique puis en resuspendant dans un tampon aqueux.

Nous nous sommes attachés à caractériser précisément les propriétés colloïdales de ces nanoparticules en milieu aqueux à l'aide de différentes méthodes (diffusion de lumière, électrophorèse en capillaire, FPLC, microscopie électronique, ...) [81]. Après enrobage par le polymère, les mesures de diffusion de lumière indiquent que le rayon hydrodynamique R_h des NCs est de 11 à 14 nm, indépendamment de la taille des nanoparticules semiconductrices (fig. 16a). Cette valeur de R_h est proche de celle mesurée dans le cas de

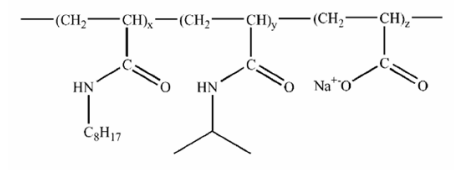


FIG. 15 – Structure du polymère amphiphile.

NCs solubilisés avec un autre polymère, le poly(maleic anhydride alt-1-tetradecene) [82]. Des mesures d'ultracentrifugation sur gradient de sucrose nous ont confirmé que ce rayon hydrodynamique était bien du à l'encapsulation d'un seul NC et non pas celle d'un petit agrégat (fig. 16c). Compte tenu de la taille du cœur de CdSe/Zns (rayon $\sim 2 - 3$ nm, mesuré en microscopie électronique) et de la couche de TOPO (~ 1 nm), l'épaisseur de la coquille de polymère hydraté est donc de l'ordre de 7 à 10 nm, bien supérieure à la valeur de 3-4 nm mesurée pour des micelles de polymères dans l'eau. Comme attendu, les NCs recouverts du polymère polyacrylique sont des objets fortement chargés à pH neutre. La mobilité, mesurée en électrophorèse en capillaire, est de l'ordre de $-30 \cdot 10^5$ cm²/V/s, avec une bonne monodispersité (fig. 16b) et peu de variation suivant la taille du coeur inorganique. Cette valeur correspond à celle de micelles de polymères en solution.

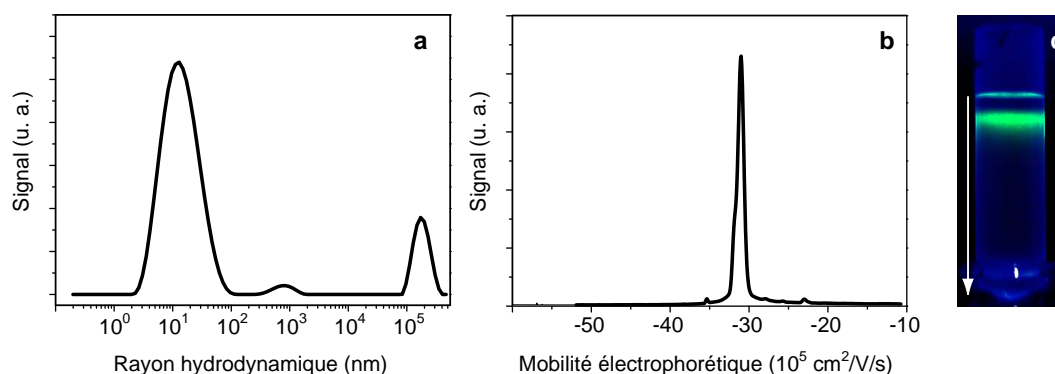


FIG. 16 – Caractérisation des propriétés colloïdales d'un échantillon de NCs solubilisés avec le polymère amphiphile. a) Mesure du rayon hydrodynamique R_h en diffusion élastique de la lumière. b) Mesure de la mobilité par électrophorèse en capillaire. c) Ultracentrifugation à 100000 g sur gradient de sucrose. Le sens de migration est indiqué par la flèche.

L'ensemble des caractérisations colloïdales indique que l'on peut obtenir par cette méthode d'enrobage des particules stables en milieu aqueux avec un très bon rendement. A l'avenir, ces préparations pourront être complétées au moyen d'un polymère greffé en plus avec des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) dans le but de réduire les interactions non spécifiques avec les milieux cellulaires. Ces nanoparticules bien contrôlées nous seront utiles pour de nombreuses mesures tant *in vitro* qu'*in vivo* mais nous savons déjà qu'elles

présentent certains inconvénients : du fait de la coquille de polymère en surface, le rayon hydrodynamique des NCs solubilisés est au moins égal à 11-12 nm. Pour des échantillons commerciaux fonctionnalisés avec de la streptavidine, R_h est encore supérieur, de l'ordre de 15 nm [83]. Comme nous le discutons à la section 4, ces tailles peuvent être une limite importante pour accéder à des compartiments cellulaires restreints (par exemple la fente synaptique) ou diffuser dans des milieux denses (tel que le cytoplasme).

3.3 Vers des sondes sélectives et fonctionnellement actives.

Avec le développement de multiples techniques pour la solubilisation et la fonctionnalisation des nanocristaux, il devient apparent qu'il n'existe sans doute pas de solution idéale, adaptée à tous les types d'expériences possibles (immunofluorescence, hybridation in situ, cytométrie de flux, puces à ADN, imagerie du petit animal...). Qu'elles soient solubilisées avec des polymères amphiphiles [77, 81, 82], des micelles de phospholipides [76], des peptides [75] ou des ligands de surface [73], les nanoparticules ont des propriétés optiques (rendement quantique, durée de vie radiative,...), colloïdales (rayon hydrodynamique, charge de surface,...) ou chimiques différentes. Suivant les problèmes abordés et les mesures réalisées, il est vraisemblable que certaines approches sont préférables à d'autres.

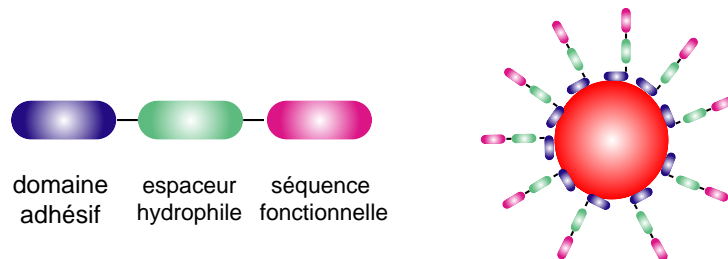


FIG. 17 – *Principe de la solubilisation avec des peptides : une séquence peptidique composé d'un domaine adhésif, d'un espaceur hydrophile et d'une séquence fonctionnelle est accrochée à la surface du nanocristal.*

Nous travaillons depuis quelques mois avec V. Marchi-Artzner et M. Baudy-Floc'h (SESO, Rennes) sur un autre type de solubilisation, basées sur le greffage de chaînes peptidiques [75]. Cette approche présente de nombreux avantages : (i) le rayon hydrodynamique des particules est plus petit ($R_h \sim 7 - 8$ nm) ; (ii) la chimie des peptides est très variée et offre de nombreuses possibilités ; (iii) il est possible d'incorporer des séquences peptidiques fonctionnelles dès la phase de solubilisation. Il s'agit là d'une voie particulièrement intéressante dont on peut attendre de nombreux développements à l'avenir. Comme première étape, nous développons actuellement une technique de marquage des séquences polyhistidines avec des nanocristaux, complémentaire de ce qu'il est possible de réaliser avec des marqueurs organiques [84]. Pour cela, on utilise une séquence peptidique terminée par un acide aminé artificiel (aza- β^3 -asp) susceptible de se lier aux his-tag en présence

de Ni [85]. Si cette approche est fructueuse, elle permettra notamment de marquer des protéines avec une petite sonde, sans nécessiter un anticorps.

4 Dynamique cellulaire à l'échelle de la molécule unique

Nous commençons par présenter dans la section 4.1 les techniques d'imagerie de nanocristaux en milieu vivant et du suivi de molécules individuelles avant d'en discuter leurs applications dans les sections 4.2, 4.3 et 4.4.

4.1 Suivi de molécules individuelles en milieu vivant avec des nanocristaux semiconducteurs

Depuis la fin des années 80, plusieurs laboratoires, dont ceux de M. Sheetz, A. Kusumi et K. Jacobson, ont contribué au développement des techniques dites de *suivi de particule unique*. Dans ces expériences, les molécules sont repérées dans la membrane au moyen de nanoparticules d'or de 40 nm ou d'une bille de latex de 0.5 à 1 μm que l'on observe en microscopie à contraste interférentiel. Ces techniques ont permis d'obtenir de nombreux résultats sur la dynamique dans la membrane [86]. Elles ont notamment révélé une grande diversité de comportements membranaires des protéines et des lipides (diffusion brownienne, anormale ou confinée, mouvements dirigés,...) et amené à des révisions du modèle de "mosaïque fluide" introduit par Singer et Nicolson [88]. D'un point de vue expérimental, l'utilisation de marqueurs bien plus gros que les protéines étudiées soulève cependant certaines difficultés, tel que le contrôle de la stœchiométrie du couplage ou des phénomènes d'agrégation des protéines induits par la sonde.

Avec le développement dans les années 90 des études en fluorescence de molécules biologiques individuelles *in vitro* [9], il devenait tentant d'étendre les méthodes de suivi de particule au cas de petites sondes. Par rapport à la détection d'une molécule en solution, la tâche est *a priori* rendue plus complexe par la présence d'un environnement cellulaire autofluorescent. Des premières expériences ont néanmoins démontré qu'il était possible de détecter une molécule marquée par une sonde unique, que cela soit un fluorophore [89, 90, 91] ou une protéine fluorescente [92]. Ces mesures étaient néanmoins limitées par un rapport signal sur bruit assez faible et surtout par le temps de photodestruction de la sonde (10 – 500 ms pour la GFP, 1 – 10 s pour les fluorophores organiques) ce qui était l'une des motivations principales pour l'utilisation de nanocristaux semiconducteurs.

Le tableau 1 rassemble un ensemble de paramètres liés aux différentes sondes et à leur intérêt pour l'étude de molécules uniques en milieu vivant. Nous avons distingué ici : (i) la taille de la sonde, susceptible d'induire une gêne stérique, (ii) les caractéristiques optiques telles que la photostabilité et la "brillance" correspondant à la valeur du coefficient d'extinction (en $\text{M}^{-1}.\text{l}.\text{cm}^{-1}$), (iii) la stœchiométrie du couplage, c'est à dire la capacité de cibler spécifiquement une et une seule molécule. Ce choix de paramètres, en partie arbitraire, se concentre sur les critères importants pour l'imagerie de la dynamique cellulaire. A ce titre il ne prend pas en compte d'autres aspects tel que, par exemple, la possibilité de manipuler les billes de latex pour appliquer ainsi des forces ou/et en contrôler la position.

Les premières expériences de suivi de molécules uniques avec des nanocristaux ont été réalisées sur le récepteur de la glycine. Nous en présentons ici les méthodes de marquage et de détection et réservons pour la section 4.2 la discussion des questions de biologie et

sonde	taille	photostabilité	brillance	stœchiométrie
fluorophore organique (cy3, cy5,...) [89, 90, 91]	+++ 1 nm	+ 1-10 s	+ $\epsilon \sim 10^5$	++
protéine fluorescente (GFP, YFP,...) [92]	++ 2-4 nm	- 10-500 ms	+ $\epsilon \sim 10^4$	+++
nanocristal semiconducteur [93]	+ 10-30 nm	++ > 20 nm	++ $\epsilon \sim 10^6$	+ / ++
nanoparticule métallique [86]	- ≥ 40 nm	+++ lumière diffusée	++	+
bille latex [86]	- > 500 nm	+++ lumière diffusée	+++	-

TAB. 1 – *Propriétés de différentes sondes pour les mesures de molécules uniques en milieu vivant.*

de biophysique liées à la dynamique membranaire du récepteur.

Les récepteurs ont été marqués en utilisant une construction moléculaire consistant en un anticorps monoclonal spécifique de la sous-unité $\alpha 1$, un fragment Fab anti-mouse biotinilé et un NC commercial fonctionnalisé avec de la streptavidine (QD605sav) (fig. 18). En réduisant prgressivement la densité du marquage, on visualise alors des nanocristaux individuels dans la membrane cellulaire. La détection est réalisée au moyen d'un microscope en épifluorescence conventionnel équipé d'un objectif de grande ouverture numérique (Olympus, 60X, NA 1.45) et d'une caméra CCD (Micromax EBFT ou CoolSnap ES, Roper Scientific) (fig. 19). Les nanoparticules individuelles sont identifiées par le scintillement de leur fluorescence. Ce critère n'est pas entièrement satisfaisant car le scintillement va persister pour un petit nombre de NCs agrégés qui ne seront donc pas immédiatement distinguable d'une nanoparticule unique. Un critère plus absolu consisterait à mesurer le dégroupement de la fluorescence mais ceci reste très difficilement réalisable pour des objets en mouvement.

Pour un émetteur fluorescent non saturé, le nombre Γ de photons émis par unité de temps varie comme :

$$\Gamma = \alpha \chi \frac{\lambda \sigma}{hc} I \quad (7)$$

où λ est la longueur d'onde d'excitation, σ la section efficace d'absorbtion², I l'intensité d'excitation par unité de surface, χ le rendement quantique de fluorescence et α l'efficacité de collection. Pour un temps d'intégration t , le signal S collecté est égal à Γt . Le bruit B , lui, résulte de plusieurs processus indépendants : (i) le bruit de photon du signal, (ii) le bruit de fond du à l'autofluorescence du milieu cellulaire ou à de la lumière diffusée parasite, (iii) le bruit de lecture de la caméra, (iv) le bruit d'obscurité du détecteur. D'un

²qui est équivalente au coefficient d'extinction : $\epsilon = (N_A/2303)\sigma$ où N_A est le nombre d'Avogadro et σ est exprimé en cm^2 .

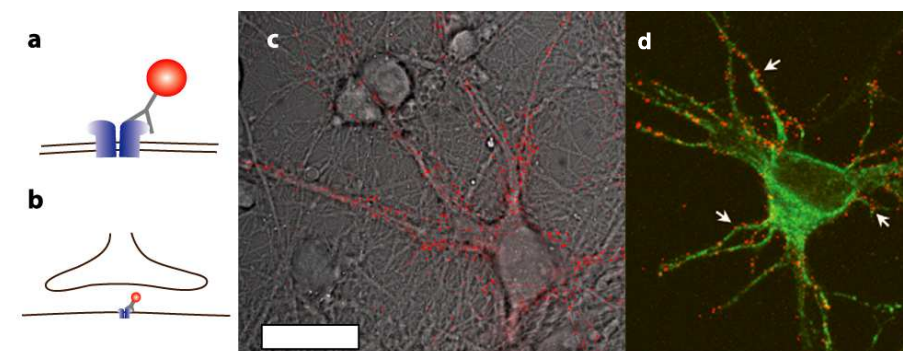


FIG. 18 – Marquage du récepteur glycine : a) les récepteurs sont marqués par un nanocrystal par l'intermédiaire d'un anticorps. b) Grâce à leur petite taille, les nanocristaux permettent de suivre le mouvement des récepteurs à l'intérieur de la fente synaptique (épaisseur 40 nm). c) Superposition d'une image en transmission d'un neurone et de l'image en fluorescence des récepteurs (rouge), situés essentiellement le long des dendrites (barre d'échelle : 20 μm). d) Récepteurs de la glycine marqués avec des NCs (rouge) détectés sur le compartiment somato-dendritique identifié par la protéine MAP-2 (en vert).

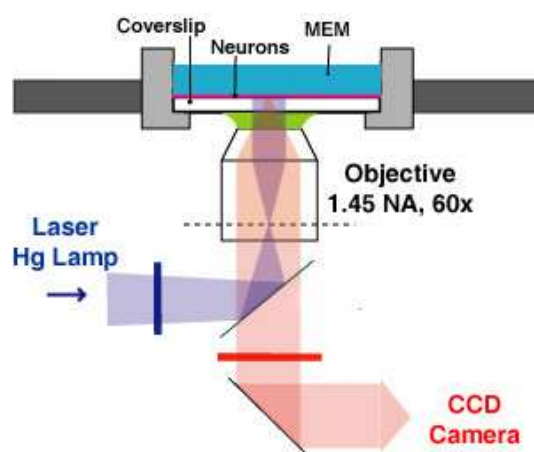


FIG. 19 – Montage pour l'imagerie de récepteurs de la glycine marqués avec des nanocristaux.

point de vue général, le rapport signal à bruit est défini par :

$$\frac{S}{B} = \frac{\Gamma t}{\sqrt{\sum_i \sigma_i^2}} \quad (8)$$

où les σ_i correspondent aux écarts quadratiques des fluctuations pour les différents processus de bruit.

Dans le cas des récepteurs de la glycine marqués avec des nanocristaux, la situation est particulièrement favorable pour deux raisons principales : (i) l'autofluorescence dans les dendrites est faible et les quelques sources d'autofluorescence tendent de plus à être rapidement photodétruites, (ii) le signal est important car le coefficient d'extinction des NCs est élevé ($\epsilon \sim 10^6$, comparé à environ 10^5 pour des fluorophores à la même longueur d'onde). Si l'on dispose d'une caméra de bonne qualité, pour laquelle le bruit de lecture est faible et le bruit noir négligeable dès que l'on utilise des temps d'acquisition suffisamment courts (typiquement inférieurs à la seconde), on atteint alors la limite de détection du système optique pour laquelle le rapport S/B , déterminé par le bruit de photon, est égal à \sqrt{S} .

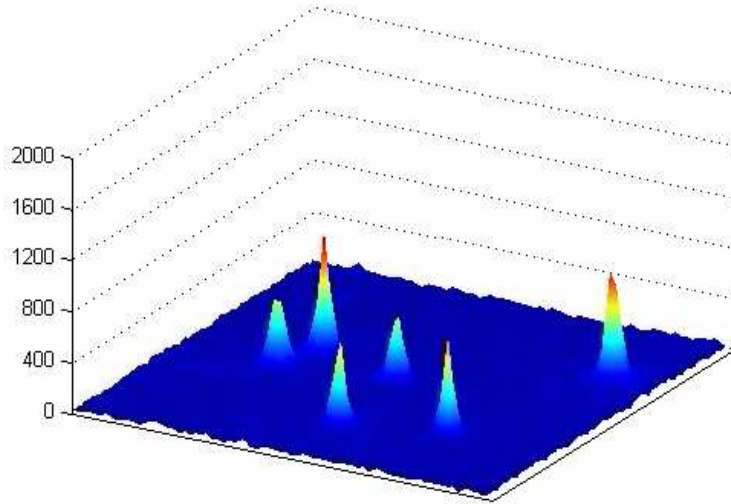


FIG. 20 – Visualisation en 3D du signal de fluorescence de récepteurs de la glycine individuels marqués par des nanocristaux.

