HAL open science

Microscopie de nano-objets individuels pour la neurobiologie

David Lasne

To cite this version:

David Lasne. Microscopie de nano-objets individuels pour la neurobiologie. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2007. Français. NNT : . tel-00258911

HAL Id: tel-00258911

https://theses.hal.science/tel-00258911v1

Submitted on 26 Feb 2008

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.

N° d'ordre : 3390

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

par David LASNE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : LASER ET MATIÈRE DENSE

Microscopie de nano-objets individuels pour la neurobiologie

Soutenue le : vendredi 6 juillet 2007

Après avis de :

M. Maxime DAHAN	Chargé de Recherche (LKB, Paris)	Rapporteur
M. Hervé RIGNEAULT	Directeur de Recherche (Institut Fresnel, Marseille)	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M. Daniel CHOQUET	Directeur de Recherche (Institut François Magendie, Bordeaux)	Président
M. Maxime DAHAN	Chargé de Recherche (LKB, Paris)	Rapporteur
M. Hervé RIGNEAULT	Directeur de Recherche (Institut Fresnel, Marseille)	Rapporteur
M. David G. FERNIG	Professeur (Université de Liverpool)	Examinateur
M. Hamid KELLAY	Professeur (Université Bordeaux 1)	Examinateur
M. Brahim LOUNIS	Professeur (Université Bordeaux 1)	Directeur de Thèse

- 2007 -

A mes grands-parents.

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre durant ma thèse, que ce soit pour leur soutien ou leur intérêt pour mon travail.

Je remercie tout d'abord Fabrice Vallée, Jean-Marie Turlet et Éric Freysz, directeurs successifs du Centre de Physique Moléculaire Optique et Hertzienne, de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Je remercie Maxime Dahan et Hervé Rigneault d'avoir accepté de juger ce travail en étant rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que Dave Fernig, d'avoir accepté de venir faire partie du jury de soutenance.

Une personne clef dans la réalisation de ce travail de thèse est bien évidemment Brahim Lounis, mon directeur de thèse. Qu'il en soit remercié, en particulier pour sa confiance, son enthousiasme, même face à mon pessimisme chronique, mais également pour avoir su réunir autour de son groupe des conditions matérielles quasi-idéales.

Cette plongée au cœur des neurosciences, je la dois à Daniel Choquet qui m'a ouvert toutes grandes les portes de son groupe au laboratoire de Physiologie Cellulaire de la Synapse. Je le remercie chaleureusement de son accueil, de sa disponibilité et de sa confiance. Merci également d'avoir accepté de faire partie du jury de soutenance.

Je tiens enfin à remercier Hamid Kellay d'avoir également pris part à ce jury. Merci également de m'avoir invité, durant la seconde moitié de ma thèse, à partager et à mettre en pratique quelques unes de ses nombreuses idées de nouvelles manips.

De mon détour par l'étude des mitochondries en imagerie photothermique, je retiendrai la gentillesse et la disponibilité de Francesca De Giorgi et François Ichas, qui ont accepté de cautionner nos expérimentations sur ces pauvres organelles.

Lors de ma première venue à Bordeaux, c'est Laurent Cognet qui m'a fait visiter les laboratoires de physique mais aussi de biologie. Son enthousiasme, dès ces premiers jours, a été pour moi essentiel au cours de cet thèse. Qu'il en soit remercié, ainsi que pour la confiance et le soutien qu'il m'a témoignés, que ce soit depuis le bureau d'à-côté ou de l'autre côté de l'Atlantique.

Lors de cette première visite justement, c'est à la gouaille légendaire de Stéphane Berciaud que je dois un petit détour, aux conséquences que l'on connaît, par le groupe Nanophotonique. Un grand merci à ce valeureux « pisteur nocturne »pour son accueil, sa bonne humeur et ses précieux conseils. Je lui souhaite bon vent au pays du MacDo, en attendant de le croiser à nouveau, sortant du fin fond d'une salle de manip au petit jour.

Mes premiers pas dans le monde merveilleux de la culture cellulaire et de la transfection, mais aussi du montage-démontage de setup, je les ai fait en compagnie de Gerhard Blab, dont l'humour et la bonhomie en ont fait un compagnon de manip particulièrement appréciable. Merci aussi et surtout à « l'homme qui murmurait à l'oreille des PC »pour son aide formidable en informatique, que ce soit en Matblab ou en Blabview, selon les nouvelles dénominations en vigueur au 1er étage du CPOMH...

Puisse son Blaboscope servir à de nombreux autres thésards autant qu'il m'a servi !

Je tiens également à remercier les cryogénistes du groupe, Philippe Tamarat, Yann Louyer, Louis Biadala, Alexei Vinogradov et Olivier Labeau, dont j'ai largement apprécié la compagnie durant ces années, en particulier nos nombreuses causeries, devant un cryostat ou au Haut Carré.

Lors de mes expéditions à Bordeaux 2, j'ai eu le grand plaisir de me découvrir une seconde équipe. Merci à tous les membres du labo PCS pour leur aide au cours de ce travail, et en particulier à Laurent Groc, Martin Heine et Olivier Thoumine pour nos nombreuses discussions. Merci également à Delphine Boucher-Tessier, Christelle Breillat et Pierre Gonzales pour les cultures cellulaires, mais aussi pour leur précieux conseils et leur patience face à ma kleptomanie récurrente à chacun de mes passages. Parmi ces nombreux biologistes, il en est un, Gregory Giannone, qui a eu le courage de venir jusqu'à notre salle de manip, d'y amener ses neurones (dans tous les sens du terme) et de prendre en main le microscope photothermique. Sa bonne humeur et sa motivation, même après des contrôles négatifs positifs, ou l'inverse, ont été pour moi très agréables, et je l'en remercie. Je lui souhaite bon vent à la barre de ce beau projet.

Puisque l'on parle d'avenir, je tiens à remercier « la relève », en la personne de Vivien Octeau, qui après m'avoir subi comme prof a quand même voulu me subir comme collègue. Sa bonne humeur et son enthousiasme ont égayé ma rédaction de thèse, et je pense que ce qui fut « mon setup »est aujourd'hui entre de bonnes mains. Je lui souhaite tout ce que l'on peut souhaiter à un thésard, des résultats, des publis, et de bonnes rigolades. A un autre « jeune padawan », David Dulin, je souhaite bon vent loin de son Sud-Ouest natal. Son humour de troisième mi-temps manque déjà au CPMOH, que les parisiens sachent l'apprécier !

Une autre biologiste – pardon, biochimiste – s'est aventurée dans notre salle de manip. Merci à Laurence Duchesne pour ses précieux conseils et sa patience à nous expliquer le fonctionnement de systèmes biochimiques au nom imprononçable.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnels administratifs et techniques du CPMOH pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur efficacité. Un merci tout particulier à mon « voisin »Touati Douar qui a réalisé le microscope que j'ai utilisé chaque jour pendant trois ans.

Merci enfin à tous les membres du CPMOH pour leur accueil chaleureux, et en particulier les nombreux thésards, post-docs – et assimilés – pour leur bonne humeur. Un grand merci dans le désordre à Bruno, Émilie, Matthieu et Matthieu, à Nico (je n'oublierai jamais ces après-midis dans l'obscurité de la salle de manip !), Gilles, Amine, Hélène, Fanny, Jean-Michel, Younès, Arnaud, Yann, Louis, Stéphane, Gerhard, François et les blaireaux du 4ème Otto, Pierre et Julien. Bonne route à vous tous !

Durant cette thèse, le monitorat et ses quelques obligations collatérales m'ont donné l'occasion de rencontrer l'une des plus sympathiques bandes de gais lurons. Un grand merci aux Moniteurs – et aux « pièces rapportées »– Ludovic, Audrey, Fabien, Laetitia, Claude, Guillaume, Virginie, Laure, Tom et Émilie. Je n'oublierai pas ces nombreuses soirées en votre compagnie, bouffées d'oxygène indispensables à la survie en milieu presque exclusivement physicien !

Merci enfin à tous mes amis et à ma famille pour leur soutien.

Et un merci tout particulier à Delphine, qui m'a suivi courageusement dans cette aventure girondine, pour avoir su m'écouter parler du labo et de mes manips pendant des heures et pour m'avoir toujours soutenu. Merci d'avoir été et d'être toujours là à mes côté.

Le Havre, 9 septembre 2007.
David Lasne

Sommaire

Introduction **11**

I Microscopie de nano-objets individuels : les techniques actuelles et leurs applications en biophysique **15**

I.1 Détection de nano-objets non luminescents 16

I.1.1 Contraste Interférentiel Différentiel (DIC) 16

I.1.2 Autres méthodes basées sur la détection de l'intensité diffusée 17

I.1.3 Nouvelles approches 17

I.1.4 Applications de ces techniques à la biologie et limitations 18

I.2 Détection de nano-objets fluorescents 19

I.2.1 Principe de la fluorescence 19

I.2.2 Montages expérimentaux 20

I.2.3 Molécules fluorescentes 23

I.2.4 Nanocristaux semiconducteurs 28

I.3 Une perspective d'application de la microscopie de fluorescence en hydrodynamique 30

I.3.1 Conditions aux limites en hydrodynamique 30

I.3.2 Dispositif expérimental 32

I.3.3 Premiers résultats obtenus 34

I.4 Conclusion du Chapitre I 36

II Imagerie Photothermique Hétérodyne **39**

II.1 Détection optique de nano-objets via leur absorption 39

II.1.1 Les nanoparticules d'or : de bons candidats 39

II.1.2 Réponse optique d'une nanoparticule métallique dans l'approximation dipolaire 41

II.1.3 Résonance plasmon de surface 43

II.1.4 Effet photothermique 44

II.2 Contraste Interférentiel Photothermique 45

II.2.1 Description de la méthode 45

II.2.2 Applications de la méthode PIC à la biologie : résultats et limitations 46

II.3 Imagerie Photothermique Hétérodyne (LISNA) : réalisation expérimentale et modélisation du signal . . . 46
II.3.1 Principe de l'Imagerie Photothermique Hétérodyne . . . 46
II.3.2 Dispositif expérimental . . . 48
II.3.3 Détection de nanoparticules d'or individuelles . . . 51
II.3.4 Évaluation du signal photothermique . . . 53
II.3.5 Rapport signal à bruit . . . 62
II.4 Évaluation de l'élévation de température . . . 64
II.4.1 Position du problème . . . 64
II.4.2 Point source de chaleur . . . 65
II.4.3 Sphère source de chaleur . . . 66
II.4.4 Comparaison des deux modèles et ordres de grandeur . . . 70
II.5 Applications de la méthode LISNA en biologie *in vitro* . . . 73
II.5.1 Application aux puces à ADN . . . 73
II.5.2 Étude à l'échelle de la molécule unique du complexe FGFR :FGF :HS 76
II.6 Conclusion du Chapitre II . . . 79

III Détection et suivi de nanoparticules d'or individuelles en milieu cellulaire 81
III.1 Diffusion membranaire des récepteurs postsynaptiques . . . 81
III.1.1 Contexte général de l'étude des récepteurs postsynaptiques . . . 81
III.1.2 Mobilité des récepteurs à l'intérieur des synapses révélée par suivi de molécules fluorescentes individuelles . . . 83
III.1.3 Suivi de nanocristaux semiconducteurs individuels . . . 84
III.1.4 Questions en suspens et intérêt d'une nouvelle méthode . . . 84
III.2 Suivi Photothermique de Nanoparticules Individuelles (SNaPT) : principe et tests . . . 85
III.2.1 Nécessité d'une méthode de suivi . . . 85
III.2.2 Description de la méthode de suivi . . . 86
III.2.3 Analyse des trajectoires . . . 86
III.2.4 Tests sur trajectoires simulées . . . 88
III.3 Étude d'un système modèle : la diffusion membranaire de récepteurs postsynaptiques sur des cellules COS-7 transfectées . . . 90
III.3.1 Système biologique étudié . . . 90
III.3.2 Protocole de préparation des échantillons . . . 91
III.3.3 Images et trajectoires obtenues . . . 92
III.3.4 Suivi de fluorophores individuels (SMT) . . . 93
III.3.5 Analyse des trajectoires et comparaison entre les deux méthodes . . . 93
III.3.6 Analyse du signal mesuré en SNaPT . . . 95
III.3.7 Non-invasivité de la méthode LISNA . . . 95
III.4 Suivi de nanoparticules d'or individuelles sur neurones vivants . . . 96