En pratique, la valeur élevée du coefficient d'extinction a plusieurs conséquences. En premier lieu, les expériences peuvent être réalisées en excitant les sondes fluorescentes avec une lampe à mercure au lieu d'un laser. Ceci est une simplification à la fois instrumentale et pour la prise de données car la lampe permet d'avoir un profil spatial d'excitation uniforme sur des zones de $\sim 200 \times 200 \mu\text{m}^2$ tandis qu'avec un laser, on est le plus souvent souvent restreint à des zones de $\sim 30 \times 30 \mu\text{m}^2$ pour lesquelles on a à la fois un profil d'excitation transverse gaussien et des effets de speckle. Par ailleurs, l'observation de nanocristaux individuels est aisément réalisable à l'œil, ce qui facilite la mise au point du microscope.

En terme de dynamique temporelle, les enregistrements des mouvements de récepteurs ont été réalisés pendant des durées totales allant jusqu'à plusieurs dizaines de minutes [93], avec des résolutions temporelles variant entre quelques millisecondes et une seconde. Pour un temps caractéristique d'acquisition des images de 75 ms, le rapport signal à bruit est de l'ordre de 50, ce qui permet de localiser les récepteurs avec une précision d'environ 10 nm [94], comparable à ce qui est obtenu avec des billes et environ quatre fois plus petite que ce qui est réalisé avec un fluorophore en cellule vivante. En optimisant certains paramètres de l'expérience (longueur d'onde d'excitation, filtre optique, temps d'intégration, ...) il nous semble tout à fait réalisable d'atteindre *in vivo* la résolution du nanomètre tel que cela a été démontré récemment *in vitro* [95].

Nos résultats, qui ouvrent la voie à de nombreuses expériences, sont une illustration du rôle que peuvent jouer les nanomatériaux dans la détection et l'imagerie biologique. Grâce à l'avancée technologique que représentent les nanocristaux, la dynamique de nombreux processus biologiques peut maintenant être étudiée à une échelle moléculaire. Ces expériences ne nécessitent pas une instrumentation très avancée et peuvent être réalisées avec des microscopes de fluorescence standard, disponibles dans de nombreux laboratoires. Nous terminons cette section en discutant quelques aspects techniques supplémentaires de l'imagerie en milieu vivant avec des nanocristaux.

Imagerie en microscopie électronique

Les nanocristaux sont des particules présentant un contraste en microscopie électronique, ce qui est fréquemment utilisé pour caractériser la taille et la structure des échantillons après synthèse organique mais n'avait jamais été exploité dans des milieux biologiques. Les nanoparticules de CdSe/ZnS offrent toutefois un contraste moins grand que les particules d'or et leur détection dans des cellules n'est pas aussi aisée que lorsqu'elles sont isolées sur des grilles de carbone. Nous avons été amené à recourir à une méthode d'amplification argentique consistant à faire croître une couche d'argent de 10-20 nm sur les nanocristaux, augmentant ainsi largement le contraste. Nous avons pu de la sorte observer des récepteurs dans différents domaines membranaires (fig. 21) et conforter nos observations de vidéomicroscopie.

Ces méthodes, rendues notamment possibles grâce au savoir-faire de P. Rostaing dans le laboratoire d'A. Triller, sont un apport technique important qui devrait trouver de nombreuses applications en biologie cellulaire. Grâce à une seule et même sonde, on peut enregistrer la dynamique par des mesures optiques de fluorescence et repérer en microscopie électronique la localisation ultrastructurale des molécules marquées.

Suivi automatique d'objets

De manière générale, le suivi d'objets est un problème central dans les expériences de dynamique cellulaire en vidéomicroscopie. De nombreuses méthodes sont développées pour faciliter l'analyse des mouvements à l'échelle de molécules, vésicules ou de cellules entières. Dès les premiers résultats expérimentaux sur le suivi de protéines membranaires

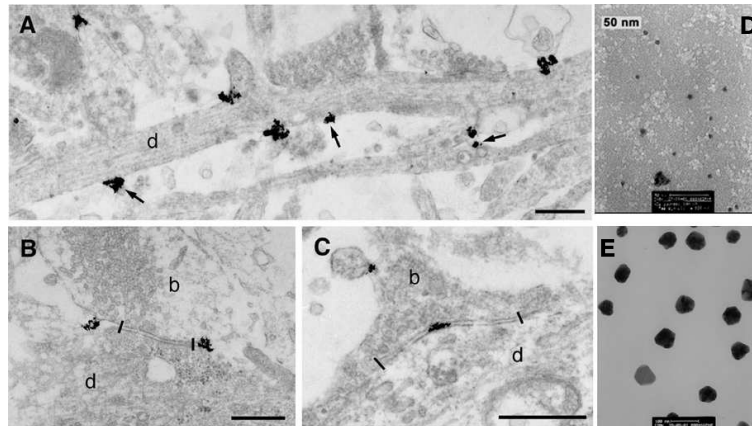


FIG. 21 – Images en microscopie électronique à transmission de récepteurs : A) extrasynaptiques, B) en bord de synapses, C) à l'intérieur d'une synapse. Images de nanoparticules déposées sur une grille de carbone avant (D) et après (E) amplification argentique.

avec des nanocristaux, il est apparu que le traitement des données posait des problèmes complexes et que l'analyse des trajectoires était un enjeu très important.

En pratique, dans nos expériences de suivi de molécules, on accumule des séquences de 500 à 1000 images et l'on cherche à reconstruire les trajectoires des objets (en général entre 5 et 20) qui sont simultanément présents dans le champ. Dans le cas des nanocristaux, le signal a la particularité de scintiller de telle sorte que les molécules peuvent temporairement disparaître et réapparaître. Il est donc nécessaire de développer des méthodes prenant en compte ces spécificités.

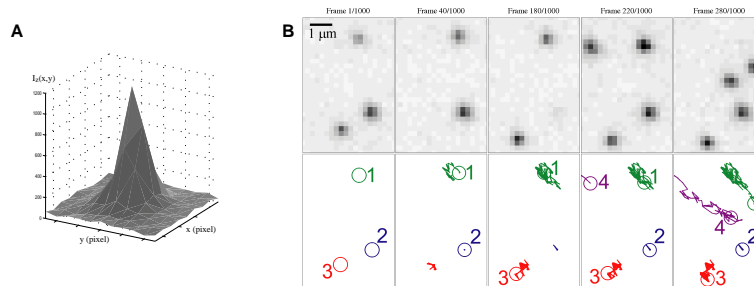


FIG. 22 – A : profil d'un point fluorescent. B : Exemples de suivi de trajectoires en tenant compte du scintillement des sondes.

Ces difficultés nous ont amené à collaborer avec L. Cohen (Ceremade, Université Dauphine), un spécialiste des questions de traitement d'images. Stéphane Bonneau, un étudiant en thèse au Cérémade passant plusieurs jours par semaine dans notre équipe, a implémenté une méthode de reconstruction de trajectoire [96]. L'analyse peut être décomposée en deux étapes : (i) une phase de détection et de segmentation dans laquelle on repère les molécules, (ii) une phase d'association où l'on raccorde les points entre eux. Du fait du bon rapport signal à bruit, la phase de détection ne nécessite pas de techniques particulières. On analyse les données *plan par plan* et, pour chacun d'eux, les points lumineux

dans l'image sont localisés en les comparant par corrélation à une image référence correspondant à la réponse impulsionnelle du microscope (fig. 22a). Les trajectoires sont alors reconstruites par une hypothèse de plus proche voisin. Lors d'un événement d'extinction, on suppose de plus que la particule suit une trajectoire brownienne jusqu'au rallumage du nanocristal (fig. 22b). A cause de l'hétérogénéité des mouvements, le coefficient de diffusion D ne peut être estimé à l'avance mais est déduit de la partie antérieure de la trajectoire. Cette approche est assez rapide et peut potentiellement fonctionner en temps réel. Elle présente néanmoins l'inconvénient de nécessiter des hypothèses sur la nature du mouvement (diffusif, confiné, dirigé, ...) et ne prend pas bien en compte les fluctuations d'intensité caractéristiques des mesures de molécules uniques.

Plus récemment, nous avons été amené à considérer une nouvelle méthode basée sur l'utilisation de "chemins minimaux", introduits par L. Cohen pour d'autres applications [97]. Nous n'en présentons ici que le principe général (fig. 23). Dans cette approche, une séquence d'images n'est pas analysée image par image mais est traitée de manière globale comme un espace tridimensionnel (2D + temps) au sein duquel chaque trajectoire correspond à une ligne [98]. L'algorithme se décompose en deux parties : dans une première phase, on détecte (après filtrage et seuillage) un ensemble de points. L'association de ces points est réalisée par une méthode variationnelle conceptuellement analogue au calcul par le principe de Fermat des trajectoires des rayons lumineux dans un milieu d'indice optique variable. Dans notre cas, on relie les points en calculant les géodésiques qui les rejoignent dans une métrique déterminée par l'intensité lumineuse. En pratique, on détermine les chemins \mathcal{C} qui minimisent l'intégrale :

$$E(\mathcal{C}) = \int_{\mathcal{C}} \{w + P(\mathcal{C}(s))\} ds \quad (9)$$

où s représente l'abscisse curviligne, w un paramètre de régularisation et $P(x, y, z) = 1/(1 + I(x, y, z))$ un potentiel qui prend sa valeur minimale lorsque l'intensité de l'image I est élevée.

L'algorithme, plus complexe que celui de reconstruction plan par plan, a été implémenté et son fonctionnement validé. Il est actuellement testé sur des films synthétiques et des données expérimentales. Signalons déjà que dans cette approche : (i) les hypothèses requises sur la dynamique des molécules sont plus souples, (ii) la méthode tient compte des variations d'amplitude du signal de la sonde ce qui est important dans le cas des NCs dont les fluctuations d'intensité sont déterminés par des lois de Lévy (section 2), (iii) on est moins sensible au problème des fausses détections que dans une approche image par image.

Imagerie par fenêtre temporelle

Les données présentées ici ne sont pas directement reliées aux expériences de suivi de molécules uniques et ont été prises au cours de mon séjour post-doctoral. Elles illustrent néanmoins un aspect intéressant de l'imagerie biologique avec des nanocristaux qui n'a encore été que rarement mis à profit. Comme indiqué dans la section 2.4, les nanocristaux

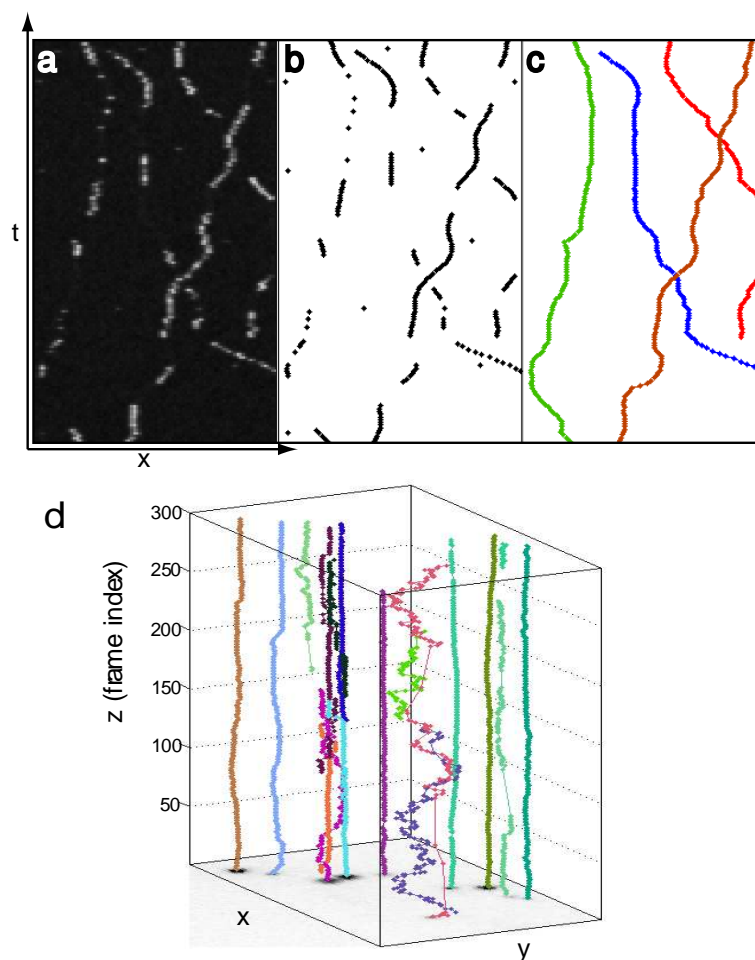


FIG. 23 – *Reconstruction des trajectoires avec des chemins minimaux. a) Données simulées pour des trajectoires 1D. b) Points détectés. c) Trajectoires reconstruites. d) Trajectoires obtenues avec des données expérimentales.*

ont des durées de vie radiative de l'ordre 20 ns, bien plus longue que celle des fluorophores ($\sim 1-5$ ns) ou que celle des signaux d'autofluorescence cellulaire ($\sim 1-5$ ns). Il est donc possible de réaliser simplement une imagerie avec fenêtre temporelle, en ne conservant que les photons détectés après un certain délai et s'affranchissant de nombreuses sources de bruit. Cette possibilité est illustré dans la fig. 24 sur une mesure de nanocristaux incorporés par endocytose dans des cellules COS [99] : en appliquant une fenêtre temporelle à la détection, on élimine l'intégralité du bruit de fond. A son détriment, l'imagerie de nanocristaux par fenêtre temporelle en milieu vivant nécessite un équipement important (laser en impulsion, pulse picker, ...) et ne permet pas des acquisitions rapides. Il s'agit néanmoins d'une technique intéressante pour la détection dans des milieux optiquement très bruités tels que les tissus ou les petits animaux.

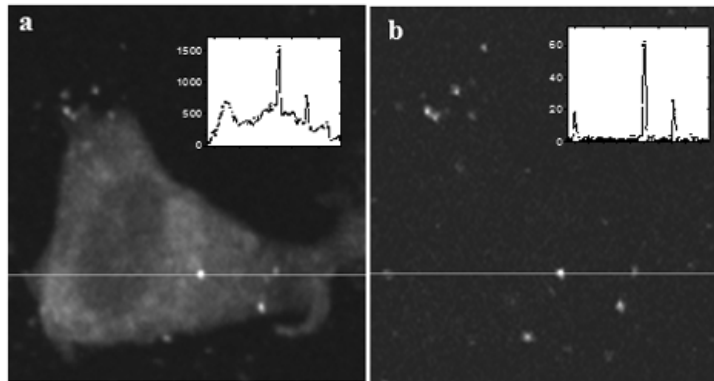


FIG. 24 – Imagerie avec fenêtre temporelle avec des nanocristaux. a) image d'une cellule COS contenant des nanocristaux incorporés par endocytose. b) image après sélection des photons détectés dans une fenêtre temporelle (30 à 60 ns après l'excitation). Les graphes en insert correspondent au signal le long de la ligne en blanc.

4.2 Diffusion membranaire du récepteur de la glycine.

Nous avons démarré l'étude de la dynamique de récepteurs aux neurotransmetteurs à l'automne 2000 dans le cadre d'une collaboration active entre notre équipe et le laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse Normale et Pathologique d'Antoine Triller (Département de Biologie de l'ENS, Inserm UR497). Le travail a porté plus précisément sur la diffusion dans la membrane neuronale du récepteur de la glycine qui, avec le récepteur du GABA (Gamma Amino Butyric Acid), est responsable de l'inhibition synaptique des motoneurons dans la moelle épinière [100]. Après avoir été inséré dans la membrane, ce récepteur-canal diffuse dans le plan de celle-ci et peut se localiser en face des contacts synaptiques par un mécanisme de diffusion-capture (fig. 25). Il est alors stabilisé par une protéine d'ancrage (géphyrine) et il s'établit un équilibre dynamique entre la forme libre et la forme stabilisée [101]. Notre but initial était de d'étudier cet équilibre ainsi que les mécanismes qui le contrôlent, en précisant notamment le rôle de l'environnement membranaire et de la géphyrine.

Des expériences menées précédemment en collaboration entre les laboratoires de D. Choquet et A. Triller avaient déjà porté sur la dynamique du récepteur glycine visualisé au moyen d'une bille de latex de $0.5 \mu\text{m}$ [102]. Elles avaient permis de mettre en évidence certains aspects de la dynamique membranaire mais souffraient de plusieurs limitations : (i) les mesures concernaient le mouvement d'un récepteur transfecté et non pas du récepteur endogène, (ii) les billes s'accrochent à un grand nombre de récepteur et il est difficile d'accéder à la dynamique individuelle, (iii) du fait de taille des billes, il n'est pas possible d'accéder à l'intérieur de la fente synaptique dont l'épaisseur est de l'ordre de 40 nm.

Pour toutes ces raisons, l'utilisation de nanocristaux semiconducteurs apparaissait comme une solution prometteuse, susceptible de surmonter ces limitations. Pendant longtemps la principale difficulté a été d'obtenir des marquages spécifiques avec les NCs ce

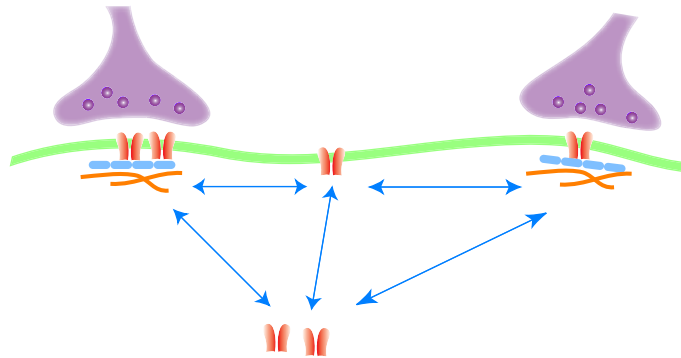


FIG. 25 – *Dynamique du récepteur glycine : dans la membrane neuronale le récepteur alterne entre des états extrasynaptiques et synaptiques pour lesquels il est stabilisé par la géphyrine, elle-même liée aux microtubules. Le récepteur peut également transiter entre le cytoplasme et la membrane par des voies d'endocytose/exocytose.*

qui nous a amené à réaliser également des mesures avec des fluorophores individuels (Cy3). Depuis la fin de l'année 2002, nous sommes capables de suivre en molécule unique le mouvement de récepteurs endogènes marqués avec des nanocristaux. Les premières mesures ont été réalisées par Sabine Lévi (chercheuse dans le laboratoire d'A.Triller) et moi-même. Le fait que des membres des deux laboratoires aient directement travaillé ensemble a été un élément décisif dans le succès des expériences.