III.4.1 Système biologique étudié 96
III.4.2 Protocole de préparation des échantillons 98
III.4.3 Résultats 99
III.5 Quelques perspectives 100
III.5.1 Couplage des billes d'or aux protéines d'intérêt : nouvelles approches . 100
III.5.2 Mesurer des constantes de diffusion plus élevées 100
III.6 Conclusion du Chapitre III 102
III.7 Appendice au Chapitre III : Introduction à la diffusion membranaire des récepteurs postsynaptiques 103
III.7.1 Neurones et synapses : vue générale 103
III.7.2 Biochimie de la synapse 107
III.7.3 Mémoire et plasticité synaptique 111

IV Imagerie de mitochondries par la méthode photothermique 115
IV.1 Détection spécifique des mitochondries 116
IV.1.1 Description et rôle des mitochondries 116
IV.1.2 Comparaison entre épifluorescence (MitoTracker) et LISNA 120
IV.2 Recherches sur l'origine du signal 121
IV.2.1 Dépendance spectrale du signal 122
IV.2.2 Réponse à une dépolarisation de la membrane induite par application de Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) 123
IV.2.3 Réponse à une perméabilisation de la membrane externe par application de digitonine 124
IV.2.4 Influence de différents protocoles de fixation cellulaire 125
IV.2.5 Un candidat potentiel : le cytochrome c 126
IV.3 Conclusion du Chapitre IV 127

V Spectroscopie de Corrélation d'Absorption 131
V.1 Principe et théorie de la Spectroscopie de Corrélation d'Absorption 131
V.1.1 Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) 131
V.1.2 Volume de détection 132
V.1.3 Fluctuations de signal et fonction d'autocorrélation 132
V.1.4 Fonction d'autocorrélation théorique dans le cas d'un mouvement brownien 134
V.2 Mesures du mouvement brownien de nanoparticules d'or dans des mélanges eau/glycérol 136
V.2.1 Systèmes étudiés 136
V.2.2 Dispositif expérimental et analyse des données 137
V.2.3 Temps caractéristiques mesurés pour les différentes solutions 138
V.2.4 Simulations sur l'effet de la polydispersité 139
V.3 Application à la mesure de taille de nanoparticules fonctionnalisées 140

V.3.1 Mesures par ACS 141
V.3.2 Comparaison avec la diffusion de la lumière (DLS) 142
V.4 Limitations de la FCS et intérêt de l'ACS 146
V.5 Quelques perspectives 147
V.5.1 Diffusion d'une nanoparticule fortement chauffée par laser 147
V.5.2 Étude par ACS de l'agrégation de protéines 148
V.5.3 Application à la biologie : ACS sur neurones 151
V.6 Conclusion du Chapitre V 151

Conclusion et perspectives **153**

A Profils d'écoulement hydrodynamique entre deux plaques **157**
A.1 Écoulement sans glissement 157
A.2 Cas du glissement partiel 159

B Protocoles de biologie et biochimie **161**
B.1 Culture cellulaire 161
B.2 Transfection 162
B.3 Couplage des anticorps avec des fluorophores 163

C Schéma complet du montage optique **165**

Bibliographie **181**

Index **182**

Introduction

Contexte scientifique

Les nanosciences sont au carrefour de disciplines scientifiques (biologie, chimie, physique) et techniques. Évoqué explicitement pour la première fois en 1959 par Feynman dans son célèbre discours au congrès annuel de l'American Physical Society (*« There's plenty of room at the bottom »*) [Feynman, 1960], ce champ de recherche est longtemps resté du domaine de l'expérience de pensée. Mais il connaît depuis une quinzaine d'années un véritable essor, grâce au développement de nouveaux outils d'élaboration, d'observation et d'analyse. Il est aujourd'hui possible de synthétiser de manière de mieux en mieux contrôlée, d'observer, de manipuler et de comprendre les nano-objets et leur assemblage. Notre conception du rôle du nano-objet en a d'ailleurs été modifiée : de composante élémentaire du système macroscopique, il est devenu un individu actif à part entière, avec une fonction spécifique que l'on cherche à caractériser.

Les méthodes physiques telles que les techniques de micromanipulation ou de nanophotonique se sont en particulier invitées dans les laboratoires de biologie afin d'essayer de répondre à des questions fondamentales comme les interactions entre l'ADN et certaines protéines, et ce à l'échelle de la molécule individuelle. L'essor de l'instrumentation microscopique au début du XVIIe siècle a eu un formidable impact sur le développement de la biologie, en permettant d'accéder à l'observation des entités cellulaires de dimensions micrométriques. On peut prendre alors la mesure des implications du bond quantitatif et qualitatif de plusieurs ordres de grandeur en résolution qu'apportent la nanophotonique et l'accès à l'intimité subcellulaire et moléculaire sur notre compréhension des mécanismes biologiques qui sous-tendent le fonctionnement des cellules. L'observation d'évènements moléculaires individuels dans des cellules uniques a par exemple mis en évidence le caractère stochastique de ces évènements. Comprendre comment les cellules utilisent ces fluctuations pour répondre aux variations de leur environnement représente un enjeu majeur.

C'est dans ce contexte que le groupe Nanophotonique a développé dès 2001 une étroite collaboration avec un groupe du laboratoire de Physiologie Cellulaire de la Synapse. Le but était de profiter du savoir-faire en matière détection optique de nano-objets individuels pour étudier la dynamique de protéines membranaires. Cette mise en commun des compétences a été à l'origine du travail de thèse de Catherine Tardin, de 2001 à 2004, qui a permis d'observer pour la première fois la dynamique de récepteurs postsynaptiques sur des neurones

vivants au moyen de molécules fluorescentes individuelles [Tardin et al., 2003]. Ces premières études ont ouvert la voie à une meilleure compréhension du fonctionnement de la synapse glutamatergique, tout en soulevant des questions actuellement sans réponses : quel est le rôle des lipides constituant la membrane ? La diffusion latérale des récepteurs joue-t-elle un rôle dans la diversité des réponses physiologiques des différents types de récepteurs ? Quel est le temps de résidence des récepteurs dans la synapse ?

Pour aborder ces questions, des nouvelles méthodes de détection de nano-objets individuels sont nécessaires puisque les méthodes basées sur la fluorescence de molécules uniques souffrent du problème de photoblanchiment. Ce phénomène photochimique détruit les fluorophores après typiquement quelques secondes d'illumination, ce qui limite sévèrement la durée d'observation de ces molécules. Toute possibilité d'étude systématique des variations du comportement d'un même récepteur induites par une excitation locale contrôlée est donc exclue. Récemment, des marqueurs fluorescents plus stables, les nanocristaux semiconducteurs, ont été développés et utilisés pour suivre des récepteurs postsynaptiques [Dahan et al., 2003, Groc et al., 2004]. Cependant, ceux-ci restent relativement volumineux car ils doivent être recouverts de couches de polymères ou de peptides pour être solubles et biocompatibles, ce qui peut poser problème pour étudier des phénomènes dynamiques dans un environnement aussi confiné que la fente synaptique.

C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers de nouvelles approches et en particulier la détection de nano-objets *non-luminescents* tels que les nanoparticules métalliques. En effet, celles-ci sont des marqueurs communément utilisés en biologie qui ne présentent pas de phénomène de photoblanchiment. Les méthodes classiques de détection de ces particules utilisent l'exaltation de la diffusion Rayleigh par leur résonance plasmon. Pour des tailles inférieures à 40 nm, les particules ont des sections efficaces de diffusion très faibles et deviennent indétectables par ces méthodes, en particulier dans un milieu diffusant de type cellulaire. Cependant, pour des petites tailles, la section efficace d'absorption reste importante et ne présente pas de saturation. La méthode photothermique mise au point au sein du groupe Nanophotonique permet justement de détecter des nanoparticules métalliques uniques via leur *absorption*. Comme ces particules n'émettent pas de lumière, toute l'énergie absorbée est transformée en chaleur. La variation d'indice provoquée par l'échauffement local qui accompagne cette absorption peut alors être détectée par une méthode de contraste interférentiel modulé [Boyer et al., 2002, Cognet et al., 2003]. Depuis, une nouvelle technique de détection de nano-objets non luminescents a été développée, dans laquelle on détecte directement cette variation locale d'indice optique via la diffusion qu'elle induit sur la propagation d'un faisceau sonde. Comme nous le verrons, elle a permis pour la première fois de détecter des particules d'or de quelques nanomètres de diamètre [Berciaud et al., 2004].

Cette technique semble donc bénéficier des deux avantages requis pour répondre aux questions posées plus haut : un marqueur suffisamment petit pour pouvoir explorer la fente synaptique, et une durée d'observation arbitrairement longue. C'est pourquoi cette thèse a été consacrée à l'adaptation de cette technique pour l'appliquer au travail en milieu cellulaire.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à caractériser cette technique d'imagerie photothermique appelée LISNA (*Laser Induced Scattering around a NanoAbsorber*) et ses capacités. Nous avons en particulier montré que grâce à une configuration particulière du dispositif, il était possible d'imager des nanoparticules situées à l'intérieur d'un échantillon épais, ce qui est nécessaire pour travailler sur des échantillons cellulaires. Nous avons d'ailleurs montré dans un deuxième temps que nous pouvions effectivement observer des nanoparticules d'or de 5 nm de diamètre couplées à des protéines membranaires sur des cellules vivantes. Cependant, comme la technique de détection photothermique est de type confocal, les images sont prises par balayage de l'échantillon, ce qui est trop lent pour observer la trajectoire de nanoparticules mobiles. Nous avons donc mis au point une méthode de suivi de nanoparticules, appelée SNaPT (*Single Nanoparticle Photothermal Tracking*), basée sur un algorithme de triangulation. Après avoir validé cette technique sur des trajectoires simulées puis sur cellules vivantes marquées avec des nanoparticules d'or, nous avons montré qu'il était possible de suivre des nanoparticules d'or de 5 nm sur des neurones vivants pendant plusieurs minutes. Par la suite, nous avons également développé une autre approche, appelée ACS (*Absorption Correlation Spectroscopy*), pour analyser les fluctuations de signal lors du passage de nanoparticules traversant rapidement le volume de détection, et qui permet d'en déduire leurs caractéristiques de diffusion.

Présentation du manuscrit

Ce manuscrit est organisé en cinq chapitres. Chacun est structuré de façon à permettre une lecture quasiment indépendante du reste du manuscrit. Seule la lecture du Chapitre II, qui présente la technique de détection photothermique hétérodyne, est nécessaire pour aborder les Chapitres suivants.

Le Chapitre I est consacré aux différentes techniques optiques de détection de nano-objets individuels. Nous détaillerons en particulier les méthodes basées sur la fluorescence, que ce soit au moyen de fluorophores individuels ou de nanocristaux semiconducteurs. Nous verrons différentes applications dans le domaine de la biologie, *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une perspective d'utilisation de la fluorescence pour l'étude des conditions aux limites en hydrodynamique à des échelles sub-micrométriques.

Dans le Chapitre II, nous décrirons la technique de détection de nanoparticules d'or individuelles développée au sein du groupe Nanophotonique et baptisée LISNA. Nous en présenterons les aspects théoriques (à la fois pour la partie thermique et la partie électromagnétique) et la mise en œuvre expérimentale. A ce sujet, nous caractériserons expérimentalement le signal puis nous détaillerons les possibilités offertes par cette méthode, notamment en biologie *in vitro*.

Le Chapitre III est consacré à l'application de la technique LISNA en milieu vivant pour suivre des objets biologiques mobiles. Le sujet d'étude concerne la dynamique de diffusion membranaire des récepteurs postsynaptiques. Après avoir évoqué les méthodes actuelles utilisées pour étudier ce phénomène, nous nous intéresserons à la description et à la validation

de la méthode SNaPT, basée sur la technique LISNA précédemment exposée, et qui permet de suivre des nanoparticules d'or individuelles de 5 nm de diamètre en milieu cellulaire pendant des temps arbitrairement longs. A la fin du Chapitre, un appendice est dédié à la présentation plus générale de la problématique biologique et à la description du système biologique complexe que constitue la synapse à l'attention des lecteurs n'étant pas familier avec ce domaine.