Résultats obtenus

Les expériences sur le suivi du récepteur glycine nous ont permis d'obtenir des résultats importants au-delà de la seule mise au point des techniques d'imagerie de nanocristaux individuels en milieu vivant. L'observation la plus nette dès les premières mesures a été la grande diversité des comportements des récepteurs. En enregistrant des séquences d'images de 30 s à 1 mn sur des champs de vue contenant de 10 à 20 récepteurs en général, on constate que certains récepteurs sont relativement immobiles tandis que d'autres explorent de larges zones dans la membrane. L'enregistrement des mouvements dans la membrane pendant de telles durées nous a permis de visualiser des événements importants tels que des entrées ou des sorties de synapse. Comme illustré dans la fig. 26, un récepteur peut par diffusion atteindre une zone synaptique où il interagit vraisemblablement avec la géphyrine et est stabilisé. Nous avons également observé le processus inverse pour lequel le récepteur semble se détacher de la protéine d'ancrage et quitte la synapse. De telles mesures fournissent une preuve très directe de l'équilibre membranaire entre récepteurs endogènes synaptiques et extra-synaptiques. Il est à noter que ces processus d'entrée/sortie ont lieu sur des échelles de temps de plusieurs dizaines de secondes et sont donc difficiles à appréhender avec des sondes moins stables.

Afin de caractériser quantitativement le mouvement des protéines, nous avons analysé les trajectoires en fonction de la localisation membranaire avec la fonction de déplacement quadratique moyen $\rho(t)$ pour chaque trajectoire $(x(i\Delta t), y(i\Delta t))_i$ (avec Δt la durée d'ac-

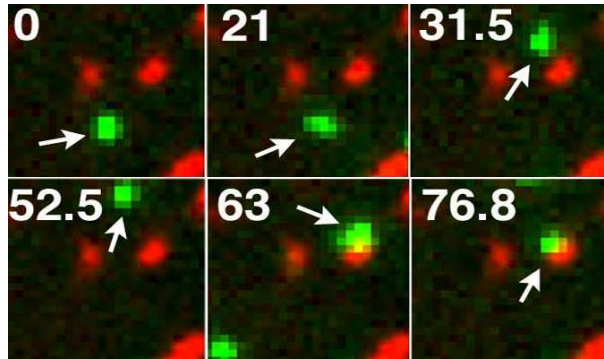


FIG. 26 – Images extraites d'un film montrant le mouvement d'un récepteur dans la membrane. Le spot vert (indiqué par la flèche) correspond à la fluorescence d'un nanocrystal unique tandis que les synapses sont repérés à l'aide d'un autre marqueur (FM4-64, rouge). Les chiffres correspondent au temps d'acquisition (en seconde). On observe ici un exemple d'entrée d'un récepteur dans une synapse.

quisition par image) [86, 87]. Cet outil, très couramment utilisé pour traiter les données en suivi de molécule ou de particule unique, consiste à déterminer :

$$\rho(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} [(x((i+n)\Delta t) - x(i\Delta t))^2 + (y((i+n)\Delta t) - y(i\Delta t))^2] \quad (10)$$

pour n variant entre 0 et N , le nombre de points total dans la trajectoire. La dépendance temporelle de $\rho(t)$ est une indication de la nature du mouvement (table 2). L'ajustement de la pente à l'origine de $\rho(t)$ permet toutefois de déterminer la valeur du coefficient de diffusion instantanée D , indépendamment de la nature du mouvement aux échelles de temps plus longues. En pratique cet ajustement est réalisé sur les 4 ou 5 premiers points de la courbe.

$\rho(t)$	mouvement
$4Dt$	diffusion brownienne
$4Dt^\alpha$ ($\alpha < 1$)	diffusion anormale
$4Dt + v^2t^2$	dirigé avec diffusion
$L^2(1 - e^{-4Dt/L^2})$	confiné

TAB. 2 – Nature du mouvement en fonction de la dépendance temporelle de $\rho(t)$.

Dans un premier temps, nous avons analysé la dynamique sur des trajectoires assez courtes, pour lesquelles on n'observe pas de changements de domaines membranaires. La figure 27a contient les résultats sur les distributions des coefficients de diffusion, dans les compartiments synaptiques ou extrasynaptiques³. On observe un décalage significatif entre les deux distributions avec des valeurs médianes respectives de $1.8 \cdot 10^{-3}$ et $3.6 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

³Nous avons initialement considéré un troisième domaine membranaire, le compartiment *périsynap-*

pour les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques. Les distributions font cependant apparaître une grande hétérogénéité de comportements et s'étendent sur plusieurs ordres de grandeur. À titre de comparaison, Les mesures réalisées par S. Lévi sur la diffusion membranaire de la protéine NCAM (qui n'interagit pas avec les protéines de l'échaffaudage synaptique) donnent des résultats bien plus homogènes avec des coefficients de diffusion de l'ordre de $10^{-1} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Ceci suggère fortement que la dispersion des mesures dans le cas du récepteur glycine reflète des interactions avec d'autres composants membranaires ou sous-membranaires.

La mesure des coefficient de diffusion instantanée a été complété par la caractérisation des mouvements sur des échelles de temps plus longues. Pour cela, les courbes de déplacements quadratiques sont moyennés entre elles, laissant apparaître deux comportements distincts. À l'extérieur de la synapse, les récepteurs ont un comportement essentiellement brownien (fig. 27b) tandis qu'à l'intérieur de la synapse, ils diffusent (plus lentement) et sont confinés dans une zone d'extension $\sim 150\text{-}200$ nm, compatible avec la taille d'un bouton synaptique (fig. 27c).

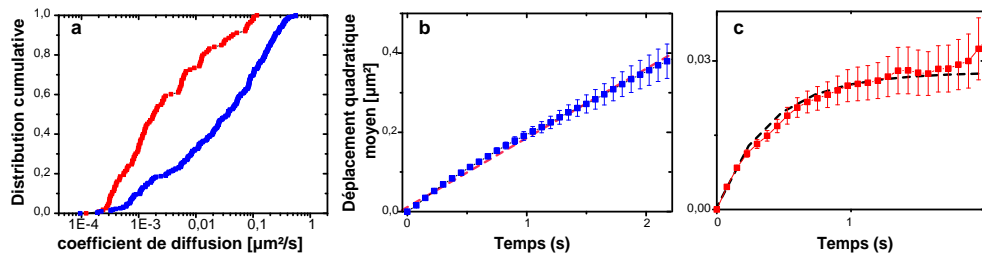


FIG. 27 – a) Distributions cumulatives des coefficients de diffusion pour les récepteurs dans l'état extra-synaptique (en bleu) et synaptique (en rouge). Déplacement quadratique moyen moyenné sur des trajectoires : b) extrasynaptiques et c) synaptiques.

Nous avons également cherché à obtenir une preuve directe que les récepteurs marqués, en dépit de la construction moléculaire anticorps/fragment Fab/NC, pouvaient accéder à l'intérieur de la fente synaptique. La réponse la plus convaincante a été fournie par les mesures de microscopie électronique (fig. 21) : après amplification argentique des NCs, les récepteurs marqués ont pu être localisés dans différents domaines membranaires et notamment dans la synapse. Par ailleurs, nous avons souhaité nous assurer que le mouvement des récepteurs n'était pas influencé par la sonde à laquelle ils sont liés. Pour cela, les mesures de diffusion de récepteurs ont été comparées dans le cas d'un marquage : (i) avec les NCs, (ii) avec un anticorps primaire couplé à un colorant Cy3, (iii) avec un fragment Fab de l'anticorps marqué avec un colorant. Nous n'avons pas obtenu de différences significatives dans les distributions de coefficient de diffusion [93]. À l'extérieur de la synapse,

consistant en une zone de 400 nm autour de la synapse (identifiée par le marqueur FM) [93]. La définition de ce compartiment était justifié par l'observation de comportement dynamique différent de ceux observés dans la synapse. Néanmoins, afin de ne pas rajouter une complexité trop grande dans l'analyse de la diffusion membranaire, c'est une distinction que nous avons (au moins provisoirement) écarté. Dans la suite de ce manuscrit, seuls des domaines synaptiques et extra-synaptiques sont pris en compte.

ce résultat n'est pas très surprenant car il est connu que la viscosité de la membrane, bien plus grande que celle du milieu extracellulaire, détermine le coefficient de diffusion mesuré tant que la sonde a une taille inférieure au micron⁴. Dans le cas du compartiment synaptique, il est sûrement plus étonnant que la taille de la sonde n'affecte pas le mouvement tant la fente synaptique est un espace dense en protéines⁵. Il est possible que les valeurs mesurées ne représentent qu'une borne inférieure pour les coefficients de diffusion.

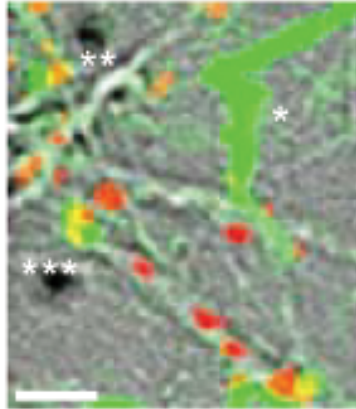


FIG. 28 – *Dynamique de récepteurs glycine sur une durée de 20 minutes. L'ensemble de la séquence (1200 images) est superposée, avec les récepteurs en vert et les marqueurs synaptiques en rouge. Trois exemples de comportement sont illustrés : (*) un récepteur extrasynaptique explore une grande zone dans la membrane, (**) un récepteur reste confiné dans une synapse, (***) un récepteur entre et sort d'une zone synaptique.*

Ce travail sur le récepteur glycine a été complété par une description qualitative de la dynamique d'équilibre du récepteur. Pour cela, on ne se focalise plus sur les propriétés de diffusion locale mais sur la localisation du récepteur. L'acquisition des séquences d'images a été réalisée en "time-lapse", au rythme d'une image de 75 ms toutes les secondes pendant 20 à 40 minutes, afin d'éviter une illumination en continue des cellules. Ces données confirment les observations faites précédemment à haute cadence d'acquisition : les récepteurs restent en mouvement dans la membrane et échangent entre différents domaines. Une étude un peu plus quantitative ne nous a pas permis de déterminer les temps de résidence mais suggère que dans nos conditions d'expériences, les populations des récepteurs dans les différents compartiments membranaires sont à l'équilibre [93].

⁴Pour un système récepteur-sonde, le coefficient de diffusion D vaut à kT/γ où le coefficient de friction γ est égal à $\gamma_m + \gamma_{\text{sonde}}$ avec γ_m la friction dans la membrane et γ_{sonde} la friction de la sonde dans le milieu extracellulaire (de viscosité η). Pour un objet sphérique de rayon a , $\gamma_{\text{sonde}} = 6\pi\eta a$ est négligeable devant $\gamma_m \sim 10^{-8}\text{kg/s}$ lorsque $a \leq 1\mu\text{m}$.

⁵Dans le cas de la synapse excitatrice, il a d'ailleurs été observé un effet de ralentissement de la diffusion des récepteurs AMPA du à la taille du NC [105].

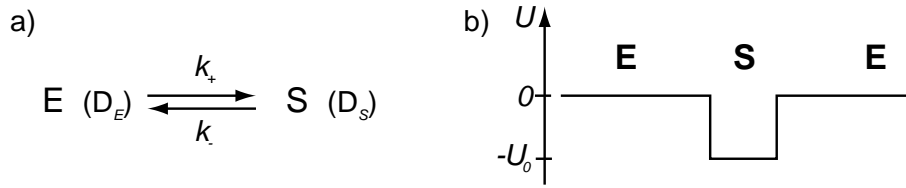


FIG. 29 – Schéma de la dynamique membranaire. a) Equilibre entre deux états synaptique S et extrasynaptique E . b) Valeur du potentiel d'interaction U en fonction de la localisation membranaire.

Perspectives

Les travaux menés tant sur les récepteurs inhibiteurs glycine [93, 102] et GABA (C. Schweizer, travail en cours) que les récepteurs excitateurs AMPA et NMDA [103, 104, 105] pointent tous vers une description comparable de la dynamique membranaire des récepteurs aux neurotransmetteurs (fig. 25) : les récepteurs interagissent de manière temporaire avec des protéines d'ancrage au niveau de la synapse et transitent entre des états synaptiques S et extrasynaptiques E . Dans cette description, l'accumulation des récepteurs à la synapse, observable dans les expériences d'immunofluorescence conventionnelles, résulte d'un équilibre entre les deux populations qui est susceptible d'être déplacé lors des mécanismes de plasticité.

De manière schématique, ce comportement peut être décrit comme celui d'un système à deux états E et S (fig. 29). Ces états sont caractérisés par un coefficient de diffusion D_E et D_S dépendant de la composition de la membrane dans chacun des domaines. De plus, dans l'état synaptique, on peut considérer qu'il existe un potentiel $-U_0$ ($U_0 > 0$) traduisant les interactions du récepteur avec les protéines d'ancrage. Dans cette description, un récepteur extrasynaptique diffuse dans la membrane et peut aléatoirement “tomber” dans un puit de potentiel synaptique. Nos expériences suggèrent que la valeur de U_0 n'est pas très grande devant kT et donc qu'un récepteur peut ressortir du puit par activation thermique. L'équilibre entre les états E et S est gouverné par des constantes cinétiques k_+ et k_- qui sont *a priori* fonction de D_E , D_S , U_0 ainsi que de paramètres tels que la taille des domaines synaptiques et la concentration de synapses dans la membrane.

De nombreuses questions restent à aborder pour préciser ou amender cette description, éclaircir le rôle de l'équilibre et l'intégrer dans une description plus complète des modifications dynamiques de l'organisation membranaire neuronale. Nous discutons ci-dessous plusieurs mesures, certaines en cours et certaines à plus long terme, qui nous semblent importantes dans cette perspective.

Caractérisation de l'équilibre membranaire dans les neurones. Dans la description de l'équilibre membranaire, la dynamique des récepteurs n'est pas seulement déterminée par les processus de diffusion mais également par les temps de résidence dans chaque compartiment (synaptique ou extrasynaptique) dont il est donc essentiel de mesurer les distributions. Ces mesures, qui ne peuvent être faites avec des fluorophores or-

ganiques pour lesquels la photostabilité est trop limitée, ont été réalisées dans le cas des récepteurs AMPA marqués avec des billes de latex [103]. Toutefois, à cause de la taille de la sonde, il est difficile dans cette situation d'obtenir la distribution des temps à la synapse. Le cas des récepteurs marqués avec des NCs semblent donc plus favorables et cette l'analyse des temps de résidence $1/k_-$ est actuellement en cours pour les récepteurs de la glycine et du GABA (C. Charrier, M.V. Ehrensperger, C. Schweizer). Notons qu'il subsiste toutefois des difficultés : (i) on ne peut exclure des effets de gênes stériques dans la synapse (notamment dans le cas des synapses excitatrices [105], (ii) les effets de scintillement compliquent l'identification des temps de résidence dans chacun des états.

Etude de l'interaction récepteur-géphyryne dans des systèmes modèle. Pour préciser la nature des interactions entre les récepteurs glycine et la géphyryne et éviter les effets de gêne stérique dans la fente synaptique, nous proposons d'utiliser pour modèle des cellules COS ou des neurones jeunes (2-4 DIV, avant la formation de synapses) transfectées sélectivement avec des plasmides codant pour le récepteur (avec un tag myc) et la géphyryne (marquée GFP). Cette approche a été employée précédemment dans des expériences utilisant des billes de latex de 500 nm comme marqueurs [102]. Là encore, le développement des techniques utilisant des NCs, permettant des mesures à la fois plus longues et plus proches de la molécule unique, justifie de reprendre ces études pour extraire des informations nouvelles. La dynamique membranaire du récepteur pourra être comparée dans trois situations : (i) en l'absence de la géphyryne, (ii) lorsque le récepteur ne dispose pas de la boucle d'interaction avec la géphyryne, (iii) lorsque cette boucle est présente. Dans chacune de ces situations, on peut accéder aux paramètres les paramètres de diffusion tant latérale que rotationnelle (cf. ci-dessous) de récepteurs individuels et surtout à la dynamique d'entrée-sortie des récepteurs dans les agrégats de géphyryne. Comme il a été démontré récemment pour l'étude in-vitro de la myosin [95], l'utilisation de fluorophores individuels dans des conditions de rapport signal sur bruit élevé permet d'atteindre des résolutions spatiales de l'ordre du nanomètre. Les NCs, qui sont des sondes particulièrement brillantes, sont ainsi très prometteurs pour étendre ces mesures de grande résolution à des systèmes vivants. Nous analyserons ainsi le mouvement des récepteurs dans les agrégats de géphyryne afin de préciser leur organisation et, éventuellement, de mettre directement en évidence la structure en réseau hexamérique de la géphyryne telle qu'elle a été postulée par des données de cristallographie et de biochimie [106].

Etude des paramètres contrôlant la diffusion Les expériences de suivi de récepteurs individuels ont révélé une grande variété de comportement en terme de diffusion membranaire. Les mesures des coefficients de diffusion des récepteurs indiquent une large hétérogénéité tant dans les domaines synaptique qu'extrasynaptique, avec des valeurs qui s'étendent sur plusieurs ordres de grandeurs (entre 10^{-4} et $10^{-1}\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$). L'analyse précise de la dynamique des récepteurs nécessite donc de déterminer les divers facteurs impliqués dans les processus de diffusion et de distinguer les rôles respectifs de la viscosité membranaire, des interactions avec les protéines d'échafaudages (notamment la géphyryne) et de l'activité neuronale.

Dans une cellule, la viscosité membranaire apparente γ est essentiellement déterminée par l'organisation et la composition locale de la membrane [86, 107, 108, 109]. Celle-ci est souvent décrite comme composée de domaines séparés par des barrières déterminées par le cytosquelette sous-membranaire auquel des protéines peuvent se lier. La diffusion brownienne d'une molécule (lipide ou protéine) est ainsi affectée par les interactions avec ces obstacles [107], ce qui est rendu compte par la mesure du coefficient de diffusion latérale D , égal à kT/γ .

Nous proposons d'utiliser comme protéine sonde de la membrane des variants de la protéine N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule) transfectés dans des neurones. Les variants de cette protéine ont un segment C-terminal intracellulaire très court qui ne gêne pas sa diffusion et qui n'interagit pas avec la géphyrine. Des mesures préliminaires ont montré que, pour cette molécule, les coefficients de diffusion sont plus élevés et beaucoup moins dispersés que pour les récepteurs. Il est également possible de générer des N-CAM recombinantes en modifiant la partie C-terminale afin d'en varier la taille et l'encombrement stérique ou d'y greffer des sites d'interaction du récepteur avec la géphyrine. Ces constructions vont permettre de distinguer les interactions avec des obstacles membranaires de celles avec les composants sous-membranaires. Ces mesures pourront être complétées par des expériences utilisant des lipides fonctionnalisés (DOPE-biotin ou DOPE-fluorescein) insérés dans la membrane et révélés par des NCs (couplés à de la streptavidine ou des anticorps anti-fluorescéine). En plus de fournir une sonde naturelle de la membrane, l'utilisation de lipides permettra d'obtenir une description de la viscosité dans différentes parties de la cellule (dendrites, somas, axones) indépendamment de l'expression locale d'une protéine particulière.