Le Chapitre IV présente quant à lui un ensemble d'expériences ayant pour but de caractériser un signal photothermique intrinsèque aux cellules. Nous verrons tout d'abord qu'il est spécifique aux mitochondries. Puis nous présenterons un ensemble de tests ayant pour but de mieux caractériser ce signal et de tenter de préciser son origine moléculaire.

Le Chapitre V enfin s'inscrit dans la continuité du Chapitre III puisqu'il présente une méthode alternative destinée à caractériser la diffusion de nanoparticules d'or très mobiles (jusqu'à des constantes de diffusion de plusieurs dizaines de $\mu m^2/s$). Cette méthode baptisée ACS est fondée sur l'analyse des fluctuations de signal au passage des nanoparticules à travers le volume de détection et des corrélations temporelles de celles-ci. C'est l'exacte analogue de la FCS, mais avec un signal basé sur l'absorption et non la fluorescence. Nous verrons que cette méthode prometteuse permet d'envisager de nombreuses applications comme la mesure de rayon hydrodynamique de nanoparticules couplées à des protéines.

Enfin, à l'issue de ces cinq Chapitres, nous résumerons les principaux résultats obtenus et nous reprendrons quelques pistes envisagées pour l'avenir concernant les thèmes abordés au cours de cette thèse.

Compte tenu du caractère très interdisciplinaire des sujets abordés ici et des formations très diverses des potentiels lecteurs, un soin particulier a été apporté afin que les passages techniques soient le plus accessibles possible. C'est pourquoi, mis à part quelques passages théoriques, de nombreux points seront volontairement traités en termes simples, le but étant de présenter les possibilités d'une nouvelle méthode à des lecteurs n'ayant pas forcément de connaissances poussées en physique. Le fonctionnement de la synapse fait quant à lui l'objet d'un long appendice au Chapitre III à l'attention des lecteurs peu familiers avec la neurobiologie.

Chapitre I

Microscopie de nano-objets individuels : les techniques actuelles et leurs applications en biophysique

Dans le cadre du développement récent des nanotechnologies et de leurs applications dans des domaines aussi variés que l'électronique ou la biologie moléculaire, de nouveaux outils de caractérisation et de visualisation sophistiqués sont nécessaires. En effet, il apparaît que les nano-objets étudiés présentent généralement une grande diversité de taille, de propriétés physiques, de fonctionnalité biologique... Une information moyenne suffit donc rarement à les caractériser. C'est pourquoi les méthodes dites « à l'échelle de l'objet unique » sont fondamentales. Elles donnent en effet accès à l'information concernant chaque objet détecté, ce qui permet d'évaluer chaque variable de manière statistique au travers de sa *distribution* (valeur moyenne, mais aussi toutes les singularités). Ceci peut par exemple s'avérer utile pour ajuster un modèle avec beaucoup plus de pertinence.

Parmi les nombreuses techniques développées ces dernières décennies, et en particulier depuis les années 90 (AFM, micromanipulation par pinces optiques ou magnétiques), les méthodes optiques présentent l'intérêt d'être généralement non-invasives. Elles bénéficient également d'une vaste panoplie de techniques bien connues (spectroscopie, optique anisotrope,...). Comme pour toute méthode optique en champ lointain, la résolution spatiale est alors fondamentalement limitée par la diffraction à des échelles de l'ordre de la longueur d'onde. Cependant, comme nous le verrons, les méthodes à l'échelle de la molécule individuelle permettent de contourner cette limite fondamentale : en utilisant des échantillons dilués, il est possible de détecter chaque objet individuel avec une très bonne précision sur sa position. Nous allons voir les principales méthodes optiques de détection de nano-objets individuels utilisées, en particulier dans le cadre d'applications en biologie, *in vitro* ou *in vivo*.

I.1 Détection de nano-objets non luminescents

Il est très difficile, au moyen des techniques de microscopie usuelles, de détecter des objets des objets de taille sub-micrométrique. En effet, ces objets sont relativement peu diffusants et un dispositif classique d'éclairage en lumière blanche n'est généralement pas adapté. Contrairement aux méthodes de fluorescence (cf. I.2, page 19), il est de plus impossible dans ce cas de séparer spectralement la lumière d'excitation et la lumière diffusée par l'objet. Il faut donc tirer parti d'autres propriétés optiques (polarisation, phase, répartition spatiale...). Plusieurs méthodes alternatives ont donc été développées pour parvenir à détecter de tels objets, soit en tirant parti d'effets de polarisation, soit en séparant spatialement la lumière d'excitation et la lumière diffusée.

I.1.1 Contraste Interférentiel Différentiel (DIC)

La première technique employée est le Contraste Interférentiel Différentiel (DIC). Développé dans les années 60, ce système utilise un prisme de NOMARSKI[1] pour séparer spatialement le faisceau d'éclairage selon deux polarisations orthogonales. Après traversée de l'échantillon, les deux faisceaux dont les fronts d'onde ont été déformés sont recombinés au moyen d'un autre prisme. Cette technique interférentielle fait ressortir avec un fort contraste les contours d'objets diffusants. Elle est très couramment utilisée afin d'obtenir des images de cellules cultivées sur lamelles [Yuste and Konnerth, 2005].

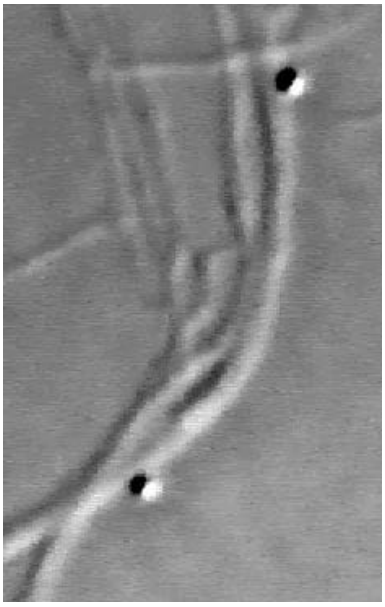

FIG. I.1 : Image en Contraste Interférentiel Différentiel de neurones en culture sur lamelle marqués avec des billes de latex de 500 nm [Borgdorff and Choquet, 2002].

En 1988, à l'aide d'un microscope à Contraste Interférentiel Différentiel couplé à un sys-

[1] Il s'agit d'une variante des prismes de WOLLASTON.

tème d'exaltation vidéo, l'équipe de M. P. Sheetz est parvenue à détecter l'intensité diffusée par des nanoparticules métalliques individuelles de 40 nm de diamètre [Gelles et al., 1988, Sheetz et al., 1989] pour étudier le fonctionnement de moteurs moléculaires *in vitro* puis sur des cellules.

I.1.2 Autres méthodes basées sur la détection de l'intensité diffusée

Deux méthodes ont été développées afin de séparer spatialement la lumière d'excitation et la lumière diffusée par l'objet, autrement dit de détecter la lumière diffusée sur un fond *noir*. La première consiste à utiliser un masque adapté pour le condenseur d'un microscope classique. La lumière diffusée est alors collectée *vers l'avant* avec un objectif de forte ouverture numérique. Il est également possible de détecter la lumière diffusée *vers l'arrière* en utilisant un objectif conçu spécialement pour ce type de microscopie. Les plus petites nanoparticules détectées par cette méthode ont des diamètres de l'ordre de 20 nm [Sonnichsen, 2001].

La seconde utilise une excitation par un champ évanescent (non-propagatif en champ lointain), généralement issu de la réflexion totale d'un faisceau lumineux à la surface d'un prisme. Seuls les modes propagatifs du champ diffusé se propagent jusqu'à un détecteur. De par sa très bonne résolution axiale (due à l'atténuation du champ évanescent), cette technique est particulièrement utile pour étudier des objets situés au niveau d'une interface ou dans son proche voisinage. Un équivalent de cette méthode pour la microscopie de fluorescence sera présenté plus loin (cf. I.2.2.a, page 21).

I.1.3 Nouvelles approches

La réponse optique d'une nanoparticule soumise à un champ extérieur est en première approximation proportionnelle au dipôle induit. Or ce dipôle est proportionnel au nombre d'électrons contenus par la nanoparticule, donc à son volume V (soit $\propto d^3$ pour une particule sphérique de diamètre d). La section efficace de diffusion (définie comme le rapport entre la puissance diffusée et l'intensité incidente) varie comme le carré du champ diffusé, lui-même proportionnel au dipôle induit de la nanoparticule. Elle est donc proportionnelle à V^2 et par conséquent décroît extrêmement rapidement lorsque la taille du nano-objet diminue. En revanche, la puissance absorbée est proportionnelle au dipôle de la nanoparticule, donc à V, et il en va de même pour le *champ* diffusé. C'est pourquoi des méthodes alternatives ont été développées pour accéder à ces grandeurs.

Plusieurs techniques sont basées sur la détection de l'absorption par des nanoparticules métalliques. Les groupes de F. Vallée (CPMOH, Bordeaux) et M. Broyer (LASIM, Lyon) ont ainsi réussi à mesurer directement la section efficace d'absorption de particules d'or individuelles jusqu'à ≈ 10 nm de diamètre en modulant la position d'une nanoparticule individuelle par rapport à un faisceau laser excitateur [Arbouet et al., 2004]. Les méthodes photothermiques que nous détaillerons dans le Chapitre II [Boyer et al., 2002, Berciaud et al., 2004] tirent également profit de cette dépendance en d^3 de la section efficace d'absorption.

Une approche alternative consiste à détecter le *champ* diffusé E_{diff} en exploitant le signal d'interférence entre ce champ et un champ laser de référence E_{ref} (en l'occurrence, le champ de référence est le champ réfléchi par l'échantillon). En 2004, l'équipe de V. SANDOGHDAR est ainsi parvenue à détecter des nanoparticules individuelles d'environ 5 nm de diamètre [Lindfors et al., 2004, Jacobsen et al., 2006]. Dans ce cas, le signal détecté peut s'écrire :

$$S \propto \left|E_{ref} + E_{diff}\right|^2 = |E_i|^2 \left(r^2 + |s|^2 - 2\,r\,|s|\sin\theta\right) \tag{I.1}$$

où r est le coefficient de réflexion du champ incident sur l'échantillon et $|s|\sin\theta$ désigne l'amplitude du champ diffusé. Le premier terme dans cette expression correspond au fond réfléchi. Le deuxième terme est proportionnel à l'intensité diffusée et varie comme d^6. Il s'agit de la contribution dominante du signal pour des nanoparticules volumineuses. Le troisième terme, proportionnel à $|s|$ (donc à d^3), correspond à la contribution du champ diffusé amplifiée par le coefficient de réflexion r. Pour des nanoparticules suffisamment petites ($d < 20$ nm), ce terme l'emporte sur l'intensité diffusée (cf. Chapitre II, FIG. II.1). Cette technique permet en outre de travailler en champ large avec un montage optique simple [Jacobsen et al., 2006], ce qui est un atout considérable pour étudier des processus dynamiques.

Une technique similaire a été développée par l'équipe de L. NOVOTNY. Elle a permis de détecter *en temps réel* des nanoparticules de 14 nm de diamètre en écoulement dans un canal microfluidique [Ignatovich and Novotny, 2006]. A la différence du montage de LINDFORS *et al.*, ce dispositif utilise un détecteur à deux quadrants permettant de mesurer l'amplitude du champ diffusé sur un fond *noir*.

I.1.4 Applications de ces techniques à la biologie et limitations

On parle souvent de Suivi de Particules Uniques, ou Single Particle Tracking (SPT), pour faire référence aux méthodes (généralement basées sur le DIC) utilisant des nanoparticules d'or ou de latex de 40 nm à quelques microns pour suivre le mouvement d'objets biologiques individuels, avec deux principaux intérêts : la durée d'observation est virtuellement infinie, et l'acquisition sur une caméra CCD est simple et peut se faire à haute cadence [Ritchie et al., 2005]. Elle a été largement utilisée pour étudier les propriétés de diffusion de protéines membranaires, ce qui a permis de montrer l'existence de barrières de diffusion dues au cytosquelette [Kusumi and Sako, 1996]. Dans le domaine des neurosciences, cette technique a permis au groupe de Daniel CHOQUET de mettre en évidence la grande diversité des modes de diffusion des récepteurs de neurotransmetteurs sur des neurones vivants [Meier et al., 2001, Borgdorff and Choquet, 2002] (cf. III.1, page 81). Dans la plupart des cas, les particules sont fixées à l'objet d'intérêt (protéine,...) au moyen d'anticorps adsorbés sur l'or (les groupements thiols, présents sur certains acides aminés, ont en particulier une forte affinité pour l'or) ou le latex.

La méthode développée par l'équipe de V. SANDOGHDAR a pu être utilisée pour des observations biophysiques *in vitro* [Jacobsen et al., 2006], en l'occurrence des nanoparticules d'or

de 40 nm fixées à des kinésines en mouvement sur des microtubules. Pour ce faire, Jacobsen *et al.* utilisent la dépendance spectrale de la réponse des nanoparticules (la résonance plasmon de surface, cf. II.1.3, page 43) et soustraient deux images prises à 532 et 488 nm, ce qui améliore de manière significative le contraste au niveau des nanoparticules.

Cependant, et nous y reviendrons, si ces méthodes présentent des avantages liés à la stabilité du signal, elles souffrent pratiquement toutes de la même limitation : le champ diffusé décroît très rapidement avec la taille des objets étudiés, et l'intensité d'autant plus. Ceci est d'autant plus vrai en milieu biologique car le fond est très important du fait de la présence de nombreux objets diffusants (organelles...). On est alors obligé d'utiliser des marqueurs relativement gros (40 nm de diamètre et plus). Ceci peut poser des problèmes d'encombrement stérique dans l'étude de dynamiques en environnements confinés, tels que les fentes synaptiques ou les vésicules d'endocytose.

I.2 Détection de nano-objets fluorescents

La seconde grande famille de méthodes de détection de nano-objets individuels utilise la fluorescence de certaines molécules ou de nanocristaux semiconducteurs, avec de très nombreuses applications en biologie. On excite cette fluorescence à des longueurs d'onde qu'il est possible de séparer très efficacement de celles de la lumière émise, décalées vers le rouge, ce qui en fait une méthode sur fond *noir*. Il est ainsi possible aujourd'hui de détecter des molécules fluorescentes *individuelles*. Si les premiers travaux ont été réalisés à température cryogénique [Orrit and Bernard, 1990], les molécules fluorescentes uniques sont désormais observables relativement facilement à température ambiante. Ces techniques ont en effet bénéficié d'importants développements au niveau de la qualité des filtres optiques interférentiels, mais aussi de l'efficacité de détection et du bruit des détecteurs.

I.2.1 Principe de la fluorescence

On peut modéliser un nano-objet fluorescent par un système à trois niveaux électroniques (Fig. I.2). Cette approche très générale permet d'appréhender la photophysique des nano-objets couramment utilisés, comme les molécules fluorescentes ou les nanocristaux de CdSe. L'absorption a lieu vers un état excité $|e'\rangle$, à partir duquel les photons absorbés relaxent très rapidement vers le premier niveau excité le plus bas $|e\rangle$. La relaxation à partir du niveau $|e\rangle$ vers l'état fondamental $|f\rangle$ peut s'effectuer via émission d'un photon (recombinaison radiative) ou éventuellement par l'intermédiaire de processus non radiatifs. Le photon alors émis est de moindre énergie que celui utilisé pour l'excitation et peut donc être séparé spectralement au moyen de filtres optiques.

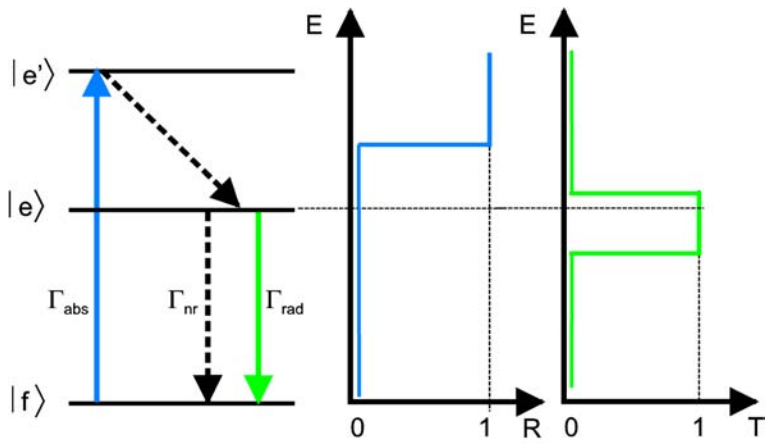

FIG. I.2 : Diagramme d'énergie schématique d'un nano-objet individuel luminescent. La courbe de réflexion du filtre dichroïque et la courbe de transmission du filtre passe bande utilisés en microscopie de fluorescence (cf. I.2.2, page 20) sont représentées.

I.2.2 Montages expérimentaux

L'imagerie de fluorescence de molécules uniques peut s'avérer délicate à réaliser pour deux raisons principales. D'une part, le signal détecté doit provenir d'une seule molécule, ce qui impose une préparation particulière de l'échantillon : en général, on utilise de faibles concentrations de fluorophores afin de pouvoir les séparer spatialement ($\lesssim$ 1 molécule par µm^2). D'autre part, la puissance émise par une seule molécule est extrêmement faible, aussi le fond doit-il être réduit au maximum afin que le signal issu de la molécule domine toutes les sources de fond.

I.2.2.a Montage d'épifluorescence

Les techniques d'épifluorescence ont été largement développées dans les années 90 [Schmidt et al., 1995, Dickson et al., 1996]. Elles sont en grande partie à l'origine de l'essor des études de biophysique à l'échelle de la molécule unique.

L'excitation est réalisée *en champ large* avec un faisceau collimaté (FIG. I.3 (a)). Pour cela, on focalise le faisceau excitateur dans le plan focal arrière de l'objectif. Les photons de fluorescence émis vers l'arrière sont alors collectés avec le même objectif de microscope et traversent le miroir dichroïque, alors que le faisceau excitateur réfléchi par l'échantillon subit une nouvelle réflexion au niveau du miroir dichroïque. La lumière de fluorescence est filtrée spectralement puis focalisée sur une caméra équipée d'une matrice CCD (Charge Coupled Device) refroidie. Le plan image de l'objectif est ainsi conjugué avec la surface du détecteur. Le champ large éclairé (typiquement 30×30 µm^2) est ensuite visualisé à l'aide d'un logiciel d'acquisition. La cadence est en général de quelques dizaines de Hz (elle dépend essentiellement du nombre de pixels utilisés).

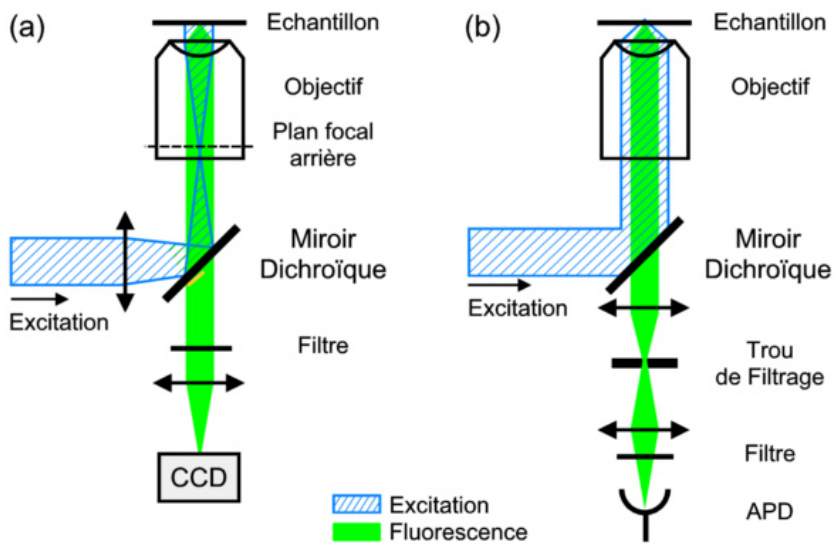

Fig. I.3 : Microscopie de fluorescence : (a) montage d'épifluorescence ; (b) montage de microscopie confocale.

La résolution transverse de la microscopie d'épifluorescence est identique à celle des techniques de microscopie classique. Elle est donnée par la limite de diffraction de l'objectif de microscope [Born and Wolf, 1959] :

$$R_{e,t} = \frac{1.22\lambda}{2ON} \tag{I.2}$$

où ON désigne l'ouverture numérique de l'objectif utilisé.

La résolution axiale est de l'ordre du micron, dans le cas général. Elle s'écrit :

$$R_{e,a} = \frac{2n\lambda}{ON^2} \tag{I.3}$$

où n désigne l'indice optique de l'objet.

Il existe une variante de cette méthode qui utilise une onde évanescente pour exciter des fluorophores au voisinage d'une paroi. Deux alternatives sont possibles. On peux utiliser un prisme posé sur l'échantillon (Fig. I.4 (a)). L'onde évanescente est alors produite à l'interface verre/eau supérieure de l'échantillon. L'autre approche utilise la même excitation qu'en épifluorescence classique, mais en décalant le faisceau incident de manière à ce qu'il éclaire l'échantillon sous un angle supérieur à l'angle critique de l'interface verre/eau inférieure de l'échantillon (Fig. I.4 (b)). Ce deuxième montage est appelé montage de Fluorescence à Réflexion Totale Interne (TIRF). L'intérêt de cette méthode d'illumination est qu'elle permet de n'exciter que les objets fluorescents proches de l'interface, ce qui limite le fond dû aux fluorophores éventuellement présents en solution.

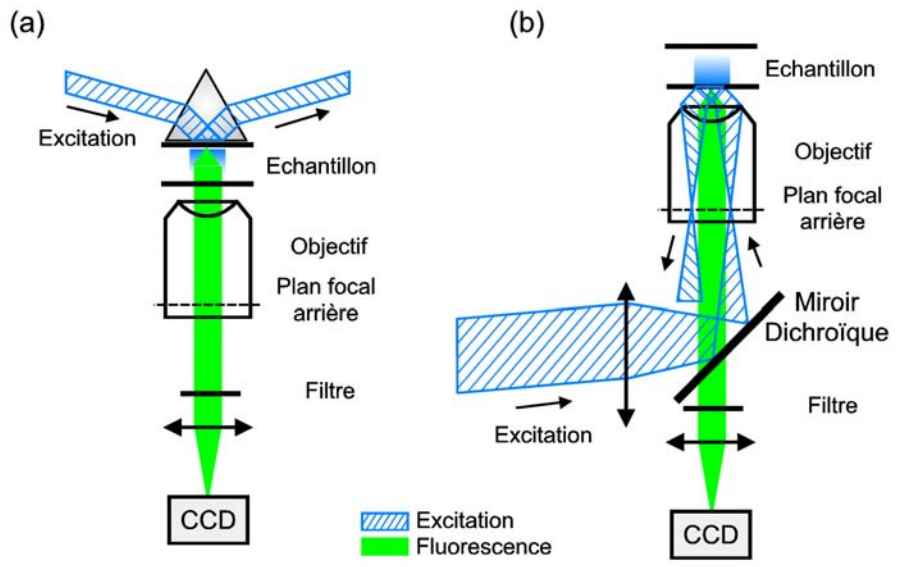

FIG. I.4 : Montages à onde évanescente : (a) à prisme ; (b) à réflexion totale interne (TIRF).