A ce jour, l'utilisation des NCs a été restreinte à une sonde de position de la molécule marquée et l'usage du dipôle du NC comme marqueur angulaire n'a pas été encore envisagé. Nous proposons ainsi d'utiliser les techniques d'imagerie défocalisée décrite ci-dessus pour suivre l'orientation d'une protéine membranaire. Jusqu'à présent, nous n'avons considéré comme paramètre pertinent que le coefficient de diffusion latérale D . En réalité, ce paramètre ne distingue pas les interactions répulsives (de type stérique) et les interactions attractives (de type affine), ces deux types d'interaction contribuant à augmenter la viscosité apparente. La mesure de la diffusion rotationnelle pourrait permettre, elle, de bien disséquer les différentes composantes de la diffusion et de distinguer les interactions stériques, qui n'affecte pas la diffusion rotationnelle rapide des récepteurs, des interactions affines (telles que celles avec la géphyrine) pour lesquelles la rotation du récepteur devrait être bloquée. Par ailleurs, le coefficient de diffusion rotationnelle D_r varie comme $1/a^2$ où a est le rayon de l'objet qui diffuse dans la membrane. A la différence de la diffusion latérale pour laquelle D varie en $1/\log(a)$, la mesure de D_r pourrait permettre de distinguer le comportement d'un récepteur individuel de celui d'un agrégat.

Réponse à des perturbations locales ou globales. Afin de comprendre plus précisément le rôle fonctionnel des mécanismes de diffusion latérale, il est important de déterminer les paramètres qui régulent l'équilibre membranaire décrit ci-dessus. Dans le cas de cellules nerveuses, un paramètre naturel est celui de l'activité nerveuse. Dans le cas

des récepteurs de la glycine, des expériences, réalisées principalement par S. Lévi (BCS, ENS Biologie), montrent ainsi que les caractéristiques de diffusion des récepteurs extrasynaptiques sont significativement modifiées par l'activité excitatrice mais pas par l'activité inhibitrice [110]. En présence de drogues bloquant l'activité des récepteurs AMPA et NMDA (APV et CNQX) ou de chélatant du calcium, on observe une augmentation des coefficients de diffusion des récepteurs, qu'ils soient synaptiques ou extrasynaptiques. Ces expériences suggèrent que l'entrée de calcium, induit par la dépolarisation de la membrane, entraîne une augmentation de la viscosité membranaire, en accord avec des observations antérieures pour les récepteurs AMPA [103].

Le mécanisme précis qui mène de l'entrée de calcium au changement de diffusion n'est pas aujourd'hui connu mais il fait vraisemblablement intervenir une régulation du cytosquelette. La question se pose donc de savoir comment les modifications des réseaux d'actine ou de microtubules affectent la mobilité des récepteurs. Ceci est d'autant plus important dans le cas du récepteur glycine pour lequel on sait que la géphyrine interagit directement avec les microtubules. Des mesures sont actuellement réalisées par C. Charrier (BCS, ENS Biologie) et consistent à modifier le cytosquelette par des moyens pharmacologiques (latrunculin A et nocodazole).

Dans les expériences indiquées ci-dessus, les perturbations de l'activité ou du cytosquelette sont réalisées de manière globale en rajoutant une drogue dans le milieu de culture. La distributions du paramètre d'intérêt (ici le coefficient de diffusion) est comparée à la situation contrôle mais sur des cellules différentes. Compte tenu de la grande hétérogénéité des mouvements de récepteurs, il n'est pas toujours aisé d'analyser les modifications observées. Lorsque les conditions le permettent, il semble beaucoup plus favorable d'utiliser des perturbations locales au moyen par exemple de micropipettes ou de réactifs cagés. L'observation des mêmes molécule avant et après perturbation offrent un contrôle interne qui facilitent l'interprétation. L'intérêt de cet approche "locale" a été démontré dans des expériences de décaageage de calcium [103] et plus récemment dans des protocoles de potentiation en électrophysiologie (D. Choquet, communication privée).

4.3 Dynamique du récepteur du GABA dans le cône de croissance

Durant le développement neuronal, la croissance des axones est précisément régulée afin d'établir un réseau fonctionnel. La partie distale de l'axone, le cône de croissance, est ainsi capable de détecter des gradients de signaux chimiques. Ceci fait intervenir un grand nombre de signaux chimiques, tels que la nétrine, le BDNF ou des neurotransmetteurs (GABA, glutamate ou acétylcholine) [111, 112]. Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation menant de l'activation du récepteur aux modifications du cytosquelette et au guidage axonal ont été activement étudiés ces dernières années mais de nombreuses questions restent ouvertes. En particulier, les mécanismes permettant la détection précise (et éventuellement l'amplification) d'un faible gradient spatial ne sont pas connus. Il nous a donc semblé intéressant d'utiliser les méthodes de suivi de molécules uniques pour étudier les processus de chemotaxie dans le cône de croissance et les réorganisations

membranaires qui sont associées⁶. Nous nous sommes concentrés sur le cas du GABA, qui n'est pas le signal chémoattractant le plus fréquemment étudié mais pour lequel nous disposons d'anticorps bien caractérisés. Nous décrivons ici les résultats préliminaires de ces expériences.

Dynamique membranaire des récepteurs du GABA. Nous avons d'abord analysé en détail le mouvement des récepteurs GABA_A marqués avec des nanocristaux (fig. 30a) dans la partie centrale du cône de croissance de neurones spinaux entre 3 et 6 DIV. Les résultats obtenus diffèrent de ceux mesurés dans la membrane somato-dendritique. En plus d'un comportement diffusif ($D = 0.26 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), on observe un mouvement dirigé avec une vitesse de l'ordre de $0.3 \mu\text{m}.\text{s}^{-1}$, comparable à la vitesse d'élongation des microtubules (MTs) dans le cône de croissance (fig. 30c) [113]. Pour confirmer le rôle des MTs, nous les avons dépolymérisés avec du nocodazole ce qui a pour effet de supprimer la composante dirigée du mouvement (fig. 30d) sans modifier les paramètres de diffusion dans la membrane ($D = 0.22 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).

L'observation précise des trajectoires suggèrent toutefois que les récepteurs ne sont animés d'un mouvement dirigé que par intermittence. Pour étudier quantitativement précisément ce phénomène, il faut analyser localement les trajectoires et non plus globalement par le seul calcul du déplacement quadratique moyen $\rho(t)$. En nous inspirant des mesures d'indice de confinement [114], nous avons défini un indice de corrélation de vitesse normalisé $g(t) = \vec{v}(t) \cdot \vec{v}(t+1)$ (où le temps t correspond au numéro de l'image et \vec{v} est la vitesse instantanée normalisée) qui a une valeur proche de 1 lors des phases de mouvements dirigés et tombe à 0 pour une diffusion brownienne [115]. Avec un seuil approprié, on identifie ainsi les phases d'entraînement du récepteur. Cette approche nous a permis de montrer qu'il existe une interaction transitoire entre les récepteurs GABA et la composante MT du cytosquelette, avec un temps d'accrochage moyen de 4 secondes (fig. 31).

Redistribution membranaire durant le guidage axonal. Pour comprendre le rôle fonctionnel de ces interactions dans les mécanismes de guidage, nous avons combiné les mesures de suivi de molécules uniques avec l'application d'un gradient extérieur de GABA. Ce gradient est réalisé en relarguant du GABA suivant une méthode dite de "guidance assay" développée dans le laboratoire de M.-M. Poo [116]. L'extrémité d'une micropipette est positionnée à environ $50 \mu\text{m}$ du cône de croissance, avec un angle de 45° ou 90° par rapport à la direction de l'axone. La pipette éjecte à une fréquence de 1-2 Hz quelques picolitres d'une solution de GABA à 10 mM de telle sorte qu'au niveau du cône de croissance la concentration moyenne C est environ $10 \mu\text{M}$ avec un gradient $\nabla C \simeq 0.1 \mu\text{M}/\mu\text{m}$. Sur une durée de 30 à 60 minutes, on observe la redirection et la croissance de l'axone en direction de la source de GABA (fig. 32), en accord avec des résultats récents identifiant le GABA (au même titre que le glutamate) comme un neurotransmetteur chémoattractant [117].

⁶A notre connaissance, une seule étude en molécule unique a été publiée sur la dynamique membranaire durant un processus de chémotaxie. Elle porte sur la cinétique d'attachement de l'AMP cyclique à des récepteurs membranaires couplés aux protéines G dans des amibes *Dictyostelium discoideum* [90].

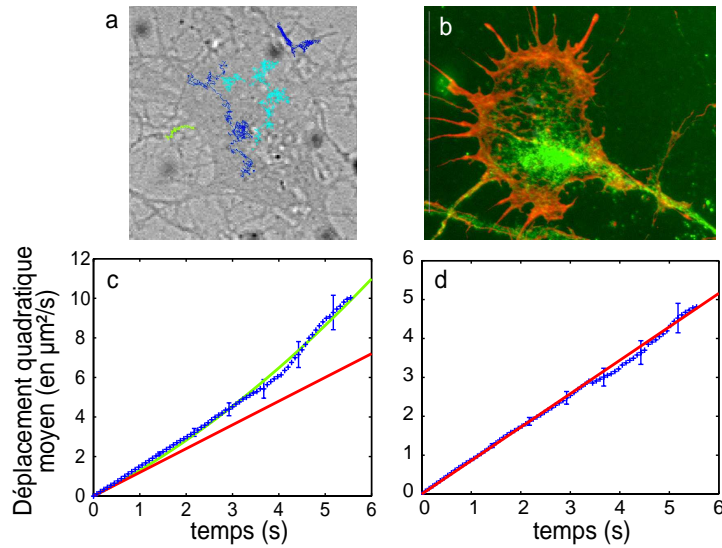


FIG. 30 – a) Exemples de trajectoires dans un cône de croissance. b) Marquage du cytosquelette (filaments d’actine en rouge et microtubules en vert). c) Déplacement quadratique moyen correspondant à une vitesse $v = 0.28 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et un coefficient de diffusion $D = 0.26 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. d) En présence de nocodazole qui dépolymérise les microtubules, le mouvement est purement diffusif ($D = 0.22 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$).

Pour étudier la dynamique membranaire des récepteurs en présence du gradient, nous avons choisi d’observer des cônes de croissance plus adhérents que ceux de la figure 32. Ces cônes, plus étalés sur la surface, ont une taille typique de 5 à 10 μm (fig.30a) de telle sorte que le gradient ∇C induit une différence de concentration de 5 à 10 % de la valeur moyenne C entre le côté proche de la pipette et celui qui est opposé. Sur une durée de 30 minutes, ils ne tournent pas et permettent de mesurer la dynamique des récepteurs sans que le mouvement de la cellule ne modifie l’orientation et la valeur du gradient extérieur. Les expériences sont réalisées dans un mode “time-lapse” pour lequel une image de fluorescence de 75 ms est prise chaque seconde pendant une durée de 20 minutes.

Le résultat principal de nos expériences est l’observation d’une *redistribution latérale des récepteurs vers la source de GABA*. Au bout de 20 minutes, les récepteurs, qui sont toujours animés d’un mouvement brownien rapide dans la membrane, sont préférentiellement localisés du côté du cône qui est proche de la pipette. Pour quantifier cet effet, nous avons déterminé pour chaque image la position de tous les récepteurs à la surface du cône de croissance et tracé la position de leur barycentre en fonction du temps (fig. 33a). Le décalage moyen a lieu avec une échelle de temps caractéristique d’une dizaine de minutes et peut être ajusté par une courbe $t^n/(t_0^n + t^n)$ avec $n \simeq 5$.

Afin d’interpréter ces observations, nous rappelons de manière schématique la cascade de signalisation associée au GABA dans le cône de croissance [118] : (i) l’activation des récepteurs GABA_A déclenche un efflux d’ion Cl^- et une dépolarisation de la membrane (le GABA ne devient hyperpolarisant qu’à un stade ultérieur du développement neuronal), (ii) la dépolarisation de la membrane entraîne un influx de calcium par les canaux

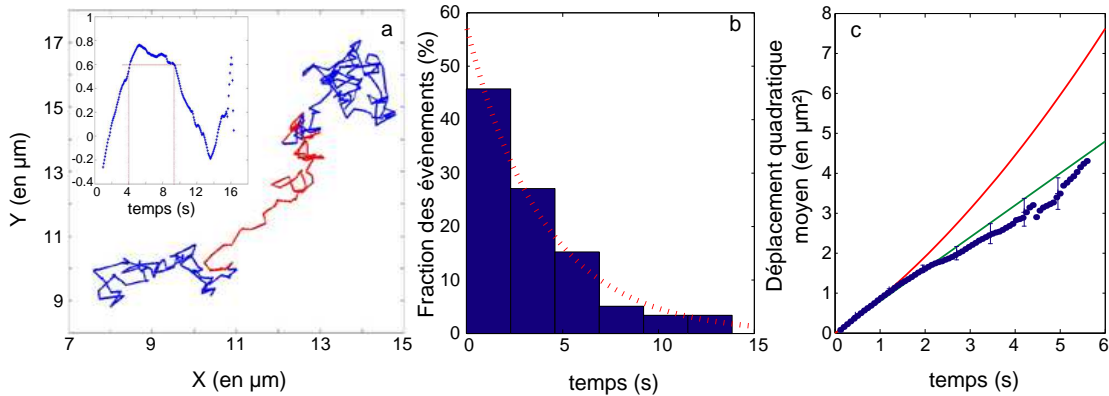


FIG. 31 – a) Exemple de trajectoire d'un récepteur $GABA_A$ dans le cône de croissance. Les parties en rouge et en bleu correspondent respectivement à des phases dirigée et diffusive. Ces phases sont identifiées grâce au calcul de l'indice de corrélation de vitesse (figure en insert) avec un seuil de 0.6. b) Histogramme des durées des phases de mouvement dirigé. La courbe rouge (en pointillé) est un ajustement exponentiel avec un temps moyen de 4 s. c) Déplacement quadratique moyen calculé sur les phases de mouvement diffusif identifiées avec l'indice de corrélation.

calciques de type-L dépendent du potentiel, (iii) le calcium déclenche une chaîne de signalisation aboutissant à l'activation des Rho-GTPases (Rho, Rac, Cdc42) qui contrôlent la dynamique du cytosquelette.

Pour préciser les paramètres qui influent sur la redistribution des récepteurs, nous avons réalisé les expériences sur la localisation membranaire des récepteurs en présence de drogues : (i) de la gabazine, un antagoniste spécifique des récepteurs $GABA_A$, (ii) du Bapta-AM, un chélatant du calcium, (iii) du nocodazole. Dans chacun des cas, le processus de redistribution dans la membrane est aboli (fig. 33b,c et d). Dans le cas de la gabazine, cela indique en particulier que la redistribution n'est pas la conséquence indirecte de l'activation des récepteurs métabotropiques $GABA_B$.

L'ensemble de ces mesures ainsi que l'analyse des interactions récepteur-MT nous a amené à considérer le modèle suivant pour le mécanisme de redistribution latérale dans le cône de croissance. Avant l'application du gradient, il n'existe pas de direction privilégiée et les récepteurs sont distribués de manière homogène dans la membrane. Lorsqu'on applique un faible gradient, il y a une légère asymétrie dans l'activation des récepteurs qui a pour effet d'activer asymétriquement les RhoGTPases et de favoriser la croissance ou la stabilisation des MTs du côté de la micropipette. Les récepteurs, qui diffusent dans la membrane et interagissent transitoirement avec les MTs, sont alors entraînés préférentiellement vers ce même côté, avec pour conséquence de renforcer leur activation asymétrique. Il s'agit donc d'un mécanisme *auto-catalytique* de redistribution des récepteurs contribuant à l'amplification de la détection du gradient extérieur (fig. 34). L'effet des drogues est cohérent avec ce modèle de relocalisation, dans la mesure où la gabazine, le Bapta et le nocodazole bloquent respectivement les étapes a, b et c du mécanisme (fig. 34).

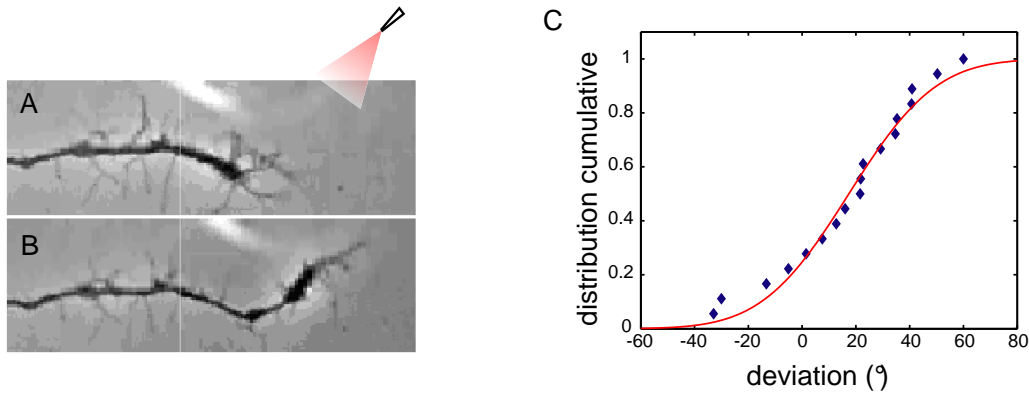


FIG. 32 – Réorientation de la croissance axonale en présence d'un gradient de GABA. A) Image initiale. B) Image après 40 minutes. C) Distribution cumulative des angles Θ de déviation après 60 minutes. La courbe en rouge est un ajustement gaussien (valeur moyenne $\langle \Theta \rangle = 17.4^\circ$, écart quadratique $\sigma = 36.1^\circ$).

Nous avons décrit un processus de contrôle et de modification dynamique de la localisation de protéines dans une membrane. Ce mécanisme, qui résulte d'un compromis entre des fluctuations browniennes tendant à homogénéiser la distribution de protéine et des interactions spécifiques avec le cytosquelette, offre une possibilité d'adaptation rapide à la détection d'un gradient extérieur. Plusieurs points restent toutefois à approfondir pour préciser notre description. En particulier :

- nous cherchons à confirmer directement le processus d'amplification de détection du gradient par des mesures d'imagerie calcique.
- le modèle fait implicitement l'hypothèse qu'il y a une réponse linéaire en terme d'activation des récepteurs. Il est donc nécessaire de faire varier C par rapport à la constante d'affinité du récepteur GABA_A (de l'ordre de quelques μM), ce qui permettra d'aborder des questions liées aux mécanismes d'adaptation dans la réponse chémoattractique [119].
- il est nécessaire de préciser le lien entre l'activation des récepteurs GABA_A et la dynamique du cytosquelette, et notamment de déterminer les partenaires impliqués dans les interactions entre récepteurs et MTs.