I.2.2.b Montage confocal

L'excitation est ici réalisée au moyen d'un faisceau laser focalisé par l'objectif de microscope, n'excitant ainsi qu'une très petite zone de l'échantillon appelée volume confocal (FIG. I.3 (b)). Le faisceau de luminescence est recueilli avec le même objectif et séparé du faisceau excitateur réfléchi par un miroir dichroïque (Fig. 1.2 (b)). Afin de détecter uniquement les photons issus du volume confocal, le signal de luminescence est filtré spatialement à l'aide d'un diaphragme (trou d'épingle) de faible diamètre (30 à 100 µm) conjugué avec le point d'excitation. On réalise ensuite l'image optique de ce point sur le détecteur, qui est alors lui aussi conjugué avec le volume confocal. Cette sélection spatiale améliore sensiblement la résolution transverse par rapport au dispositif d'épifluorescence. Elle s'écrit [Wilson and Sheppard, 1984] :

$$R_{c,t} = \frac{0.875\lambda}{2ON} \tag{I.4}$$

De même, la résolution axiale est améliorée car le diaphragme coupe la lumière en provenance des points lumineux hors focus. Un optimum est à trouver entre la perte de luminosité et la résolution axiale, mais celle-ci peut être inférieure au micron dans les meilleurs cas. Les détecteurs les plus fréquemment utilisés sont des photodiodes à avalanche (APD) du fait de leur grande sensibilité. Cependant la surface active du détecteur est souvent suffisamment faible pour réaliser le filtrage spatial sans avoir recours à un trou d'épingle. De plus, l'illumination est concentrée à une certaine profondeur dans l'échantillon, ce qui réduit le fond de manière drastique. Afin d'acquérir des images confocales, l'échantillon est généralement placé

sur un scanner piézo-électrique permettant un balayage à 2 voire 3 dimensions sur plusieurs dizaines de microns. Pour des dispositifs plus rapides, on peut utiliser un échantillon fixe balayé par un faisceau de détection dévié par des miroirs galvanométriques.

I.2.3 Molécules fluorescentes

I.2.3.a Molécules de colorants

Les fluorophores de synthèse tirent leurs propriétés de doubles liaisons alternées dont les électrons peuvent se délocaliser, sur l'espace qu'elles occupent à l'intérieur de la molécule. Dans un modèle simple, on pourrait considérer que les électrons composant ces doubles liaisons se déplacent librement à l'intérieur d'une boîte dont la largeur est celle de la zone occupée par les doubles liaisons conjuguées. Ainsi, comme pour un puits de potentiel infini, les écarts d'énergie entre l'état fondamental et les niveaux excités diminuent lorsque la largeur de la boîte augmente. Ceci implique que les spectres d'absorption et d'émission se déplacent vers le rouge lorsque la zone de délocalisation s'accroît. Ce principe s'étend aux composés cycliques.

Les cyanines sont une famille de fluorophores dont le motif principal est constitué de doubles liaisons alternées. Un exemple concret est donné par les cyanines Cy3 et Cy5 (Amersham Biosciences), qui possèdent respectivement deux et trois doubles liaisons conjuguées, et dont les pics maxima d'émission sont centrés sur 568 nm et 670 nm (Fig. I.5). De la même façon, les Alexa (Molecular Probes) sont composées d'un nombre plus ou moins grand de cycles benzéniques. La zone de délocalisation des électrons appartenant aux doubles liaisons conjuguées est donc plus ou moins étendue, ce qui permet d'obtenir des fluorophores dans tout le spectre visible.

Les fluorophores sont largement utilisés depuis plusieurs décennies en biologie pour mettre en relief certains composants ou régions cellulaires (noyau, membranes, mitochondries, synapses...) mais aussi comme indicateurs locaux de pH ou de présence d'ions (Ca^{2+}, Cl^{-}...). Dans ce cas, un marquage relativement fort est employé, et le signal est important. Comme pour toute méthode de microscopie usuelle, la résolution est alors limitée par diffraction à quelques centaines de nanomètres. Pour ces applications, il est généralement nécessaire de fonctionnaliser ces fluorophores afin qu'ils viennent marquer spécifiquement l'objet d'intérêt. Le plus couramment, c'est une réaction chimique qui permet de réaliser une liaison covalente entre le fluorophore et la protéine (voir par exemple le protocole employé en annexe B.3). Il existe néanmoins des molécules ayant naturellement une affinité pour certains domaines cellulaires. Citons par exemple la classe de molécules de type POPO, YOYO, TOTO... qui sont des intercalants de l'ADN. Ces molécules sont chargées positivement et présentent des cycles (ce sont généralement des dimères de cyanines), ce qui leur permet de se placer dans les plans situés entre les bases de l'ADN. Utilisées pour de nombreuses expériences de biophysique à l'échelle de la molécule unique, elles servent aussi pour de nombreuses expériences dans lesquelles l'ADN est employé en tant que polymère modèle [Perkins et al., 1994].

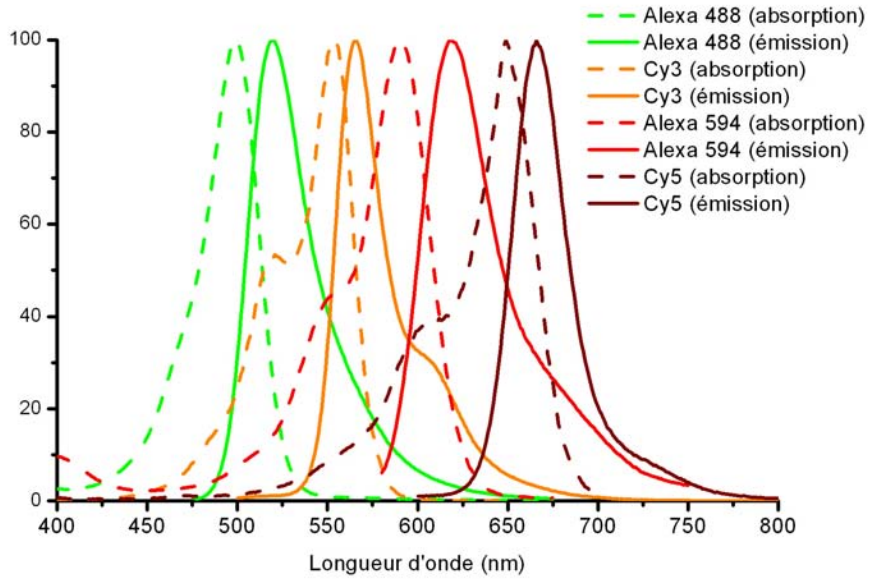

FIG. I.5 : Spectres d'absorption et d'émission de quelques fluorophores de synthèse (couplés à des anticorps). Source : `http ://probes.invitrogen.com/servlets/spectra/`

I.2.3.b Protéines fluorescentes

Il existe une protéine naturellement fluorescente, appelée *Green Fluorescent Protein* (GFP). Issue d'une méduse appelée *Aequorea Victoria*, elle a été découverte en 1962 [Shimomura et al., 1962]. Mais ce n'est que dans les années 90 que son intérêt est réellement apparu, lorsque son gène a été isolé, cloné [Prasher et al., 1992] et transfecté dans d'autres cellules [Chalfie et al., 1994, Inouye and Tsuji, 1994]. Sa structure cristallographique a permis de comprendre l'origine (complexe) de son caractère fluorescent [Cody et al., 1993], lié à une réaction interne à la protéine entre trois acides aminés. Elle possède deux pics d'absorption, à 397 et 477 nm, et un pic d'émission à 510 nm, d'où son nom.

Depuis, le génie génétique a permis de réaliser des mutants de la GFP absorbant et émettant à différentes longueurs d'onde [Tsien, 1998]. Le premier, baptisé eGFP (pour *enhanced*), est une variante de la GFP dont la bande d'absorption a été déplacée à 490 nm : ce chromophore peut ainsi être excité aisément par la raie 488 nm de l'argon. Deux mutants, la CFP (pour *Cyan*) et la BFP (pour *Blue*), ont un spectre décalé vers le bleu, et un autre, YFP (pour *Yellow*) est décalé vers le rouge (FIG. I.6).

D'autres protéines fluorescentes ont été découvertes depuis, telles que la DsRed , protéine issue du corail *Discosoma* [Matz et al., 1999]. Celle-ci suscite un grand intérêt car contrairement aux mutants de la GFP qui émettent à des longueurs d'onde où l'autofluorescence des cellules est importante, son maximum d'émission se situe à 583 nm (FIG. I.6). Un inconvénient cependant : la DsRed est une protéine naturellement tétramérique, même à très

faible concentration [Lounis et al., 2001], ce qui peut perturber le système biologique en induisant des agrégations artificielles. Un mutant monomérique a été obtenu récemment, mais son rendement de fluorescence est plus faible [Campbell et al., 2002].

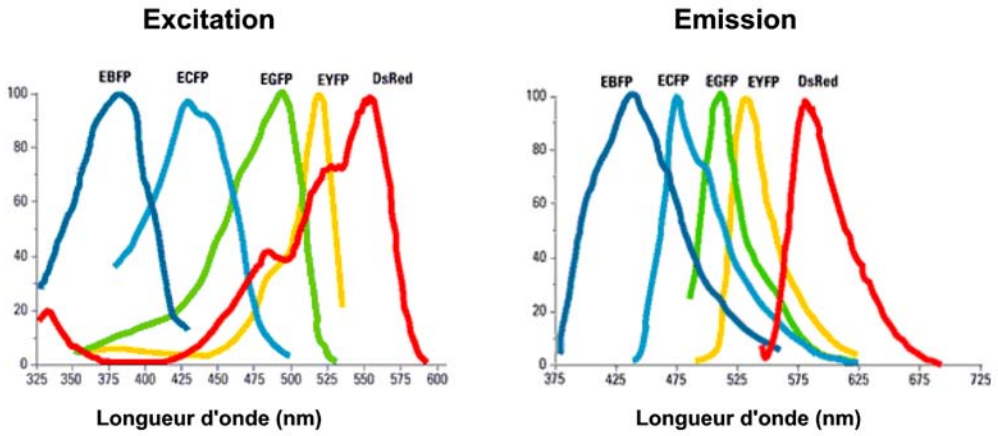

Fig. I.6 : Spectres d'absorption et d'émission des mutants de la GFP et de la DsRed.

Malgré leur photostabilité relativement faible (cf. I.2.3.d), la GFP et ses mutants sont très intéressants car ils peuvent être utilisés comme marqueurs grâce à la fusion du gène correspondant avec celui codant pour une protéine d'intérêt. Le tout est inséré dans un plasmide qui pourra être introduit dans une cellule par transfection. Les protéines alors exprimées par la cellule, fluorescentes, sont des chimères, pour lesquelles il convient tout de même de vérifier que les fonctions d'origine de la protéine d'intérêt sont préservées.

Mis à part ces cas particuliers, les protéines ne sont généralement pas fluorescentes car aucun acide aminé isolé n'absorbe dans le visible. Les acides aminés possédant un cycle benzénique, comme la phénylalanine, la tyrosine et la tryptophane, absorbent dans les UV, aux environs de 280 nm. Il existe cependant quelques protéines fluorescentes comme les cofacteurs d'enzyme que sont les NAD ou les FAD. Les flavines, telles que la FAD (*Flavin adenine dinucleotide*), absorbent vers 470 nm et émettent vers 530 nm. Les NAD(P)H (*Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)*), absorbent dans le proche UV (vers 360 nm) et émettent vers 460 nm. Cependant, leurs propriétés photophysiques étant fortement dépendantes de l'activité cellulaire, elles ne peuvent pas servir comme marqueurs fiables. Leur présence dans les cellules constitue simplement une source de fond. Si cette autofluorescence reste généralement faible, on privilégie dans la mesure du possible des fluorophores émettant au-delà de 550 nm pour éliminer ce signal.

I.2.3.c Suivi de molécules uniques

Il est souvent intéressant, comme nous l'avons rappelé dans l'introduction de ce Chapitre, de suivre des marqueurs *individuels* pour accéder à toute la distribution des dynamiques des objets étudiés. Dans ce cas, on utilise un marquage suffisamment faible pour être capable de séparer spatialement les objets fluorescents observés.

En épifluorescence, les séquences vidéo obtenues sont analysées au moyen d'algorithmes adaptés afin de reconstituer la trajectoire d'objets individuels, comme nous le verrons (cf. III.3.4, page 93). Si la résolution est limitée par la diffraction, la précision de pointé pour un objet ponctuel (définie comme l'incertitude sur la position du *maximum* de signal, cf. FIG. I.7) est en première approximation inversement proportionnelle au rapport signal-à-bruit [Thompson et al., 2002]. Elle est généralement de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres et peut atteindre le nanomètre dans les meilleurs cas [Schmidt et al., 1995] [Thompson et al., 2002, Yildiz et al., 2003]. On peut donc accéder à la position de molécules individuelles avec une excellente précision.