Des effets de réorganisation asymétrique de la membrane ont déjà été observés dans les cônes de croissance. Des expériences récentes ont montré que les radeaux lipidiques dans le cône de croissance peuvent servir au recrutement de récepteurs spécifiquement associés aux voies de signalisation de la nétrine, du BDNF ou de la Sémaphorine3A et qu'ils sont distribués asymétriquement en présence d'un gradient d'une de ces substances [120]. Même si le mécanisme de relocalisation n'est pas expliqué, il pourrait s'agir d'un autre processus servant à l'amplification du gradient extérieur. À ce titre, il serait intéressant de comparer les propriétés dynamiques de réorganisation membranaire induit par les différents chémoattractants. Notre discussion s'est jusqu'à présent limitée aux effets chémoattractifs dans le cône de croissance. Dans la mesure où les voies de signalisation y présentent des similarités avec celles d'autres systèmes (comme par exemple *Dyctostelium discoideum*

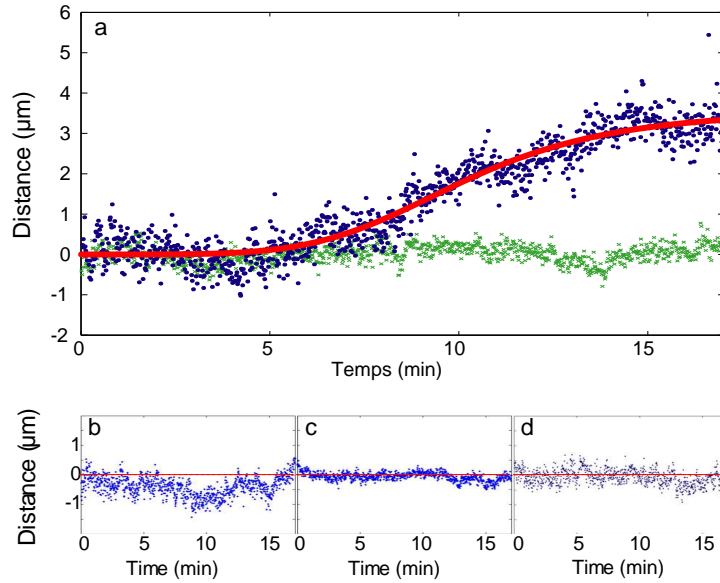


FIG. 33 – *Redistribition spatiale des récepteurs en présence d'un gradient mesurée par l'évolution de la position de leur barycentre par rapport à la position initiale. a) Données (•, en bleu) en présence d'un gradient de GABA. La courbe en rouge est un ajustement par la courbe $at^n/(t_0^n+t^n)$ ($a = 3.6\mu\text{m}$, $t_0 = 10.1\pm 0.3\text{ mn}$ et $n = 4.9\pm 0.4$). Les données en vert (x) correspondent à la situation contrôle sans GABA. Redistribition en présence d'un gradient de GABA et de : b) Gabazine ($10\ \mu\text{M}$), c) Bapta-AM ($30\ \mu\text{M}$), d) Nocodazole ($10\ \mu\text{M}$).*

[111]), les processus qui sont observés dans le cône de croissance sont susceptibles d'avoir une validité plus générale.

4.4 Vers un suivi en molécule unique du mouvement intracellulaire de déterminants de la division asymétrique

Le développement des méthodes de vidéo-microscopie combiné à l'usage de protéines fluorescentes a ouvert des perspectives importantes pour l'étude de la dynamique dans la cellule [25]. La plupart des expériences portent néanmoins sur les propriétés d'organelles ou d'agrégats et le suivi du mouvement intracellulaire à l'échelle d'une molécule intracellulaire individuelle reste un enjeu important.

Il existe un faible nombre de publication sur ce sujet, souvent dans des cas très particuliers ou à titre de démonstration. Plusieurs travaux ont porté sur l'observation de molécules dans le noyau car c'est un compartiment bien moins autofluorescent que le cytosol [121, 122]. Une méthode de suivi des ARN messagers a également été mis au point en utilisant comme sonde fluorescente la protéine MS2 (marquée GFP) qui vient se lier spécifiquement aux ARNm [123]. Il faut également signaler la microscopie de speckle qui consiste à microinjecter des petites quantités de tubuline ou d'actine fluorescentes de

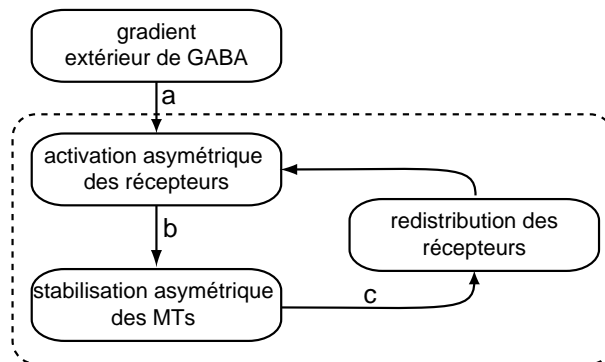


FIG. 34 – *Modèle pour la redistribution asymétrique des récepteurs. La partie en pointillé correspond à une boucle d'amplification pour la lecture du gradient.*

manière à visualiser la dynamique du cytosquelette [124, 125].

Depuis l'été 2004, nous collaborons avec Y. Bellaïche (Institut Curie) sur l'étude en molécules uniques du mouvement de déterminants cellulaires de la division asymétrique. Alors que la plupart des divisions donnent naissance à deux cellules identiques, la division asymétrique permet de produire deux cellules distinctes. L'exemple le plus classique de division asymétrique est celui de la cellule souche qui donne naissance à une nouvelle cellule souche et à une cellule se différenciant. La détermination de deux cellules distinctes lors d'une division repose sur la ségrégation asymétrique d'un déterminant cellulaire dans une seule des cellules-filles. Notre but est développer des méthodes d'imagerie permettant de suivre le mouvement de ces déterminants et d'étudier les mécanismes moléculaires qui assurent leur ségrégation. Au delà du cas de la division cellulaire asymétrique, les techniques qui sont développées devraient trouver des applications dans différents domaines de la biologie cellulaire.

Dynamique de déterminants cellulaires de la division asymétrique

Les divisions asymétriques génèrent des cellules d'identités différentes chez les organismes unicellulaire et multicellulaire. L'acquisition d'une identité cellulaire différente au cours de la mitose nécessite l'établissement d'une polarité cellulaire. Cette polarité se manifeste par la localisation asymétrique de déterminants cellulaires et une orientation particulière du fuseau mitotique (fig.35). La division asymétrique est donc un modèle d'étude des mécanismes de polarisation cellulaire et d'orientation du fuseau mitotique. Les études réalisées sur les invertébrés ont montré que l'acquisition d'une polarité cellulaire au cours de la division asymétrique dépend de molécules conservées au cours de l'évolution.

La compréhension générale des mécanismes de polarisation cellulaire nécessite l'identification des acteurs impliqués dans la polarisation cellulaire. Elle a aussi grandement bénéficié des méthodologies d'imagerie GFP afin de déterminer le cheminement des molécules au sein de la cellule lors de leur transit depuis une position non polarisée vers polarisée [126, 127]. Ces techniques ont néanmoins des limites et ne permettent pas de

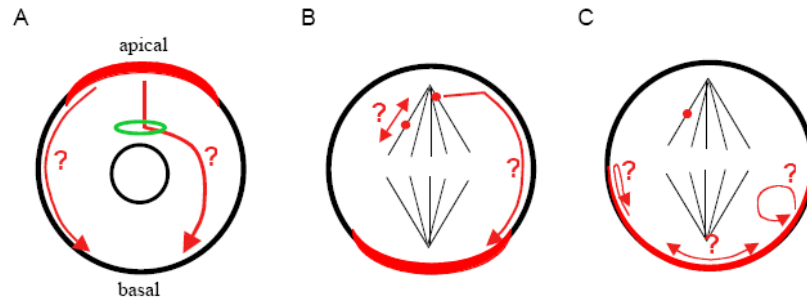


FIG. 35 – Dynamique d'un déterminant cellulaire (en rouge) au cours de la division asymétrique dans les neuroblastes : A. Durant la prophase, B. durant la prometaphase, C. mouvement au cortex basal durant la métaphase et l'anaphase.

répondre de manière directe aux questions suivantes : Quel est le cheminement exact du déterminant au sein de la cellule pour atteindre le cortex ? Quel est le mouvement du déterminant une fois localisé asymétriquement ? Que se passe-t-il lorsque le déterminant entre dans une zone où il ne doit pas être localisé asymétriquement ? Pour répondre à ces questions, il est nécessaire de suivre le mouvement du déterminant non pas de façon globale mais en caractérisant son déplacement à l'échelle de la molécule unique.

Pour réaliser ces objectifs nous avons choisi un modèle simple : la culture de neuroblastes de *Drosophila*. Nous proposons de suivre la localisation dynamique de Miranda durant la division cellulaire asymétrique. Il est connu que Miranda, initialement localisée dans la région apicale durant la prophase, se relocalise au cortex basal à la prometaphase et y reste durant la métaphase et l'anaphase [128]. Par ailleurs, Miranda est détectée sur l'aster apical du fuseau mitotique. Grâce au suivi de molécules uniques, nous chercherons à répondre aux questions suivantes : quel est le mouvement de Miranda durant sa relocalisation au cortex (fig. 35A) ? En particulier, est-ce que les molécules apicales sont vraiment transférées au cortex basal et quelle est la contribution des molécules situées sur l'aster apical (fig. 35B) ? Quel est le mouvement de Miranda, une fois relocalisée au cortex et que se passe-t-il lorsqu'elle atteint la frontière entre le cortex basal et apical (fig. 35C) ? En étudiant précisément la nature des mouvements près de cette frontière, nous étudierons l'existence éventuelle d'une barrière de diffusion ou de mécanismes de recyclage.

Ces études seront comparées à des mesures sur des neuroblastes mutantes *lgl* (*lethal-giant-larvae*) pour lequel Miranda n'est pas localisée basalement mais enrichie sur le fuseau mitotique [129]. Nous chercherons notamment à déterminer à quelle étape *lgl* est nécessaire pour la localisation asymétrique. Enfin nous étudierons le lien entre Miranda et les moteurs moléculaires. Miranda interagit directement avec la Myosin VI qui fait partie d'un complexe contenant aussi la Myosin II [130]. En utilisant des myosin-GFP, nous chercherons à déterminer la contribution de ces moteurs aux déplacements de Miranda en comparant les caractéristiques de leur mouvement (vitesse, localisation, ...) à celui de Miranda.

Suivi du mouvement de protéines cytoplasmiques

Les expériences décrites ci-dessus sont un prolongement des techniques de suivi de protéines membranaires [93]. Elles posent cependant de nombreuses difficultés nouvelles liées : (i) au marquage spécifique des protéines cibles avec des NCs, (ii) la nécessité d'introduire les sondes dans le cytoplasme, (iii) à la nature tri-dimensionnelle du mouvement, (iv) à l'environnement optiquement bruité. Je présente ci-dessous les voies que nous poursuivons depuis quelques mois pour surmonter ces difficultés.

Marquage et injection des protéines. A la différence des expériences sur la dynamique membranaire pour lesquelles la cible moléculaire (le récepteur) est facilement accessible, il n'est pas aisé ici de marquer les molécules endogènes. Nous avons opté pour une stratégie consistant à cloner la protéine puis à la conjuguer directement à un NC par une liaison covalente ou une paire biotin-streptavidin.

La protéine recombinante que nous avons préparé consiste en un domaine GST pour la purification, de la GFP qui fournit un contrôle sur la localisation des protéines dans la cellule, le sous-domaine actif de Pon puis d'un site biotin. Nous avons exprimé et purifié cette protéine et nous nous sommes assurés de sa solubilité. Un élément essentiel pour les expériences de suivi intracellulaire est de réaliser des complexes protéine-NC dans une stœchiométrie 1 :1 et de parfaitement les purifier des complexes des NCs non conjugués. Il s'agit *a priori* d'une contrainte difficile pour les raisons suivantes : (i) la méthode la plus simple pour obtenir au plus une protéine par NC consiste à réaliser le couplage avec un large excès de NC, (ii) du fait de la taille et du poids moléculaire des NCs, il est difficile de séparer un NC seul d'un complexe NC-Protéine.

Il est nécessaire de rajouter une étape de purification par affinité de la construction. Dans ce but, il nous a semblé intéressant de réaliser le couplage directement sur un support d'affinité. Pour cela, les protéines sont immobilisées sur des billes de glutathione par l'intermédiaire du tag GST. En utilisant une concentration surfacique des protéines sur les billes suffisamment faibles, il est possible d'atteindre un régime où la distance moyenne entre protéine est largement supérieure à la taille d'un NC. Dans ce cas, il est possible d'ajouter une quantité équimolaire de NCs streptavidinées avant de faire l'élution. Les premiers résultats semblent valider le principe de cette méthode. Si ces résultats se confirment, cela fournira une approche très générale pour la réalisation de construction protéine-NC de stœchiométrie 1 :1, qui est un enjeu important pour les expériences de suivi de molécules uniques qu'elles soient membranaires ou cytoplasmiques.

Une fois la construction NC-Protéine purifiée, il est ensuite nécessaire de l'introduire dans le cytoplasme afin de suivre ses déplacements lors d'un processus cellulaire (dans notre cas, la division cellulaire). Plusieurs approches telles que l'électroporation, la transfection ou la microinjection sont envisageables. La microinjection semble pour l'instant la méthode la plus favorable pour obtenir des nanoparticules bien dispersées [131]. Le rayon hydrodynamique des NCs sera sans doute un paramètre critique pour ces expériences. Des études en FRAP avec des molécules fluorescentes de Dextran de longueur variable ont en effet montré que les coefficients de diffusion dans le cytoplasme ne varient pas simplement

comme l'inverse de la taille des molécules mais chutent rapidement au-delà d'une taille de l'ordre de 20 à 30 nm [132].

Instrumentation optique. Afin d'observer un NC unique à l'intérieur de la cellule avec un bon rapport signal sur bruit, il est essentiel de réduire autant que possible l'auto-fluorescence du milieu. Si cette autofluorescence n'est pas très gênante dans le cas de dendrites ou de cônes de croissance, éloignés du soma, elle est plus critique pour la détection de molécules cytoplasmiques. Dans ce cas, la molécule d'intérêt est susceptible par exemple de se trouver à proximité d'organelles très autofluorescents tels que des mitochondries. Une première solution consiste à utiliser des sources qui émettent dans le rouge. Il est par exemple possible d'utiliser des NCs émettant autour de 650 nm et qui sont facilement excitables avec un laser HeNe à 633 nm. Cette sélection spectrale peut être également combinée avec une instrumentation optique appropriée.

La méthode la plus répandue pour réduire le bruit de fond et ne collecter que le signal provenant d'une section optique contenant la protéine que l'on souhaite observer consiste à utiliser un microscope confocal à balayage. Malheureusement, les techniques de balayage sont très peu adaptées aux mesures ultrasensibles de type "molécule unique" car le point focal du laser ne passe qu'une toute petite fraction de la durée totale d'acquisition sur la sonde fluorescente et l'on accumule rarement assez de photons pour sortir du bruit.

Il est donc nécessaire d'utiliser une excitation et une détection en champ large pour laquelle les photons émis par la sonde fluorescente sont accumulés pendant toute la durée d'acquisition de l'image. L'inconvénient de telles mesures en épifluorescence est que les photons parasites provenant des plans hors focus réduisent souvent la sensibilité. Pour surmonter cette limitation, nous nous sommes orientés vers une méthode d'imagerie par illumination structurée consistant à introduire une modulation latérale dans l'excitation en projetant sur l'échantillon l'image d'une grille [133]. En prenant trois images correspondant successivement à un décalage de 0, $2\pi/3$ et $4\pi/3$ de la phase de la modulation, on démodule le signal de fluorescence et seuls les photons provenant des plans optiques pour lesquels l'amplitude de modulation est importante sont conservés⁷. La résolution axiale, qui dépend de l'objectif utilisé, est inférieure au micron pour des objectifs à immersion standards, semblable à ce qui est obtenue en microscopie confocale (fig. 36). Un avantage important de cette méthode est de pouvoir faire l'image de champ large en des temps courts. A titre d'exemple, notre but est d'aboutir à un instrument permettant d'imager à une cadence de ~ 10 Hz une molécule unique se déplaçant dans une zone de taille $50 \times 50 \mu\text{m}^2$.

⁷Une autre approche serait d'utiliser des algorithmes de déconvolution. La comparaison précise des images obtenues en illumination structurée et en déconvolution n'a pas été réalisée à notre connaissance.

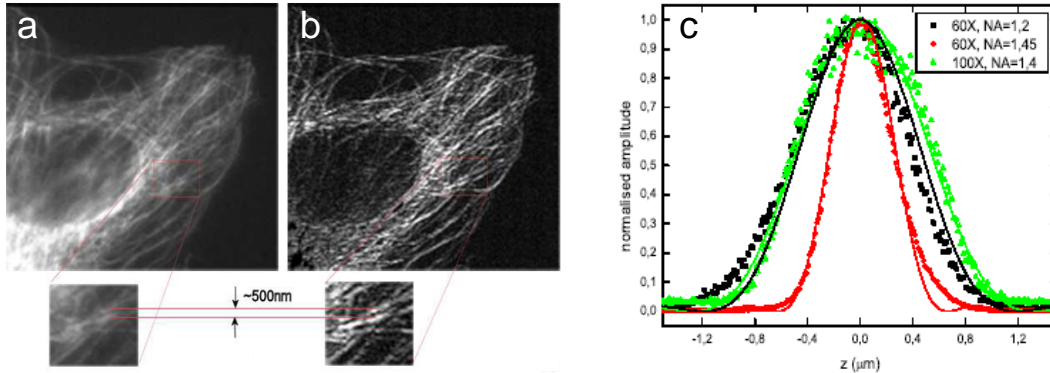


FIG. 36 – Microscopie à illumination structurée. a) Image en épifluorescence d'une cellule *HeLa* fixée dont les microtubules sont marqués en immunofluorescence. b) Image de la section optique obtenue en microscopie à illumination structurée. c) Amplitude de la modulation de l'excitation optique en fonction de la défocalisation pour trois objectifs à immersion. Les lignes pleines correspondent à un ajustement par la courbe théorique [133]. La résolution axiale, définie comme la largeur totale à mi-hauteur, est respectivement égale à 1, 0.54 et 1.1 μm pour les objectifs (60X, $NA = 1.2$), (60X, $NA = 1.45$) et (100X, $NA = 1.4$).