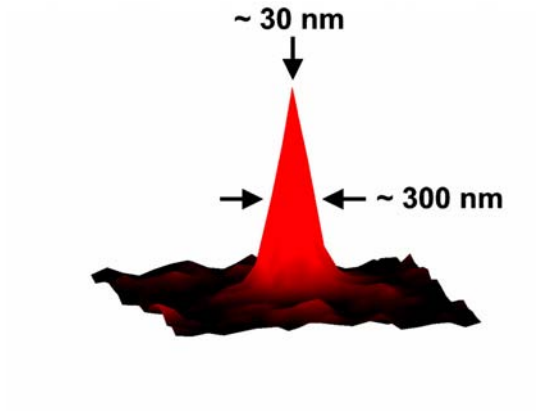

FIG. I.7 : Représentation 3D du signal de fluorescence d'une molécule individuelle : si la largeur (à mi-hauteur) est limitée par diffraction, l'incertitude sur la position du maximum de signal est bien inférieure lorsque le rapport signal à bruit est important.

Les méthodes de balayage, telles que la microscopie confocale, sont généralement trop lentes pour permettre de reconstituer la trajectoire à partir d'images successives. D'autres méthodes de suivi de molécules uniques ont été proposées dans ce cas, par exemple en utilisant une illumination en rotation [Enderlein, 2000]. La technique SNaPT, qui fait l'objet du Chapitre III, permet de même de suivre des objets individuels à partir d'une méthode de détection (LISNA) de type confocal.

Dans ce type d'expériences de suivi de fluorophores individuels, les molécules fluorescentes (autres que les protéines du type GFP) peuvent être employées seules, à l'échelle de la molécule individuelle et non modifiées, comme sondes de leur environnement. Le cas le plus courant est l'utilisation de fluorophores comme marqueurs d'un écoulement complexe. HELLRIEGEL *et al.* ont par exemple utilisé la diffusion brownienne de molécules fluorescentes pour sonder des

cavités dans des milieux mésoporeux [Hellriegel et al., 2004]. Nous verrons (cf I.3, page 30) que des molécules individuelles peuvent également être utilisées dans le but de sonder un écoulement sur des échelles nanométriques.

Si le fluorophore lui-même n'est pas l'objet d'intérêt (ou s'il ne s'agit pas d'une protéine autofluorescente), il est couplé à ce dernier par des méthodes chimiques ou biochimiques (voir par exemple le protocole de couplage présenté en annexe B.3, page 163). Cette technique a été largement utilisée pour suivre la diffusion de protéines membranaires individuelles sur cellules vivantes [Schmidt et al., 1996, Schutz et al., 2000, Ueda et al., 2001, Harms et al., 2001, Tardin et al., 2003], mais aussi pour de nombreuses études *in vitro* [Harada et al., 1999] [Kabata et al., 2000, Yildiz et al., 2003].

Deux avantages font des méthodes de suivi de molécules uniques par fluorescence des outils très puissants dans de nombreux domaines de la biologie : la mise en œuvre expérimentale en est aujourd'hui relativement simple, et les fluorophores individuels sont de *très petits marqueurs* ($\sim 1\ nm$) qui perturbent donc peu la biomolécule à laquelle ils sont fixés tout en lui laissant la possibilité d'accéder à des régions très confinées.

I.2.3.d Le problème du photoblanchiment

Malheureusement, une molécule fluorescente s'éteint de manière irréversible après un certain nombre de cycles de fluorescence (typiquement de l'ordre de 10^5). Cette brusque annulation du signal, appelée *photoblanchiment*, est caractéristique d'un fluorophore unique (ce phénomène est d'ailleurs parfois utilisé comme critère pour justifier de l'observation d'un fluorophore *unique*). A contrario, le signal d'un ensemble de fluorophore décroît lui aussi, mais de manière continue (ou éventuellement par paliers), au fur et à mesure que chaque molécule s'éteint (si elles n'ont pas d'interaction). Évidemment, ceci impose une limitation forte aux expériences de suivi de molécules uniques employant des fluorophores individuels : la durée d'observation est réduite à quelques secondes dans les conditions usuelles d'observation.

Ce phénomène, qui joue un rôle crucial en microscopie de fluorescence, a été largement étudié d'un point de vue photophysique [Zondervan et al., 2004], mais ses mécanismes restent mal connus. Lors de son photoblanchiment, un fluorophore porté dans un état excité subit une réaction photochimique qui le convertit en une espèce non fluorescente qu'il est en effet difficile de caractériser.

Le photoblanchiment d'un fluorophore dépend des espèces présentes dans le solvant. En particulier, le dioxygène dissous a une action bien connue. C'est pourquoi la stratégie la plus couramment employée pour limiter le photoblanchiment est de réduire la concentration de dioxygène dissous à proximité des molécules. Pour cela différentes méthodes ont été mises en oeuvre, soit en faisant circuler un gaz inerte dans l'échantillon, tel que l'argon ou de l'azote [Deschenes and Vanden Bout, 2001], soit en ajoutant un mélange d'antioxydants enzymatiques, principalement de la catalase et du glucose oxydase, dans le milieu [Harada et al., 1990, Yildiz et al., 2003]. Ces stratégies ont effectivement conduit à l'appauvrissement en dioxygène dissous, et à des durées d'observation supérieures de 1 à 2 ordres de

grandeur, cependant le phénomène n'est pas totalement supprimé. En fait, ces méthodes ne sont utilisables que pour des expériences *in vitro*, car les recettes d'antioxydants contiennent des composés hautement toxiques pour les cellules, comme le β-mercaptoéthanol.

Bien évidemment, une autre alternative est également possible, si la taille du marqueur n'est pas un critère déterminant : on peut utiliser des nanosphères de polystyrène dopées avec des fluorophores, d'une taille de quelques dizaines de nanomètres de diamètre. Si l'on y perd en termes d'encombrement, on y gagne évidemment en termes de stabilité du signal. Chaque bille est en effet chargée d'un grand nombre de fluorophores et le signal, s'il décroît lentement, est très important et suffisamment stable pour permettre une observation sur des temps longs.

I.2.4 Nanocristaux semiconducteurs

I.2.4.a Description

Les nanocristaux semiconducteurs, ou Quantum Dots (*points quantiques*, QDs), sont des nanostructures constituées d'un cristal semiconducteur de quelques nanomètres de diamètre (le cœur, ou *core* dans la littérature anglo-saxonne), généralement entouré d'une coquille (*shell*) faite d'un autre matériau semiconducteur (FIG. I.8).

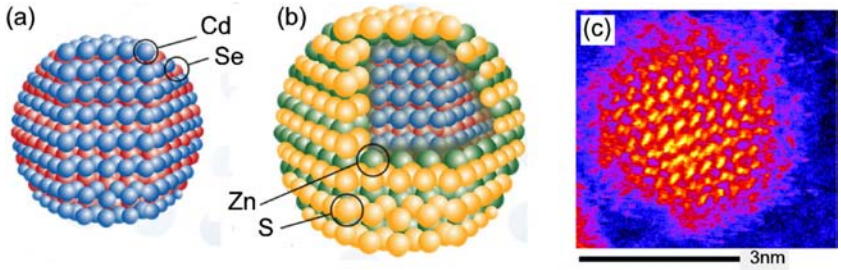

FIG. I.8 : (a) Vue schématique d'un nanocristal de CdSe. (b) Vue schématique d'un nanocristal cœur-couronne de CdSe/ZnS. (c) Image de microscopie électronique haute résolution d'un nanocristal de CdSe (d'après [McBride et al., 2004]).

Dans de telles structures, les porteurs de charges sont confinés dans les trois directions de l'espace d'où leur nom usuel anglo-saxon. Ceci se traduit par des propriétés optoélectroniques tout à fait remarquables. En effet, comme dans un puits de potentiel infini, les niveaux d'énergie accessibles sont discrets et l'on se rapproche alors du comportement d'un atome unique. Les QDs se caractérisent par une large bande d'absorption dans l'UV et le visible, et un pic d'émission de fluorescence lié à la taille du cœur et qui peut donc être ajusté en modifiant leurs dimensions (FIG. I.9).

I.2.4.b Quelques applications

A l'origine synthétisés en matrice vitreuse (les nanocristaux semiconducteurs entrent par exemple dans la composition de nombreux filtres colorés), les nanocristaux colloïdaux ont

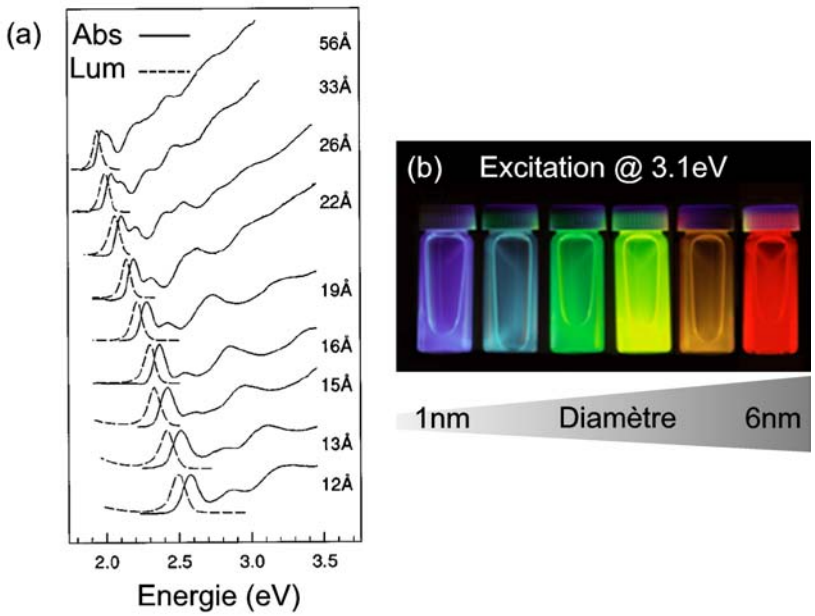

Fig. I.9 : (a) Spectres d'absorption et d'émission de nanocristaux de CdSe de différentes tailles (d'après [Efros et al., 1996]) ; les spectres d'absorption ont été obtenus à partir d'une excitation dans le proche ultraviolet. (b) Mise en évidence de l'accordabilité de l'émission des nanocristaux de CdSe en fonction du diamètre.

connu un nouvel essor au cours des années 90 grâce aux synthèses en solution organique. Actuellement, les nanocristaux semiconducteurs sont utilisés dans des expériences d'optique quantique [Lounis et al., 2000, Michler et al., 2000, Brokmann et al., 2004], mais aussi pour des applications au développement de nouvelles sources laser [Klimov et al., 2000]. Des nanocristaux cœur/coquille de CdSe/ZnS très brillants et photostables (le photoblanchiment n'apparaît qu'après typiquement 10 fois plus de cycles de fluorescence que pour les fluorophores organiques) sont désormais disponibles commercialement.

En raison des propriétés de luminescence très intéressantes de ces nano-objets, de nombreuses applications biologiques ont vu le jour ces dernières années [Michalet et al., 2005]. Comme pour les molécules fluorescentes, on trouve deux types d'utilisation. Avec un marquage fort, les nanocristaux semiconducteurs sont utilisés pour colorer des tissus ou des organelles [Bruchez et al., 1998, Dubertret et al., 2002], comme pour repérer des cellules cancéreuses [Wu et al., 2003] ou en phase d'apoptose [Le Gac et al., 2006]. Avec un marquage plus faible, ils sont utilisés comme sonde pour des expériences de suivi de molécules individuelles, pour l'étude de la dynamique de protéines membranaires [Dahan et al., 2003, Groc et al., 2004], mais aussi à l'intérieur de cellules [Courty et al., 2006].

I.2.4.c Limitations

Si les nanocristaux semiconducteurs bénéficient d'une meilleure résistance au photoblanchiment que les molécules fluorescentes, ces nano-objets présentent un autre phénomène photophysique bien particulier : le clignotement, ou *blinking*. Cet effet est dû au piégeage de l'électron excité dans la matrice qui entoure le nanocristal, ce qui bloque la luminescence jusqu'à son retour. Ceci complique généralement l'analyse des trajectoires de suivi de molécules uniques car il faut reconnecter, lorsque cela est possible, les traces interrompues. De plus, ce phénomène a lieu à toutes les échelles de temps [Nirmal et al., 1996, Kuno et al., 2000], ce qui fait qu'il est quasiment impossible de le contourner en jouant par exemple sur le temps d'intégration du signal.

Par ailleurs, les nanocristaux utilisés en biologie sont entourés d'une couche organique pour assurer leur solubilité en milieu aqueux, car ils sont généralement synthétisés en milieu non polaire, mais aussi pour limiter leur toxicité vis-à-vis des cellules vivantes [Chang et al., 2006]. Différentes stratégies ont été développées, telles que l'utilisation de polymères, de polysaccharides, de phospholipides ou de peptides [Michalet et al., 2005]. Cette étape est suivie d'une fonctionnalisation, comme pour tout marqueur biologique. Il en résulte une taille de quelques dizaines de nanomètres qui peut poser problème dans le cas d'études en milieu très confiné, comme la fente synaptique [Groc et al., 2004].

I.3 Une perspective d'application de la microscopie de fluorescence en hydrodynamique : sonder l'écoulement d'un liquide près d'une paroi

Avant de nous intéresser à la nouvelle méthode de détection de nano-objets individuels développée dans notre groupe et ses applications en biologie, nous allons voir une perspective d'application des méthodes de microscopie de fluorescence présentées jusque là. Il s'agit d'une étude à l'échelle de la molécule unique dans le cadre de l'hydrodynamique. Suite à ces premières expériences, ce travail se poursuivra dans le cadre d'une future thèse en collaboration avec l'équipe d'H. KELLAY.

I.3.1 Conditions aux limites en hydrodynamique

I.3.1.a Rapide historique

Le but de cette expérience est de sonder les conditions aux limites à l'interface entre un liquide et une paroi à l'échelle nanométrique. La condition aux limites de *non-glissement*, qui suppose que la couche de fluide au contact d'une paroi se déplace à la même vitesse que cette dernière, si elle ne peut pas être démontrée par des considérations hydrodynamiques (qui s'appuient sur une description continue et mésoscopique du fluide), a été largement démontrée dans de nombreuses expériences macroscopiques dès le XVIIIe siècle, avec les

travaux de Bernoulli [Bernoulli, 1738] et de Coulomb [Coulomb, 1801]. D'autres modèles de conditions aux limites ont été imaginés par la suite. Girard [Girard, 1815] a proposé un modèle de conditions aux limites à *couche stagnante*, dans lequel une fine couche de fluide reste à la même vitesse que la paroi, tandis que le reste du fluide glisse sur cette couche dont l'épaisseur pourrait varier selon la température et les interactions entre le fluide et la paroi. Un peu plus tard, Navier [Navier, 1823] a évoqué l'hypothèse d'un *glissement partiel* à la paroi, en introduisant le paramètre b, appelé *longueur ou profondeur de glissement*, qui correspond à la distance, à l'intérieur de la paroi, pour laquelle la vitesse du fluide atteint zéro par interpolation (Fig. I.10). Un glissement parfait correspondrait à $b \to \infty$, et la vitesse ne varierait pas au voisinage de la paroi.

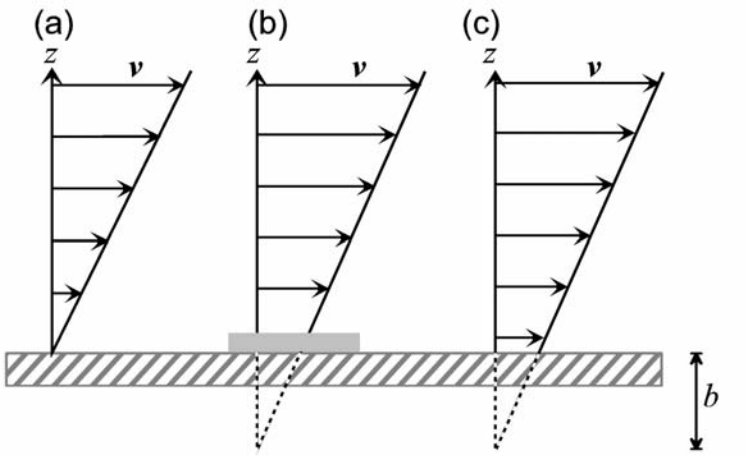

Fig. I.10 : Profils de vitesse schématiques pour des conditions aux limites de *non-glissement* (a), à *couche stagnante* (b) et de *glissement partiel* (c). Dans ce dernier cas, le glissement est caractérisé par la profondeur de glissement b.

Si elle a fait l'objet de nombreux débats aux XIXe siècle, l'hypothèse de non-glissement a fini par s'imposer comme base théorique pour la plupart des calculs d'hydrodynamique. On pense qu'elle prend ses origines dans le piégeage de molécules de fluide sur des défauts de l'interface et les interactions attractives entre molécules du fluide et du solide. Durant la majeure partie du XXe siècle, il était généralement accepté que le glissement, s'il existait, était généralement trop faible pour pouvoir être observé et qu'il dépendait essentiellement de la mouillabilité, et donc de la tension superficielle du fluide.

I.3.1.b Nouvelles techniques expérimentales

Cependant, depuis la fin du XXe siècle, le développement de techniques extrêmement sensibles pour mesurer des interactions et des déplacements à l'échelle du nanomètre a permis à la recherche sur les conditions aux limites d'être revisitée via de nouvelles approches expérimentales.

On peut distinguer deux types de méthodes : les méthodes indirectes et les méthodes

locales. Les premières consistent en l'analyse de données expérimentales généralement macroscopiques qui traduisent des propriétés microscopiques. Par exemple, il est possible de mesurer le débit dans un tube capillaire en fonction de la pression imposée : selon les conditions aux limites, les résultats seront différents. Les méthodes locales ont pour but de sonder directement l'écoulement en utilisant des traceurs. La Vélocimétrie par Image de Particules (PIV, pour *Particle Image Velocimetry*) utilise des billes de quelques centaines de nanomètres généralement fluorescentes imagées au moyen d'une simple caméra CCD et d'impulsion laser assez courtes pour éviter les effets de flou. Les trajectoires sont obtenues par corrélations entre images successives. La technique FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) utilise des marqueurs fluorescents. A un instant donné, une impulsion laser intense provoque le photoblanchiment des molécules présentes dans la zone illuminée (cf. I.2.3.d, page 27). Dans les instants qui suivent, l'écoulement (combiné à la diffusion brownienne) apporte de nouvelles molécules fluorescentes dans cette zone. L'évolution de la répartition de fluorescence en fonction du temps permet de retrouver des informations sur les propriétés de l'écoulement.

Au regard des nombreuses expériences réalisées ces dernières années [Neto et al., 2005, Lauga et al., 2005], plusieurs paramètres se dégagent comme jouant un rôle important dans l'existence ou non d'un glissement :

- la rugosité de la surface tend à réduire le glissement ;
- le glissement est plus important sur une surface non mouillante, pour laquelle l'interaction avec le fluide est plus faible ;
- le taux de cisaillement pourrait jouer un rôle, même si cet effet est controversé ;
- la présence de gaz dissous et de bulles à l'interface peut conduire à un glissement ;
- un certain nombre d'autres facteurs sont susceptibles d'entrer en ligne de compte, telles que les propriétés chimiques ou électrostatiques du solide et du fluide.

Cependant, peu de techniques permettent à ce jour de visualiser l'écoulement près d'une paroi sur des échelles sub-micrométriques, en particulier du fait de la taille des marqueurs. C'est pourquoi nous avons voulu montrer l'intérêt d'utiliser des sondes fluorescentes de taille nanométrique et un dispositif d'imagerie de fluorescence en onde évanescente (TIRF) pour sonder ces phénomènes.

I.3.2 Dispositif expérimental

I.3.2.a Cellule d'écoulement

Une cellule d'écoulement a été réalisée, constituée d'une lamelle de microscope fixe et d'une seconde placée à quelques dizaines de microns au-dessus au moyen d'une vis micrométrique (FIG. I.11 (a)). Cette seconde lamelle est également montée sur une cale piézo-électrique alimentée par une tension oscillante de manière à la faire vibrer à des fréquences de 30 à 300 Hz. L'écoulement oscillant ainsi créé entre les deux lamelles est radial, et son profil transverse est proche de celui d'un écoulement de POISEUILLE (cf. calculs dans l'Annexe A, page 157).

Les lamelles de microscope ont été nettoyées par plasma. Une goutte de liquide (en l'occur-

rence de l'eau pure pour ces premières expériences) d'une centaine de microlitres est déposée et écrasée entre les deux lamelles. Les solutions employées sont marquées au moyen de sondes fluorescentes. Les premières expériences présentées ici utilisent des billes de polystyrènes fluorescentes (Orange Fluorescent Nanospheres, Molecular Probes) de 40 nm de diamètre éclairées au moyen d'un laser Nd :Yag. Des molécules individuelles fluorescentes (Atto647, ...) peuvent également être utilisées (sous onde évanescente uniquement) afin de s'approcher au plus près de la paroi. Les spectres d'absorption et d'émission des deux types de fluorophores, bien séparés, permettent de placer les deux types de sondes dans le même échantillon et de les visualiser alternativement en jouant sur les filtres et lasers d'excitation (HeNe et Nd :Yag doublé, Fig. I.11 (b)). Le montage de fluorescence peut basculer d'une configuration épifluorescence à une configuration TIRF (cf. I.2.2.a, page 21). La fluorescence est imagée sur une caméra CCD refroidie illuminée par l'arrière, le temps d'intégration étant typiquement de 20 ms (légèrement variable selon la fréquence d'excitation de la cellule).

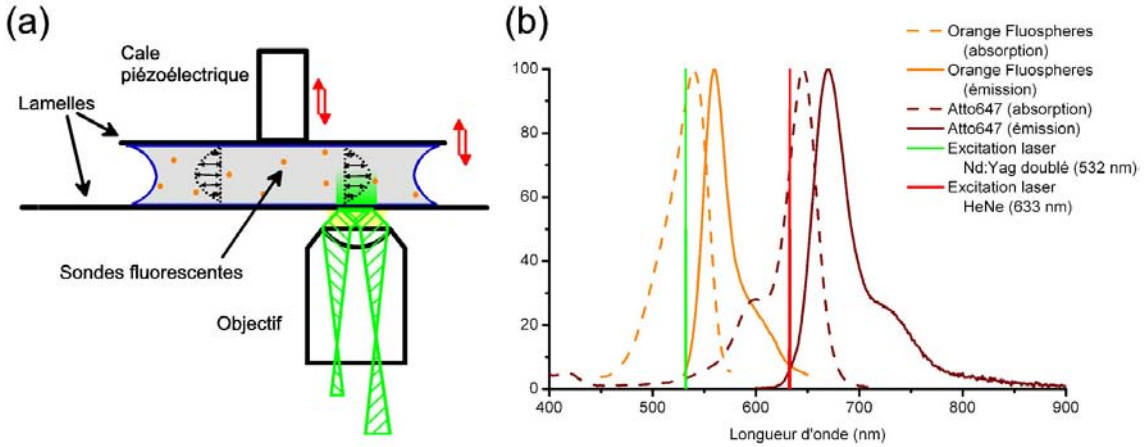

Fig. I.11 : (a) Schéma du dispositif expérimental employé. (b) Spectres d'absorption et d'émission des sondes fluorescentes utilisées.

Sous l'effet de l'excitation oscillante, les sondes fluorescentes effectuent plusieurs allers-retours le long des lignes de courant, mais en restant dans le champ de la caméra. Les séquences vidéo obtenues montrent donc des traînées dont la longueur est proportionnelle à la vitesse (pendant une demi-période $T/2$, la sonde parcourt une distance $\Delta x = V.T/2$). Lors de nos expériences, on se place latéralement à une distance de quelques millimètres du centre de l'échantillon (la vitesse est d'autant plus grande) et on optimise l'élongation observée au centre de l'écoulement en jouant sur l'épaisseur de la cellule et la fréquence d'excitation.