5 Conclusion

Par rapport aux expériences de molécules uniques *in vitro* susceptibles de fournir des informations très précises sur les propriétés mécaniques, biochimiques, conformationnelles... d'une enzyme ou d'un moteur moléculaire, les mesures *in vivo* se limitent jusqu'à présent à la mobilité des molécules dans le milieu cellulaire. L'expérience montre que ce sont des mesures qu'il n'est pas toujours facile d'interpréter. Comprendre précisément la nature des informations qui peuvent être obtenues en molécule unique sur la dynamique cellulaire reste ainsi une question importante. Plusieurs points peuvent d'ores et déjà être soulignés :

- Dans les mesures en cellule, la molécule que l'on observe reste *a priori* soumise aux interactions qui régulent sa dynamique. Le marqueur ne sert qu'à l'"isoler" optiquement parmi une large population.
- Quel que soit le processus cellulaire étudié, la dynamique d'une molécule dépend souvent d'un ensemble de paramètres cellulaires. D'un point de vue expérimental, cela signifie qu'il devient de plus en plus important de combiner simultanément plusieurs mesures (par ex. activité électrique, activité calcique,...) avec des mesures de mobilité.
- Un processus cellulaire est rarement, sinon jamais, contrôlé par la réponse d'une seule molécule. Il est donc essentiel de comprendre comment la dynamique d'un ensemble de molécules (par exemple, une certaine classe de récepteurs) peut être analysée à travers les informations fournies par l'enregistrement d'une sous-population d'entre elles.

- Les méthodes de molécules uniques sont particulièrement adaptées pour étudier les fluctuations autour d'une situation d'équilibre, difficiles ou impossibles à appréhender par des mesures en volume. La détermination *in vivo* des constantes temporelles qui gouvernent ces fluctuations est ainsi un enjeu important, sachant que le fonctionnement d'assemblages moléculaires complexes fait souvent intervenir des échelles de temps variées allant de la milliseconde à plusieurs jours.

Sur tous ces aspects, les expériences décrites dans la section 4 illustrent l'apport des NCs comme sondes fluorescentes. Grâce à la photostabilité et la "brillance" de ces nanoparticules, les mesures de suivi de molécules peuvent être réalisées sur de longues durées avec un bon rapport signal sur bruit. Il devient surtout possible de combiner ces mesures avec la détermination d'autres paramètres cellulaires (activité calcique, activité électrique...) et/ou avec des perturbations extérieures contrôlées (photodécageage, applications par micropipette...). À terme, les expériences de suivi pourront être étendues à plusieurs espèces, simultanément marquées avec des NCs de différentes couleurs, afin rendre compte de la dynamique de différents acteurs moléculaires au cours d'un même processus cellulaire. Un élément essentiel pour la mise au point de ces outils réside toutefois dans la maîtrise précise des caractéristiques physiques, chimiques et biochimiques des sondes. C'est à cette condition qu'il sera possible de poursuivre le développement des méthodes d'imagerie ultrasensible et de les étendre à des milieux plus complexes (tissus, tranches, petits organismes...).

Références

- [1] C.B. Murray, D.J. Norris and M.G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8706 (1993).
- [2] M.A. Hines and P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.* **100**, 468 (1996).
- [3] B.O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. Mikulec, J.R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K.F. Jensen, M.G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **101**, 9463 (1997)
- [4] X. Peng, M.C. Schlamp, A. Kadavanich, and A.P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7019 (1997).
- [5] M.A. Reed, J.N. Randall, R.J. Aggarwal, R.J. Matyi, T.M Moore, and A.E. Wetsel. *Phys. Rev. Lett.* **60**, 535 (1988).
- [6] A.P. Alivisatos, *Science* **271**, 933 (1996).
- [7] W. Moerner and M. Orrit, *Science* **283**, 1670 (1999).
- [8] X.S. Xie and J. Trautman, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49**, 441 (1998).
- [9] S. Weiss, *Science* **283**, 1676 (1999).
- [10] E.J. Peterman, H. Sosa, and W.E. Moerner, *Annu Rev. Phys. Chem.* **79**, 55 (2004).
- [11] S. Empedocles and M. Bawendi, *Acc. Chem. Res.* **32**, 389 (1999).
- [12] M. Nirmal, B.O. Dabbousi, M.G. Bawendi, J.J. Macklin, J.K. Trautman, T.D. Harris and L.E. Brus, *Nature* **383**, 802 (1996).
- [13] S. Empedocles and M. Bawendi, *Science* **278**, 2114(1997).
- [14] S. Coe, W.-K. Woo, M.G. Bawendi and V. Bulovic, *Nature* **420**, 800 (2002).
- [15] M. Achermann, M. A. Petruska, S. Kos, D. L. Smith, D. D. Koleske and V.I. Klimov, *Nature* **429**, 642 (2004).
- [16] W.U. Huynh, J.J. Dittmer, and A.P. Alivisatos, *Science* **295**, 2425 (2002).
- [17] V. Klimov, A. Mikhailovsky, S. Xu, A. Malko, J. Hollingsworth, C. Leatherdale, H. Eisler, and M. Bawendi, *Science* **290**, 314 (2000).
- [18] A. Malko, A. Mikhailovsky, M. Petruska, J. Hollingsworth, H. Htoon, M. Bawendi and V. Klimov, *Appl. Phys. Lett.* **81**, 1303 (2002).
- [19] P. Lodahl, A. Van Driel, I. Nikolaev, A. Irman, K. Overgaag, D. Vanmaekelbergh, and W.L. Vos, *Nature* **430**, 654 (2004).
- [20] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *Science* **281**, 2013 (1998).
- [21] W. Chan and S. Nie, *Science* **281**, 2016 (1998).
- [22] A.P. Alivisatos, *Nat. Biotech.* **22**, 47 (2004).
- [23] J.K. Jaiswal and S.M. Simon, *Trends in Cell Biology* **14**, 497 (2004).
- [24] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, *Science* **307**, 538 (2005).
- [25] Special issue on Biological Imaging, S. M. Hurtley, L. Helmuth, Eds., *Science* 300 (4 Avril 2003).

- [26] S. Kim, B. Fisher, H.J. Eisler and M. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14666 (2003).
- [27] S. Kim *et al.*, *Nat. Biotech.* **22**, 93 (2004).
- [28] X. Peng *et al.*, *Nature* **404**, 59 (2000).
- [29] D. Milliron, S.M. Hughes, Y. Cui, L. Manna, L.W. Wang, and A.P. Alivisatos, *Nature* **430**, 190 (2004).
- [30] F. Patolsky, G. Zheng, O. Hayden, M. Lakadamyali, X. Zhuang, and C.M. Lieber, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 14017 (2004).
- [31] Y. Yin, R.M. Rioux, C.K. Erdonnez, S. Hughes, G.A. Somorjai, and A.P. Alivisatos, *Science* **304**, 711 (2004).
- [32] T. Mokari, E. Rothenberg, I. Popov, R. Costi, and U. Banin, *Science* **304**, 1787 (2004).
- [33] J. Hu, L. Li, W. Yang, L. Manna, L. Wang, and A.P. Alivisatos, *Science* **292**, 2060 (2001).
- [34] X. Brokmann, "*Propriétés de fluorescence de nanocristaux de CdSe individuels*", Thèse de doctorat de l'Université Paris 6 (2004).
- [35] R. Dickson, A. Cubitt, R. Tsien and W.E. Moerner, *Nature* **388**, 355 (1997).
- [36] F. Kulzer, S. Kummer, R. Matzke, C. Brauchle, T. Basche, *Nature* **387**, 688 (1997).
- [37] L.A. Peyser, A.E. Vinson, A.P. Bartko, and R. M. Dickson, *Science* **291**, 103 (2001).
- [38] D. VanDenBout *et al.*, *Science* **277**, 1074 (1997).
- [39] H. Htoon, M.J. O'Connell, P. Cox, S. Doorn and V.I. Klimov, *Phys. Rev. Lett.* **93**, 27401 (2004).
- [40] K. T. Shimizu *et al.*, *Phys. Rev. B* **63**, 205316 (2001).
- [41] M.-E. Pisol *et al.*, *Phys. Rev. B* **59**, 10725 (1999).
- [42] M.D. Mason, G.M. Credo, K.D. Weston and S.K. Buratto, *Phys. Rev. Lett.* **80**, 5404 (1998).
- [43] M. Kuno *et al.*, *J. Chem. Phys.* **112**, 3117 (2000).
- [44] M. Kuno *et al.*, *J. Chem. Phys.* **115**, 1028 (2001).
- [45] F. Bardou, J.P. Bouchaud, A. Aspect, C. Cohen-Tannoudji, *Lévy Statistics and Laser Cooling*, Cambridge University Press (2001).
- [46] J. Reichel, F. Bardou, M. Dahan, E. Peik, S. Rand, C. Salomon and C. Cohen-Tannoudji, *Phys. Rev. Lett.* **75**, 4575 (1995).
- [47] W. Feller, *An Introduction to Probability and its Applications*, Wiley, New York (1968).
- [48] C. Godrèche, J.M. Luck, *J. Stat. Phys.* **104**, 489 (2001).
- [49] X. Brokmann, J.P. Hermier, G. Messin, P. Desbiolles, J.P. Bouchaud, et M. Dahan, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 120601-1 (2003).
- [50] R. Zindervan, F. Kulzer, S.B. Orlinskii, and M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* **107**, 6770 (2003).

- [51] P. Didier, *Propriétés optiques de marqueurs fluorescents d'intérêt biologique en interaction avec leur environnement : étude par spectroscopie femtoseconde*, Thèse de doctorat de l'Université de Strasbourg (2004).
- [52] F. Amblard, communication privée.
- [53] T.D. Krauss and L.E. Brus, Phys. Rev. Lett. **83**, 4840 (1999).
- [54] K.T. Shimizu, W.K. Woo, B.R. Fisher, H.J. Eisler and M.G. Bawendi, Phys. Rev. Lett. **89**, 117401 (2002).
- [55] S. Hohng and T. Ha, J. Am. Chem. Soc. **126**, 1324 (2004).
- [56] B. Lounis, H.A. Bechtel, D. Gerion, A.P. Alivisatos, W.E. Moerner, Chem. Phys. Lett. **329**, 399 (2000).
- [57] P. Michler, A. Imamoglu, M.D. Mason, P.J. Carson, G.F. Strouse, and S. K. Buratto, Nature **406**, 968 (2000).
- [58] G. Messin, J.P. Hermier, E. Giacobino, P. Desbiolles et M. Dahan, Opt. Lett. **26**, 1891 (2001).
- [59] B. Fisher, J.M. Caruge, M. Bawendi, Phys. Rev. Lett. **94**, 087403 (2005).
- [60] V. Klimov, A. Mikhailovsky, D.W. McBranch, C.A. Leatherdale and M. Bawendi, Science **287**, 1011 (2000).
- [61] G. Margolin, E. Barkai, J. Chem. Phys. **121**, 1566 (2004). G. Markolin and E. Barkai, cond-mat/0406381.
- [62] X. Brokmann, E. Giacobino, M. Dahan et J.P. Hermier, Appl. Phys. Lett. **85**, 712 (2004).
- [63] X. Brokmann, G. Messin, P. Desbiolles, E. Giacobino, M. Dahan and J.P. Hermier, New Journal of Physics **6**, 99 (2004).
- [64] W. Lukosz and R.E. Kunz, J. Opt. Soc. Am. **67**, 1607 (1977).
- [65] J.-Y. Courtois, J.-M. Courty, and J. Mertz, Phys. Rev A **53**, 1862 (1996).
- [66] A.L. Efros, M. Rosen, M. Kuno, M. Nirmal, D.J. Norris, and M. Bawendi, Phys. Rev. B **54**, 4843 (1996).
- [67] S.A. Empedocles, R. Neuhauser, and M.G. Bawendi, Nature **399**, 126 (1999).
- [68] I. Chung, K.T. Shimizu and M.G. Bawendi, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **100**, 405 (2003).
- [69] J. Jasny and J. Sepiol, Chem. Phys. Lett. **273**, 439 (1997).
- [70] M. Bohmer and J. Enderlein, J. Opt. Soc. Am. B **20**, 533 (2003).
- [71] X. Brokmann, M.V. Ehrensperger, J.P. Hermier, A. Triller and M. Dahan, Chem. Phys. Lett. **406**, 210 (2005).
- [72] X. Brokmann, L. Coolen, M. Dahan et J.P. Hermier, Phys. Rev. Lett. **93**, 107403 (2004).
- [73] H. Mattoussi *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **122**, 12142 (2000).

- [74] A. Sukhanova, L. Venteo, J. Devy, M. Artemyev, V. Oleinikov, M. Pluot, I. Nabiev, *Lab. Invest.* **82**, 1259 (2002).
- [75] F. Pinaud, D. King, H.P. Moore, S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6115 (2004).
- [76] B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, A. Libchaber, *Science* **298**, 1759 (2002).
- [77] X. Wu *et al.*, *Nature Biotech.* **21**, 41 (2003).
- [78] QDots Corporation (www.qdots.com), Hayward (Etats-Unis) .
- [79] C. Tribet, R. Audebert, J.L. Popot, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 15047 (1996).
- [80] J.L. Popot *et al.*, *Cell. and Mol. Life Sciences* **60**, 1559 (2003).
- [81] C. Luccardini, V. Marchi-Artzner, C. Tribet et M. Dahan (en préparation).
- [82] T. Pellegrino *et al.*, *NanoLett.* **4**, 703 (2004).
- [83] S. Doose, J. M. Tsay, F. Pinaud, and S. Weiss, *Anal. Chem.* **77**, 2235 (2005).
- [84] E. Guignet, R. Hovius et H. Vogel, *Nat. Biotech.* **22**, 440 (2004).
- [85] K. Bouget, S. Aubin, J.-G. Delcros, Y. Arlot-Bonnemains, M. Baudy-Floc'h. *J. Bioorg. Med. Chem.* **11**, 4881 (2003).
- [86] M. Saxton and K. Jacobson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 373 (1997).
- [87] H. Qian, M.P. Sheetz, E.L. Elson, *Biophys. J.* **60**, 910 (1991).
- [88] S.J. Singer and G.L. Nicolson, *Science* **175**, 720 (1972).
- [89] Schutz GJ, Kada G, Pastushenko VP, Schindler H., *EMBO J.* **19**, 892 (2000).
- [90] Ueda M, Sako Y, Tanaka T, Devreotes P, Yanagida T., *Science* **294**, 864 (2001).
- [91] Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Buning H, Hallek M, Brauchle C., *Science* **294**, 1929 (2001).
- [92] G. Harms *et al.*, *Biophys. J.* **81**, 2639 (2001).
- [93] M. Dahan, S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, A. Triller, *Science* **302**, 442 (2003).
- [94] R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb, *Biophys. J.* **82**, 2775 (2002).
- [95] A. Yildiz *et al.*, *Science* **300**, 2061 (2003).
- [96] S. Bonneau, L. Cohen, and M. Dahan, *Proceedings of the 2004 IEEE International Symposium on Biological Imaging*, p. 664.
- [97] L. Cohen and R. Kimmel, *Int. Journal of Computer Vision* **24** , 57 (1997). L. Cohen, *Lettre du SPM*, décembre 2003.
- [98] S. Bonneau, M. Dahan and L. Cohen (submitted for publication).
- [99] M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D. Chemla, A.P. Alivisatos, M. Sauer, S. Weiss, *Opt. Lett.* **26**, 825 (2001).
- [100] D Colquhoun , LG. Sivilotti , *Trends Neurosci.* **27**, 337 (2004).
- [101] D. Choquet and A. Triller, *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 251 (2003).
- [102] J. Meier, C. Vannier, A. Serge, A. Triller, D. Choquet, *Nat. Neurosci.* **4**, 253 (2001).

- [103] A. Borgdorff, D. Choquet, Nature **417**, 649 (2002).
- [104] Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D., EMBO J. **22**, 4656 (2003).
- [105] L. Groc L, M. Heine, L. Cognet, K. Brickley, F.A. Stephenson, B. Lounis, D. Choquet, Nat. Neurosci. **7**, 695 (2004).
- [106] M. Kneussel and H. Betz, Trends Neurosci. **23**, 429 (2000).
- [107] K. Murase *et al.*, Biophys. J. **86**, 4075 (2004).
- [108] J. Dai and M.P. Sheetz, Methods Cell Biol. **55**, 157 (1998).
- [109] M. Edidin, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **32**, 257 (2003).
- [110] S. Lévi, M.V. Ehrensperger, B. Riveau, M. Dahan and A. Triller (en préparation).
- [111] H.J. Song and M.M. Poo, Nat. Cell Biol. **3**, E81 (2001).
- [112] A. Huber, A. Kolodkin, D. Ginty, and J.-F. Cloutier, Ann. Rev. Neurosci. **26**, 509 (2003).
- [113] T. Stepanova *et al.*, J. Neurosci. **23**, 2655 (2003).
- [114] R. Simson, E.D. Sheets, and K. Jacobson, Biophys J. **69**, 989 (1995).
- [115] C. Bouzigues and M. Dahan (en préparation).
- [116] A.M. Lohof, M. Quillan, Y. Dan and M.M. Poo, J. Neurosci. **12**, 1253 (1992).
- [117] Y. Xiang, Y. Li, Z. Zhang, K. Cui, S. Wang, X.B. Yuan, C.P. Wu, M.M. Poo, S. Duan, Nat Neurosci. **5**, 843 (2002).
- [118] H. Fukura, Y. Komiya, and M. Igarashi, J. Neurochem. **67**, 1426 (1996).
- [119] G.I. Ming, S.T. Wong, J. Henley, X.B. Yuan, H.J. Song, N. Spitzer and M.M. Poo, Nature **417**, 411 (2002).
- [120] C. Guirland, S. Suzuki, M. Kojima, B. Lu, and J.Q. Zheng, Neuron **42**, 51 (2004).
- [121] W. Yang, J. Gelles, and S. M. Musser, Proc. Natl. Acad. Sci. **101**, 12887 (2004).
- [122] T. Kues, R. Peters, and U. Kubitscheck, Biophys. J. **80**, 2954 (2001).
- [123] D. Fusco, N. Accornero, B. Lavoie, S.M. Shenoy, J.M. Blanchard, R.H. Singer, and E. Bertrand, Curr. Biol. **13**, 161 (2003).
- [124] P. Vallotton, A. Ponti, C. M. Waterman-Storer, E. D. Salmon, G. Danuser, Biophys. J. **85**, 1289 (2003).
- [125] A. Ponti, M. Machacek, S. L. Gupton, C. M. Waterman-Storer, and G. Danuser, Science **305**, 1782 (2004).
- [126] Y. Bellaïche *et al.*, Cell **106**, 355 (2001).
- [127] Y. Bellaïche, M. Gho, J.A. Kaltschmidt, A.H. Brand, F. Schweisguth, Nat Cell Biol. **3**, 50 (2001).
- [128] T. Ohshiro *et al.*, Nature **408**, 593 (2000).
- [129] C.Y. Peng *et al.*, Nature **408**, 596 (2000).
- [130] C. Petritsch *et al.*, Dev Cell **4**, 273 (2003).
- [131] A. Derfus, W. Chan, and S. Bathia, Adv. Mat. **16**, 961 (2004).

- [132] A. Verkman, Trends in Biochem. Sci. **27**, 27 (2002).
- [133] M.A.A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson, Opt. Lett. **22**, 1905 (1997).
- [134] A. Bensimon, A.J. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, and D. Bensimon, Science **265**, 2096 (1994).
- [135] A. Crut, D. Lasne, J.F. Allemand, M. Dahan, P. Desbiolles, Phys. Rev. E **67**, 051910 (2003).
- [136] N. Shimamoto, J. Biol. Chem. **274**, 15293 (1990).
- [137] W.E. Jack, B.J. Terry, and P. Modrich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4010 (1982).
- [138] H.J. Ehbrecht, A. Pingoud, C. Urbanke, G. Maas, and C. Gualerzi, J. Biol. Chem. **260**, 6160 (1985).
- [139] A. Pingoud and A. Jeltsch, Nucleic Acid Res. **29**, 3705 (2001).
- [140] D.M. Gowers and S.E. Halford, EMBO J. **22**, 1410 (2003).
- [141] P. Janscak, M.P. MacWilliams, U. Sandmeier, V. Nagaraja and T.A. Bickle, EMBO J. **18**, 2638 (1999).

ANNEXES

A Autres travaux

A.1 Travail de doctorat : effets quantiques dans des gaz de césium ultrafroids

Mon travail de doctorat a eu lieu sous la direction de C. Cohen-Tannoudji au sein de l'équipe "Refroidissement d'atomes" du Laboratoire Kastler Brossel (Ecole normale supérieure) et a porté sur l'étude du transport et de la relaxation d'atomes de césium ultrafroids.

La première partie de ma thèse a été consacré à l'étude et à l'utilisation de mécanismes de refroidissement par laser dit subrecul dans l'équipe de C. Salomon. Ces techniques de refroidissement permettent de préparer des nuages d'atomes dont la distribution en impulsions a une largeur δp inférieure à $\hbar k$ ($k = 2\pi/\lambda$, où λ est la longueur d'onde de la transition atomique), c'est à dire telle que les atomes sont délocalisés sur une distance $\hbar/\delta p$ plus grande que λ . En utilisant cette propriété, il nous a été possible d'observer les oscillations de Bloch des atomes ultrafroids dans le potentiel optique de période $\lambda/2$ d'une onde lumineuse stationnaire (fig. 37). Soumis à une force constante, la vitesse atomique, au lieu de croître linéairement, oscille du fait des réflexions de Bragg successives de l'onde atomique délocalisée sur la structure périodique. Cet effet, analogue à celui prédit pour le mouvement des électrons cristallins sous l'effet d'un champ électrique, est très difficilement observé dans un cristal car le temps d'évolution cohérente y est souvent bien plus court que la période d'oscillation. Des expériences analogues à la notre ont permis ultérieurement la réalisation à Yale d'un coupleur de sortie pour un laser à atome pulsé et, au laboratoire Kastler Brossel, la mesure à haute résolution de \hbar/M pour des atomes de rubidium.

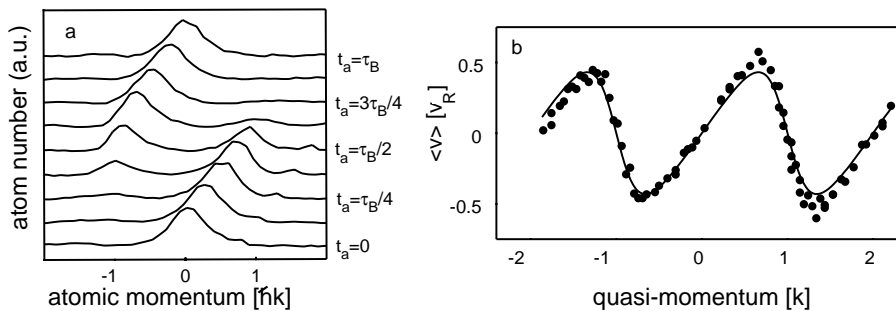


FIG. 37 – Oscillations de Bloch d'atomes de césium dans un potentiel optique : a) distributions en impulsion en fonction du temps (τ_B est la période de Bloch), b) évolution de la vitesse moyenne.

La deuxième partie de ma thèse de doctorat a porté sur le refroidissement évaporatif d'atomes dans un piège magnétique dont l'équipe d'E. Cornell avait montré en juillet 1995 qu'il permettait d'observer la condensation de Bose-Einstein d'atomes de rubidium. Sous la direction de J. Dalibard, nous avons alors tenté de réaliser ces expériences de condensation avec des atomes de césium. Le résultat principal de ces études a été l'observation

inattendue d'une résonance de diffusion pour les collisions élastiques en onde s entre atomes de césium (fig. 38). Cette résonance a pour origine l'existence dans le potentiel d'interaction d'un état, lié ou virtuel, très proche du continuum. Ceci a des implications importantes pour la condensation du césium, signifiant notamment l'impossibilité d'atteindre le régime dégénéré par refroidissement dans un piège purement magnétique.

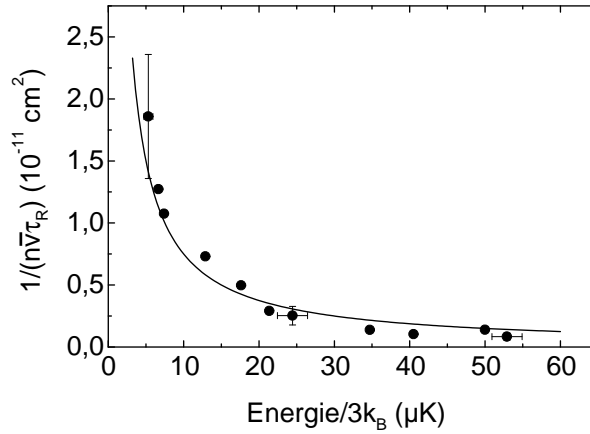


FIG. 38 — Evolution du paramètre $1/n\bar{v}\tau_R$ (où n est la densité du nuage d'atomes, $v = 4\sqrt{k_B T/\pi M}$, M la masse d'un atome de césium et τ_R le temps de relaxation vers l'équilibre) en fonction de la température $T = E/3k_B$ dans le piège magnétique. $1/n\bar{v}\tau_R$ est constant lorsque la section efficace de diffusion en onde s est constante et varie en $1/T$ (courbe en traits pleins) dans le cas d'une résonance de diffusion.

RÉFÉRENCES PRINCIPALES :

- J. Reichel, F. Bardou, M. Dahan, E. Peik, S. Rand, C. Salomon and C. Cohen-Tannoudji, “Raman cooling below 3 nK : New Approach inspired by Lévy flight statistics”, Phys. Rev. Lett. **75**, 4575 (1995).
- M. Dahan, E. Peik, J. Reichel, Y. Castin and C. Salomon, “Bloch Oscillations of Atoms in an Optical Potential”, Phys. Rev. Lett. **76**, 4508 (1996).
- M. Arndt, M. Dahan, D. Guery-Odelin, M. W. Reynolds, J. Dalibard, “Observation of a zero-energy resonance in Cs-Cs collisions”, Phys. Rev. Lett. **79**, 625 (1997).
- E. Peik, M. Dahan, I. Bouchoule, Y. Castin and C. Salomon, “Bloch Oscillations, adiabatic rapid passage and monokinetic atomic beams”, Phys. Rev. A **55**, 2989 (1997).

A.2 Mesure de distance en molécule unique par transfert d'énergie

A l'issue de ma thèse de doctorat, j'ai souhaité changer de thématique de recherche et je me suis orienté vers un sujet nouveau : l'étude optique de molécules biologiques uniques. Lorsque j'ai démarré mon travail post-doctoral à la fin de 1997, ce domaine de recherche en était encore à ses débuts. Après de nombreuses années consacrées à l'étude de molécules uniques à basse température et après les premières expériences à température ambiante, les différents laboratoires

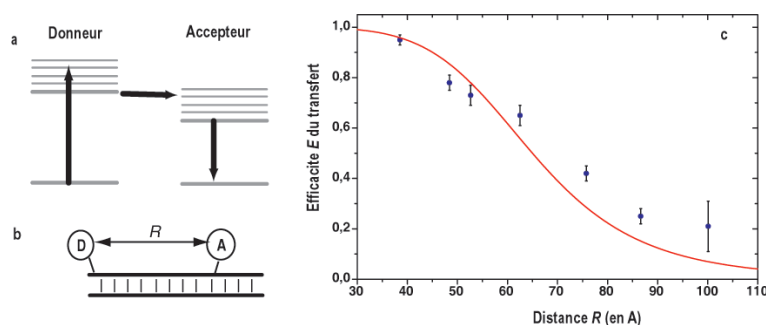


FIG. 39 – Efficacité du transfert d'énergie de Förster mesuré à l'échelle de molécules individuelles

dans le monde débutaient tout juste des mesures sur des molécules biologiques. Au sein de l'équipe de D. Chemla et S. Weiss à Berkeley, j'ai ainsi été initié aux techniques de détection en fluorescence d'objets individuels et été sensibilisé aux problématiques biologiques auxquelles ces techniques étaient susceptibles d'être appliquées.

Le premier projet sur lequel j'ai travaillé a porté sur la mesure de distance par le transfert d'énergie de Förster. Cette technique consiste à utiliser deux fluorophores choisis de telle façon à ce que le spectre d'émission de l'un (le donneur) recouvre le spectre d'absorption de l'autre (l'accepteur) (fig. 39a). Lorsqu'on excite optiquement le donneur, celui-ci peut transférer son énergie à l'accepteur qui, lui, se désexcite radiativement. Le couplage entre les deux molécules, de type dipole-dipole, décroît très vite avec la distance R qui les sépare, de telle manière que l'efficacité du transfert E varie comme $1/(1+(R/R_0)^6)$ où $R_0 \sim 5$ nm. En mesurant la fluorescence des deux molécules, on dispose alors d'un vernier spectroscopique permettant de mesurer des distances à une échelle qui est celle de nombreuses molécules biologiques (Protéines, ADN, ...). La première expérience que j'ai réalisée avec A. Deniz a consisté à montrer que l'on pouvait effectivement mesurer des distances à l'échelle de molécules individuelles. Pour cela, nous avons utilisé une série de molécules d'ADN doublement marquées pour lesquelles on varie la distance entre le donneur et l'accepteur (fig. 39b). Nous avons ainsi mesuré la dépendance spatiale de E en fonction de R (fig. 39c) et confirmé le potentiel de cette approche pour l'étude des conformations moléculaires. Cette technique a ensuite été utilisée à pour étudier le repliement de la protéine CI2 (chimotrypsin inhibitor 2) et mesurer la transition entre les états replié et dénaturé.

RÉFÉRENCES :

A. Deniz*, M. Dahan*, J. Grunwell, T. Ha, D. Chemla, S. Weiss, P. Schultz, "Single-pair FRET on freely diffusing molecules : observation of Förster distance dependance and subpopulations", Proc. Natl. Acad. Sci. USA **36**, 3670 (1999). (* : contributed equally)

M. Dahan*, A. Deniz*, T. Ha, D. Chemla, P. Schultz, S. Weiss, "Ratiometric measurement and identification of single diffusing molecules", Chemical Physics **247**, 85 (1999).(* : contributed equally)

A. Deniz, T. Laurence, G. Beligere, M. Dahan, A. Martin, D. Chemla, P. Dawson, P. Schultz and S. Weiss, "Single-molecule protein folding : Diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2", Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 5179-5184 (2000).

A. Deniz, T. Laurence, M. Dahan, D. Chemla, P. Schultz, S. Weiss, “*Ratiometric single-molecule studies of freely diffusing molecules*”, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **52**, 233-53 (2001).

A.3 Etude optique de la dynamique des interactions ADN-Protéine

Ce projet a démarré en 2001 dans notre équipe. Pierre Desbiolles en est plus particulièrement responsable mais je mentionne ici certains résultats dans la mesure où j’ai été amené à participer, tant sur la partie de détection optique que sur les questions de marquage des protéines ou d’analyse des données.

L’étude des interactions ADN-Protéine à l’échelle de la molécule unique connaît un intérêt croissant depuis plusieurs années. Dans la plupart de ces expériences, les molécules d’ADN sont manipulées et étirées au moyen de pinces optiques, de pinces magnétiques ou de micropipettes. On mesure alors les forces exercées par des protéines (enzymes par exemple) sur l’ADN et cette approche s’est révélée très fructueuse. Cependant, une limite de ces techniques est qu’il est difficile de les combiner avec une mesure en fluorescence permettant d’observer directement le mouvement de la protéine le long de la molécule d’ADN.

Notre démarche, en collaboration avec J.F. Allemand du groupe de V. Croquette et D. Bensimon (LPS, ENS), a consisté à attacher une molécule d’ADN par ses extrémités à une surface de verre, tout en empêchant qu’elle ne vienne se coller à la surface [135]. Une fois accrochée à la surface par ses extrémités, la molécule est soumise à des fluctuations thermiques dues aux interactions avec le milieu liquide qui l’entoure. En utilisant un marqueur fluorescent, nous avons pu visualiser ces fluctuations avec une résolution temporelle de 20 ms (fig. 40). Nous avons utilisé un modèle de "bille et ressort" pour les décrire quantitativement. Cette approche, fréquemment employée en physique des polymères, consiste à décrire la molécule comme une série de billes connectées par des ressorts. En décomposant alors le mouvement sur les modes normaux $NX_p(t) = \sum_{n=1}^N x_n(t) \sin(np\pi/N)$ (où $x_n(t)$ désigne la position transverse de la n^{eme} bille), on montre alors que la fonction d’autocorrélation de $\langle X_p(t)X_p(0) \rangle$ décroît exponentiellement avec une amplitude $\langle X_p^2 \rangle$ et un temps de corrélation τ_p donnés par $\langle X_p^2 \rangle \sim \frac{1}{p^2}$ et $\tau_p \sim \frac{1}{p^2} \frac{L^2}{f(R/L)}$ où R est la distance entre les extrémités, L la longueur de la molécule. f est une fonction qui traduit le comportement élastique non-linéaire de la chaîne et dont l’expression dans le modèle du ver vaut : $f\left(\frac{R}{L}\right) = \frac{2}{3} + \frac{L}{6R} \left(\frac{1}{(1-R/L)^2} - 1 \right)$. Expérimentalement, nous avons analysé le mouvement d’environ 45 molécules et déterminé pour chacune d’entre elles les amplitudes $\langle X_p^2 \rangle$ et temps de corrélation τ_p pour les modes 1, 2 et 3 (fig. 40). Nos données sont en bon accord avec un modèle de “bille et ressort” prenant en compte le comportement élastique non-linéaire de la molécule d’ADN.

Les expériences actuellement en cours ont pour but de visualiser le mouvement d’une enzyme marquée avec un fluorophore ou un nanocristal se déplaçant le long de l’ADN. Nous nous concentrons plus spécialement sur le cas des enzymes de restriction (EcorV et EcorI) afin d’étudier les mécanismes de reconnaissance des sites d’activité. Des mesures de cinétique menées par des biologistes et des biochimistes ont montré qu’une diffusion à trois dimensions de ces enzymes ne peut expliquer l’efficacité avec laquelle elles trouvent ce site spécifique [136]. Il semble que, dans un premier temps, les enzymes se fixent à la molécule d’ADN de manière non spécifique, en un lieu qui peut être éloigné de plusieurs milliers de paires de bases du site d’activité. Différents processus assurent alors une diffusion linéaire le long de l’ADN, stratégie beaucoup plus efficace qu’une diffusion tridimensionnelle. Pour trouver leur site d’activité, les enzymes peuvent

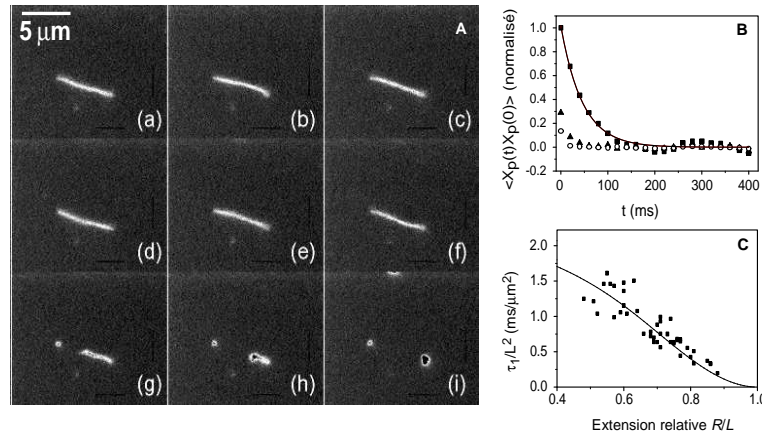


FIG. 40 – A) *Fluctuations thermiques d’une molécule d’ADN attachée par ses extrémités. Elle finit par casser sous l’effet du photoblanchiment et se rétracte vers ses points d’accrochage.* B) *Détermination expérimentale de $\langle X_p(0)X_p(t) \rangle$ pour $p = 1$ (■), $p = 2$ (▲) et $p = 3$ (○). La ligne continue est un ajustement exponentiel de la décroissance du mode 1.* C) *● : τ_1/L^2 en fonction R/L . La ligne continue est la prédiction en $1/f(R/L)$ du modèle.*

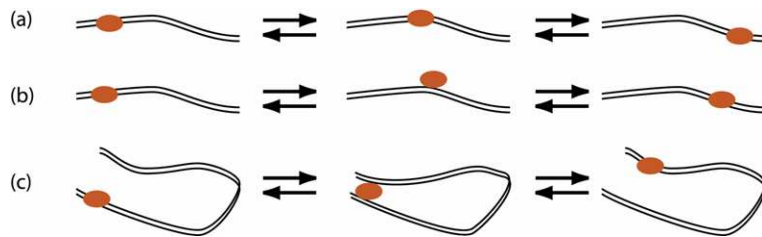


FIG. 41 – *Mécanismes de diffusion linéaire le long d’une molécule d’ADN. (a) l’enzyme glisse le long d’un sillon de la molécule, dans un mouvement hélicoïdal (“sliding”), (b) déplacement par successions d’interactions non spécifiques (“hopping”), (c) passage d’une région à l’autre sur un ADN replié (“intersegment transfer”).*

glisser rapidement le long d’un sillon de l’ADN, dans un mouvement hélicoïdal (“sliding”) ou se déplacer parallèlement à la molécule tout en demeurant à sa proximité immédiate (“hopping”). D’autres processus font intervenir le passage d’une zone de l’ADN à une autre, lorsque la molécule est repliée (“intersegment transfer”). La visualisation par microscopie de fluorescence de ces mécanismes permettrait de trancher entre les différents processus avancés par les biologistes pour rendre compte des résultats des mesures cinétiques effectuées sur ces enzymes. D’autres paramètres, difficiles à estimer à partir de ces mesures d’ensemble, deviennent accessibles. On peut citer par exemple le coefficient de diffusion des enzymes sur l’ADN, l’éventuelle existence de pauses lors du déplacement, la statistique de la durée de ces pauses, la manière dont ces pauses et leur durée dépendent de la séquence, ou encore la statistique des longueurs d’ADN explorées lors de la diffusion linéaire.

Ma contribution à ce projet consiste avant tout à appliquer les techniques de solubilisation et de fonctionnalisation des NCs pour marquer les protéines dont on souhaite suivre l’activité le

long de l'ADN et à développer avec P. Desbiolles l'instrumentation optique et l'analyse d'images nécessaire à ces expériences.

RÉFÉRENCE :

A. Crut, D. Lasne, J.F. Allemand, M. Dahan, P. Desbiolles, "*Transverse fluctuations of single DNA molecules attached at both extremities to a surface*", Phys. Rev. E **67**, 051910 (2003).

B Liste complète des productions et activités scientifiques

1) Revues à comité de lecture

1. P. Bouyer, P. Lemonde, M. Dahan, A. Michaud, C. Salomon and J. Dalibard, "An atom trap relying on optical pumping", *Europhysics Letters* **27**, 569 (1994).
2. M. Voos, C. Delalande, M. Dahan, J. Wainstain, A. Titkov, A. Halimaoui, "Excitation spectroscopy of the visible photoluminescence of porous silicon", *Solid State Comm.* **94**, 651 (1995).
3. J. Reichel, F. Bardou, M. Dahan, E. Peik, S. Rand, C. Salomon and C. Cohen-Tannoudji, "Raman cooling below 3 nK : New Approach inspired by Lévy flight statistics", *Phys. Rev. Lett.* **75**, 4575 (1995).
4. M. Dahan, E. Peik, J. Reichel, Y. Castin and C. Salomon, "Bloch Oscillations of Atoms in an Optical Potential ", *Phys. Rev. Lett.* **76**, 4508 (1996).
5. M. Arndt, M. Dahan, D. Guery-Odelin, M. W. Reynolds, J. Dalibard, "Observation of a zero-energy resonance in Cs-Cs collisions", *Phys. Rev. Lett.* **79**, 625 (1997).
6. E. Peik, M. Dahan, I. Bouchoule, Y. Castin and C. Salomon, "Bloch Oscillations, adiabatic rapid passage and monokinetic atomic beams", *Phys. Rev. A* **55**, 2989 (1997).
7. E. Peik, M. Dahan, I. Bouchoule, Y. Castin and C. Salomon, "Bloch Oscillations and an accelerator for cold atoms", *Appl. Phys. B*, **65**, 685-692 (1997).
8. M. Dahan, E. Peik, I. Bouchoule, Y. Castin and C. Salomon, "Quantum transport with cold atoms", *Ann. Phys. Fr* **23**, C1-111 (1998).
9. A. Deniz, M. Dahan, J. Grunwell, T. Ha, D. Chemla, S. Weiss, P. Schultz, "Single-pair FRET on freely diffusing molecules : observation of Forster distance dependance and sub-populations", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **36**, 3670 (1999).
10. M. Dahan, A. Deniz, T. Ha, D. Chemla, P. Schultz, S. Weiss, "Ratiometric measurement and identification of single diffusing molecules", *Chemical Physics* **247**, 85 (1999).
11. A. Deniz, T. Laurence, G. Belligere, M. Dahan, A. Martin, D. Chemla, P. Dawson, P. Schultz and S. Weiss, "Single-molecule protein folding : Diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2 ", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5179-5184 (2000).
12. M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D. Chemla, A.P. Alivisatos, M. Sauer, S. Weiss, "Time-gated biological imaging using colloïdal quantum dots ", *Opt. Lett.* **26**, 825 (2001).
13. A. Deniz, T. Laurence, M. Dahan, D. Chemla, P. Schultz, S. Weiss, "Ratiometric single-molecule studies of freely diffusing molecules ", *Annu. Rev. Phys. Chem.* **52**, 233-53 (2001).
14. G. Messin, J.P. Hermier, E. Giacobino, P. Desbiolles et M. Dahan, "Bunching and Antibunching in the fluorescence of individual semiconductor nanocrystals", *Opt. Lett.* **26**, 1891 (2001).
15. X. Michalet, F. Pinaud, T. Lacoste, M. Dahan, M. Bruchez, A.P. Alivisatos, S. Weiss, " Properties of Fluorescent Semiconductor Nanocrystals and their Applications to Biological Labelling", *Single Molecule* **4**, 261-276 (2001).

16. X. Brokmann, J.P. Hermier, G. Messin, P. Desbiolles, J.P. Bouchaud, et M. Dahan, “*Statistical Aging and Non-ergodicity in the fluorescence of single nanocrystals*”, Phys. Rev. Lett. **90**, 120601-1 (2003).
17. A. Crut, D. Lasne, J.F. Allemand, M. Dahan, P. Desbiolles, “*Transverse fluctuations of single DNA molecules attached at both extremities to a surface*”, Phys. Rev. E **67**, 051910 (2003).
18. M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau and A. Triller, “*Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single quantum dot tracking*” Science **302**, 442 (2003).
19. S. Lévi, M. Dahan and A. Triller, “*Imaging Single Receptors with Quantum Dots*”, to appear in “*Imaging in Neuroscience and Development : A laboratory manual.*” edited by Rafael Yuste and Arthur Konnerth.
20. S. Bonneau, L. Cohen, and M. Dahan, “*A multiple target approach for single quantum dot tracking*”, Proceedings of the 2004 IEEE International Symposium on Biological Imaging, p. 664.
21. X. Brokmann, E. Giacobino, M. Dahan et J.P. Hermier, “*Highly efficient triggered source of single photons emitted by CdSe/ZnS nanocrystals*”, Appl. Phys. Lett. **85**, 712 (2004).
22. X. Brokmann, L. Coolen, M. Dahan et J.P. Hermier, “*Measurement of the radiative and non-radiative decay rates of single CdSe nanocrystals through a controlled modification of their spontaneous emission*”, Phys. Rev. Lett. **93**, 107403 (2004).
23. X. Brokmann, G. Messin, P. Desbiolles, E. Giacobino, M. Dahan and J.P. Hermier, “*Colloidal CdSe/ZnS quantum dots as single photon sources*”, New Journal of Physics **6**, 99 (2004).
24. X. Brokmann, M.V. Ehrensperger, J.P. Hermier, A. Triller and M. Dahan, “*Orientalional imaging and tracking of single CdSe quantum dots by defocused microscopy*”, Chem. Phys. Lett. **406**, 210 (2005).
25. X. Brokmann, J.P. Hermier, P. Desbiolles et M. Dahan, “*Des nanosources de lumière pour l’optique et la biologie*”, à paraître dans Images de la Physique 2005.
26. S. Bonneau, M. Dahan and L. Cohen, “*Single quantum dot tracking based on perceptual grouping using minimal paths in a spatio-temporal volume*” (soumis pour publication à IEEE Transaction on Image Processing, special issue on Molecular and Cellular Imaging).
27. X. Brokmann, L. Coolen, J.P. Hermier et M. Dahan, “*Emission properties of semiconductor quantum dots close to a dielectric interface*”, (soumis pour publication).
28. S. Lévi, M. Ehrensperger, B. Riveau, M. Dahan et A. Triller, “*Excitatory synaptic activity controls membrane diffusion of inhibitory glycine receptor*” (soumis pour publication).
29. C. Luccardini, V. Marchi-Artzner, C. Tribet et M. Dahan, *Properties of amphipol-coated quantum dots and their interactions with unilamellar vesicles*, en préparation.
30. M. Dahan, *From analog to digital : exploring cell dynamics with single quantum dots*, en préparation.

2) Conférences invitées dans des congrès

1. Septembre 1999 : Conférence de la société Européenne de Biologie, Garching (Allemagne).
2. Octobre 2000 : Journée du GDR nanostructures.

3. Mars 2001 : Journée du GDR Imagerie linéaire et non-linéaire.
4. Avril 2002 : conférence invitée dans le cadre du symposium de la fondation des Treilles.
5. Avril 2002 : conférence invitée au workshop CNRS-UC Santa Barbara (Paris).
6. Mai 2002 : conférence invitée au Colloque OptDiag (Paris).
7. Juin 2002 : conférence invitée à la Journée Imagerie de la Montagne Ste Geneviève.
8. Aout 2002 : conférence invitée aux Journées de la Matière Condensée (Marseille).
9. 22 Octobre 2002 : conférence invitée à la session "Optique et Biotechnologies" au congrès OPTO2002.
10. 20 Mars 2003 : conférence invitée, congrès de la société suisse de Physique à Bale.
11. 22 Mai 2003 : séminaire invité, journées scientifiques de l'UFR Jean Roche à Marseille.
12. 23 Septembre 2003 : séminaire invité, 9ème conférence "Single Molecule Detection" (Berlin).
13. 8 Novembre 2003 : séminaire invité aux journées Inserm "Rôle des contraintes mécaniques en biologie" (Montpellier).
14. 26 Juillet 2004 : conférence invitée, congrès international d'Histochemie (San Diego).
15. 24 Août 2004 : conférence invitée, symposium "Single Molecule Biophysics" de l'American Chemical Society Meeting (Philadelphie).
16. 17-20 Janvier 2005 : conférence invitée, "Conference on Molecular Nano-Machines" (Les Houches).
17. 5-7 Février 2005 : conférence invitée "Annual workshop on single molecules" (Linz).
18. 27-30 Avril 2005 : Robert Feulgen Lecture, Histochemistry Society Meeting (Amsterdam).
19. 20 Mai 2005 : conférence invitée, société française de Neurosciences (Lille).
20. 21-23 Septembre 2005 : orateur invité, 11ème conférence "Single Molecule Detection" (Berlin).
21. 28 Septembre 2005 : orateur invité, session "Les nanosciences au coeur des technologies convergentes", Mesure-Expo (Paris).
22. 22-25 Novembre 2005 : orateur invité, colloque "Nano-Objets aux Interfaces 2005" (Montpellier).
23. 29 Novembre-2 Décembre 2005 : orateur invité, MRS Fall meeting (Boston).
24. 8-9 Décembre 2005 : orateur invité, symposium "Advanced Technologies in Biological Imaging" (Helsinki).
25. 8-10 Janvier 2006 : orateur invité, conférence "Nanoscience with Nanocrystals" (Grenoble).

3) Publications dans des revues sans comité de lecture

1. M. Dahan et C. Salomon, "Les oscillations de Bloch", Pour la Science (Juillet 1999).
2. M. Dahan, S. Lévi et A. Triller, "Des nanocristaux pour explorer la dynamique des cellules nerveuses", Universalia 2004, p. 306.

4) Séminaires, workshops

1. Séminaire au Laboratoire Kastler Brossel (14 mars 2000).
2. Séminaire au laboratoire de M.P. Pileni (avril 2000).
3. Séminaire au GPS à Jussieu (19 juin 2000).
4. Séminaire au Collège de France (10 octobre 2000).
5. Séminaire aux journées du département de Biologie de l'École normale (30-31 Janvier 2001).
6. Séminaire au Laboratoire de Physique des Lasers à Lille (2 Février 2001).
7. Séminaire au Laboratoire de Physique des Lasers à Villetaneuse (29 Mars 2002).
8. Séminaire Matière Molle et Biologie à Paris 7 (3 mai 2002).
9. 25 Octobre 2002 : séminaire au laboratoire de Photophysique Moléculaire à Orsay
10. 31 Janvier 2003 : séminaire au laboratoire LDFC à Strasbourg.
11. 05 Février 2003 : séminaire au laboratoire LPN à Marcoussis
12. 26 Mars 2003 : séminaire à l'Institut Curie.
13. 22 Mai 2003 : séminaire invité aux journées scientifiques de l'UFR Jean Roche à Marseille
14. 17 Juin 2003 : séminaire invité à l'école supérieure de physique de Marseille.
15. 21 Novembre 2003 : séminaire au département de Physique à l'université d'Urbana-Champaign
16. 25 Novembre 2003 : séminaire dans le laboratoire de M. Bawendi au MIT.
17. 8 Janvier 2004 : séminaire général du département de Physique à l'ENS.
18. Février 2004 : présentation orale au Biophysical Society Meeting, Baltimore.
19. 5 mars 2004 : séminaire au laboratoire de physique des lasers à Villetaneuse.
20. 26 mai 2004 : séminaire invité à l'université de Rennes.
21. 17 juin 2004 : séminaire invité à l'université de Leiden.
22. 18 juin 2004 : séminaire à l'université de Delft.
23. 24 septembre 2004 : exposé à la journée "Nanosciences et Biotechnologies" de l'Association de la Montagne Ste Geneviève.
24. 9 Novembre 2004 : séminaire au Magistère Inter-universitaire de Physique à l'ENS.
25. 12 Novembre 2004 : séminaire au National Institute for Medical Research à Londres.
26. 26 Novembre 2004 : séminaire à la journée "Dynamique membranaire" du GDR.
27. 3 Février 2005 : séminaire au laboratoire "Optique et Biosciences" à l'École Polytechnique.

5) Enseignement et diffusion de l'information scientifique

- Enseignement au Magistère de Biologie (3 h/an) dans le cadre de l'option de physique (en 2004).
- Enseignement au DEA "Interface Physique Biologie" (mastère M2 de Paris 7) (3 h/an à partir de l'année universitaire 2004-2005).
- Enseignement au mastère M1 de Paris 7 (4 h/an à partir de l'année universitaire 2004-2005).
- Enseignement au mastère M1 de Paris 6 (6 h/an à partir de l'année universitaire 2004-2005).

6) Encadrement, animation et administration de la recherche

Encadrement de thèses

- Encadrement de la thèse de Marc Humbert (septembre 2001-septembre 2002, actuellement professeur en classe préparatoire).
- Co-encadrement de la thèse de Xavier Brokmann (soutenue en novembre 2004, actuellement en séjour post-doctoral au MIT).
- Encadrement de la thèse de Marie-Virginie Ehrensperger (depuis septembre 2003).
- Encadrement de la thèse de Cédric Bouzigues (depuis septembre 2003).
- Co-encadrement de la thèse de Stéphane Bonneau (depuis septembre 2003).

Encadrement de stages en 2ème et 3ème cycle

- stage du magistère interuniversitaire de Physique de 2ème année d'Olivier Rivoire (Juillet 2000) : détection de la diffusion de molécules individuelles.
- stage de DEA (Physique Quantique) de Marc Humbert (Janvier-Juin 2001) : diffusion de récepteurs membranaires individuels.
- stage de 3ème année de l'ESPCI de Romain Lecaque (Avril-Juin 2001) : couplage de sondes fluorescentes à des biomolécules.
- stage du magistère interuniversitaire de Physique de Yann Michel (Cursus Mixte) (Février-Juin 2002) : étude théorique et numérique de la diffusion de récepteurs à la surface membranaire.
- stage de DEA (Analyse et Traitement d'Images) de Stéphane Bonneau (Mars-Septembre 2003) : suivi automatique de nanocristaux individuels.
- stage de DEA (Modélisation et Instrumentation en Physique) de Makrina Anastassiadou (Mars-Juin 2004) : Développement d'un microscope à illumination structurée pour l'imagerie biologique.
- visite de Massimo Galimberti (Université de Florence) dans le cadre du programme européen "Marie Curie training site" (mars-juillet 2004).
- visite de Camilla Luccardini (Université de Gênes) dans le cadre du programme européen "Marie Curie training site" (novembre 2002- novembre 2003).
- visite de Marcel Lewenbergen (Université de Delft) (novembre 2004-Janvier 2005).
- stage de maîtrise de Garance Mine (Université Paris 11) (avril-juin 2005).

Animation scientifique

- Co-organisation avec S. Balibar en 2000-2001 du séminaire général du département de Physique de l'ENS.
- Organisation avec V. Croquette et M. Orrit de la session "Etude Biophysique en Molécules Uniques" du congrès 2001 de la SFP (9-13 Juillet, Strasbourg).
- Organisation depuis septembre 2001 d'un séminaire de biophysique au sein du département de Physique de l'ENS.
- Co-organisation des journées de prospectives du laboratoire Kastler Brossel (mai 2003).
- Organisation avec L. Cognet (CNRS, Bordeaux) d'une session prédoctorale de l'Ecole des Houches sur le thème "Optique et Biologie" (31 Août-12 Septembre 2003).
- Membre du comité d'organisation de l'école d'été du GDR Microscopie Fonctionnelle en Biologie ayant lieu du 12 au 17 septembre 2004.
- Organisation de l'école Bioimage sur "Visualizing, manipulating and modeling single molecules" (Paris, 11-22 Juillet 2005).

- Membre du comité scientifique pour la partie “biophotonics” de la conférence CLEO/EQEC (Munich, 2005).
- Membre du comité d’organisation de la session Single Molecule SPIE Meeting (San Jose, 2006).
- Rapporteur de la thèse de R. Vierberk (Université de Leiden - directeur : M. Orrit).

Administration de la Recherche

- Membre du conseil du Laboratoire Kastler Brossel (depuis Mars 2002).
- Membre du conseil du département de Physique de l’Ecole normale supérieure (depuis Juin 2002).
- Membre suppléant de la commission Hygiène et Sécurité à l’Ecole normale supérieure (depuis Mars 2002).
- Membre suppléant de la commission de recrutement du département de Biologie (de Mars 2001 à Juin 2004).
- Membre suppléant de la commission de recrutement à l’université Paris 13 (à partir de septembre 2004).
- Membre du bureau du comité NanoBio au sein du Centre de Compétence en Nanosciences de l’Ile de France.

C Curriculum Vitae

Maxime Dahan

Nationalité française, 33 ans.

Chargé de recherche de 1ère classe, CNRS

Laboratoire Kastler Brossel

Département de physique de l'école normale supérieure

24 rue Lhomond 75231 Paris Cedex 05

email : maxime.dahan@lkb.ens.fr

-
- *Octobre 2002* : Nomination au grade de CR1.
 - *Octobre 2000* : Création avec P. Desbiolles de l'équipe "Optique et Biologie" au laboratoire Kastler Brossel.
 - *Décembre 1999* : prise de fonction au laboratoire Kastler Brossel.
 - *Juillet 1999* : Admission au concours CR2 du CNRS en section 04.
 - *Novembre 1997- Décembre 1999* : Stage post-doctoral dans le groupe des professeurs Daniel Chemla et Shimon Weiss (Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, Etats-Unis).
Sujet : *Détection optique de molécules biologiques individuelles*.
 - *Septembre 1994- Octobre 1997* : Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI sous la direction de C. Cohen-Tannoudji (Professeur au Collège de France), soutenue le 2 octobre 1997 avec la mention Très Honorable et les félicitations du jury. Sujet : *Transport et relaxation d'atomes de césium : Oscillations de Bloch et Résonance de Diffusion*.
 - *Octobre 1993- Juin 1994* : DEA de Physique Quantique (rang : 1, mention Très Bien).
 - *1990 - 1993* : Elève à l'Ecole Polytechnique. Rang de sortie : 16. Membre du Corps des Ingénieurs de l'Armement option Recherche.