I.3.2.b Onde évanescente

Pour créer l'onde évanescente en configuration TIRF, le faisceau laser est focalisé dans le plan focal arrière de l'objectif, mais en dehors de l'axe. Il arrive ainsi en faisceau parallèle sur l'échantillon, avec un angle que l'on peut régler. Or l'indice optique du verre n_1 est supérieur

à celui du liquide n_2, il existe donc un angle limite au-delà duquel le faisceau est totalement réfléchi. En fait, un calcul électromagnétique simple montre que l'on obtient dans le second milieu une *onde évanescente* (c'est-à-dire dont l'intensité décroît exponentiellement avec la distance au dioptre) et propagative parallèlement au dioptre (dans la direction donnée par l'onde incidente) :

$$\mathbf{E_t}(x,z,t) = \mathbf{E_0} e^{-z/\delta} e^{i(\omega t - k"_x x)} \tag{I.5}$$

La *profondeur de pénétration* δ de l'onde évanescente et le module d'onde $k"_x$ sont donnés par les expressions suivantes :

$$\delta = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2\theta - n_2^2}} \text{ et } k"_x = k_x \sin\theta \tag{I.6}$$

où λ est la longueur d'onde, ω la pulsation, k_x la composante du vecteur d'onde parallèle à l'interface et θ l'angle d'incidence de l'onde électromagnétique incidente.

Enfin, l'intensité lumineuse décroît elle aussi exponentiellement, mais avec une profondeur de pénétration 2 fois moindre :

$$I(z) = I_0 e^{-2z/\delta} \tag{I.7}$$

I.3.3 Premiers résultats obtenus

Deux méthodes d'analyse ont été employées pour évaluer la longueur des traînées, selon qu'elles sont longues (profil de vitesse mesuré en épifluorescence dans toute l'épaisseur du canal) ou courtes (faibles élongations près de la paroi, en onde évanescente).

I.3.3.a Profil de vitesse dans l'écoulement

Les nanosphères fluorescentes de 40 nm sont suffisamment brillantes et stables pour permettre de les observer en épifluorescence dans tout le volume de l'échantillon. Dans ce cas, le profil est reconstitué en effectuant une série d'acquisitions à différentes profondeurs dans l'échantillon. Partant d'une mise au point sur des objets voisins de la surface, on déplace l'échantillon sur une distance connue. On mesure alors la longueur σ_x et la largeur σ_y de quelques traînées nettes (FIG. I.12 (a)). On accède ainsi à l'ensemble du profil de vitesse à l'échelle micrométrique (FIG. I.12 (b)). On en déduit l'élongation relative $\varepsilon = \frac{\sigma_x}{\sigma_y} - 1$, qui servira de grandeur caractéristique, jusqu'à environ un micron de la surface.

I.3.3.b Étude expérimentale sous onde évanescente

Afin de sonder l'écoulement sur des distances inférieures au micron, nous avons utilisé une illumination en onde évanescente grâce à un montage en réflexion totale interne (cf. I.2.2.a, page 21 et I.3.2.b, page 33). Ce dispositif a été largement employé pour ce type d'études [Yamada, 1999, Jin et al., 2004, Huang et al., 2006], mais avec des sondes de plusieurs centaines de nanomètres de diamètre. Il présente un double avantage : seules les sondes proches

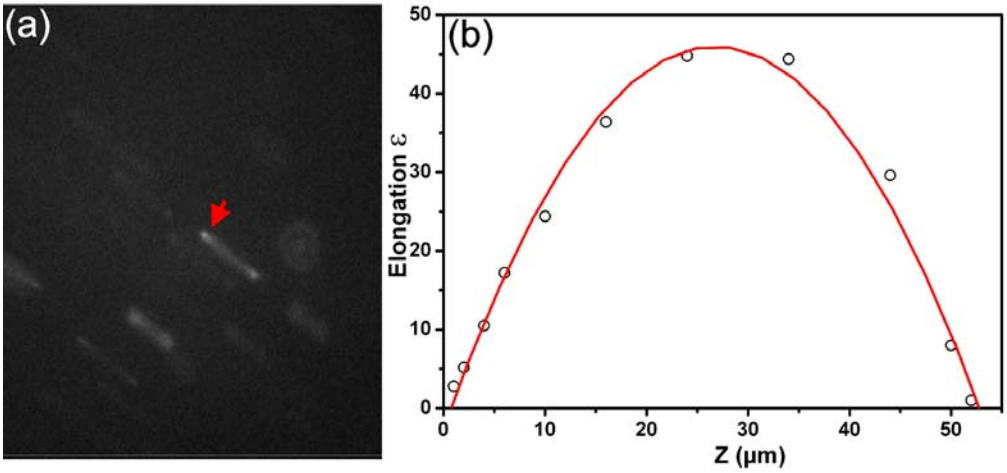

Fig. I.12 : (a) Image de particules fluorescentes de 40 nm de diamètre étirées sous l'effet de l'écoulement oscillant à 4 µm de la paroi inférieure de la cellule. Seules les particules nettes, donc au focus (flèche rouge) sont prises en compte (les autres, plus ou moins étirées, correspondent à d'autre couches de l'écoulement). (b) Profil d'élongation (proportionnelle à la vitesse) en fonction de la distance à la paroi inférieure de la cellule (∘). Il peut être convenablement ajusté par un profil de Poiseuille, quadratique (—).

de la paroi sont suffisamment excitées pour donner du signal, ce qui limite le bruit de fond, et il existe alors une relation entre l'intensité d'excitation et la distance à la paroi :

$$I(z) = I_0 e^{-\frac{2z}{\delta}} \tag{I.8}$$

En admettant que l'efficacité d'absorption et de fluorescence γ d'un type de marqueur est constant, on a donc une relation directe entre le signal collecté S et la position de la sonde par rapport à la paroi :

$$S(z) = \gamma I(z) = \gamma I_0 e^{-\frac{2z}{\delta}} = S_0 e^{-\frac{2z}{\delta}} \tag{I.9}$$

La figure I.13 montre une image de billes fluorescentes de 40 nm de diamètre éclairées sous onde évanescente. Elle illustre le fait que l'intensité de fluorescence décroît lorsque les particules sont éloignées de la paroi et étirées.

Pour ce type d'expériences, nous avons analysé les images de fluorescence au moyen d'un programme sous Matlab qui détecte les objets lumineux et interpole le signal avec une gaussienne à deux dimensions. Les largeurs à mi-hauteur σ_x et σ_y sont différentes selon deux axes, l'un dans la direction de l'écoulement et l'autre perpendiculaire. On évalue alors l'élongation en calculant le rapport d'aspect $\varepsilon = \frac{\sigma_x}{\sigma_y} - 1$. Par ailleurs, le programme donne l'intensité totale cumulée de chaque pic de signal. Afin de faire le lien entre l'intensité et la distance, nous avons cependant besoin de deux données : I_0, l'intensité maximale au niveau de la paroi, et δ, la profondeur de pénétration de l'onde évanescente.

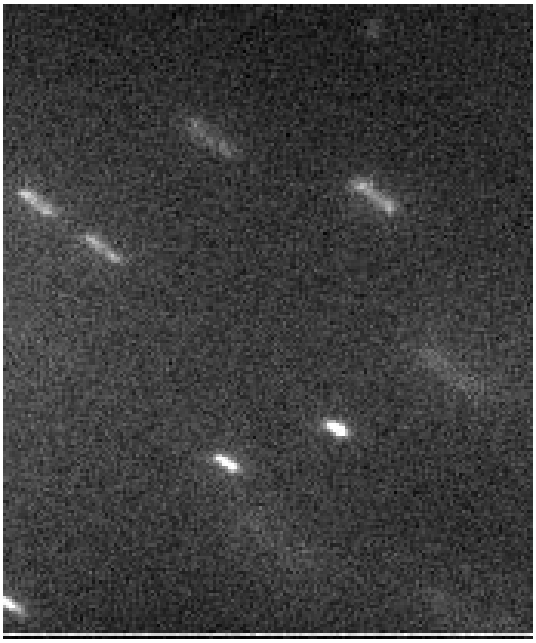

FIG. I.13 : Image de particules fluorescentes de 40 nm de diamètre étirées sous l'effet du l'écoulement oscillant à la paroi inférieure de la cellule, éclairées sous onde évanescente.

Tout d'abord, l'intensité maximale I_0 devrait être un paramètre facilement mesurable. Mais en réalité, on constate une grande dispersité du signal de fluorescence des sondes, que l'on peut remarquer même lorsqu'elles sont simplement déposées sur une lamelle dans un film de polymère. Ceci peut provenir de plusieurs facteurs : la polydispersité en taille des nanosphères, l'efficacité variable des fluorophores, mais surtout le photoblanchiment qui fait décroître progressivement le signal des nanosphères dopées. Ceci induit une forte dispersion sur les signaux observés à une distance donnée par rapport à la paroi et l'analyse des données s'en trouve compliquée. La profondeur de pénétration δ de l'onde évanescente quant à elle devra être mesurée, par exemple en déplaçant une fibre optique dans le champ évanescent au moyen d'un piezo-électrique.

Il reste donc un certain nombre de contrôles et de calibrations à réaliser afin de pouvoir extraire de manière fiable le profil de vitesse près de la paroi. Après validation de la méthode, la prochaine étape consistera ensuite à changer les interactions entre le fluide (éventuellement un fluide complexe d'ailleurs) et la paroi, en utilisant différents traitements de surface.

I.4 Conclusion du Chapitre I

Nous avons décrit dans ce Chapitre différentes stratégies employées pour détecter des nano-objets individuels. Nous avons vu leurs intérêts, mais aussi leurs limitations, ainsi que diverses applications dans le cadre de la biologie et de la biophysique. Nous avons également

proposé une application de la microscopie de fluorescence dans le cadre de l'étude d'écoulements hydrodynamiques à petite échelle. Dans les Chapitres suivants, nous allons nous intéresser à une technique fondée sur la détection de nano-objets non luminescents via leur absorption, ainsi que différentes variantes dans la perspective d'applications en neurobiologie principalement.

Chapitre II

Imagerie Photothermique Hétérodyne

Nous avons vu les nombreuses possibilités offertes par les méthodes basées sur la luminescence, mais aussi leurs limitations, en particulier le photoblanchiment (cf. I.2, page 19). Les méthodes basées sur la diffusion Rayleigh, si elles bénéficient d'une bonne stabilité en termes de signal, sont par contre le plus souvent limitées à des tailles de nano-objets de l'ordre de 40 nm et plus, en milieu diffusant du moins. En effet, comme nous l'avons vu (cf. I.1.3, page 17), la section efficace de diffusion σ_{diff} décroît très rapidement avec la taille de l'objet étudié (comme $\propto d^6$ pour une sphère de diamètre d). Par contre, la section efficace d'absorption σ_{abs} diminue beaucoup moins vite aux petites tailles ($\propto d^3$ pour une sphère de diamètre d), ce qui fait que pour des nanoparticules métalliques de taille inférieure à ~ 20 nm, l'absorption est beaucoup plus importante que la diffusion (cf. Fig. II.1).

C'est pourquoi de nouvelles approches ont été développées, en particulier au sein du groupe Nanophotonique, pour essayer de détecter des objets nanométriques via leur absorption. Comme nous allons le voir dans ce Chapitre, ces méthodes ont permis de détecter des nanoparticules métalliques de taille bien inférieure à 20 nm, puisque grâce à la méthode PHI développée durant la thèse de S. Berciaud, on est parvenu imager des agrégats d'or de 1.4 nm de diamètre [Berciaud et al., 2004].

II.1 Détection optique de nano-objets via leur absorption

II.1.1 Les nanoparticules d'or : de bons candidats

Différents types de nano-objets ont pu être détectés via leur absorption, et en particulier par la méthode photothermique hétérodyne [Berciaud, 2006]. Pour être un bon candidat à ce type de détection, le nano-objet étudié doit en effet être un bon absorbant, ce qui signifie qu'il doit présenter une forte section efficace d'absorption mais aussi un temps de relaxation non radiative rapide afin de pouvoir l'exciter fortement sans saturation. Les nanoparticules métalliques constituent un système particulièrement intéressant car elles répondent à ces deux critères.

Tout d'abord, leur section efficace d'absorption est relativement élevée, en particulier

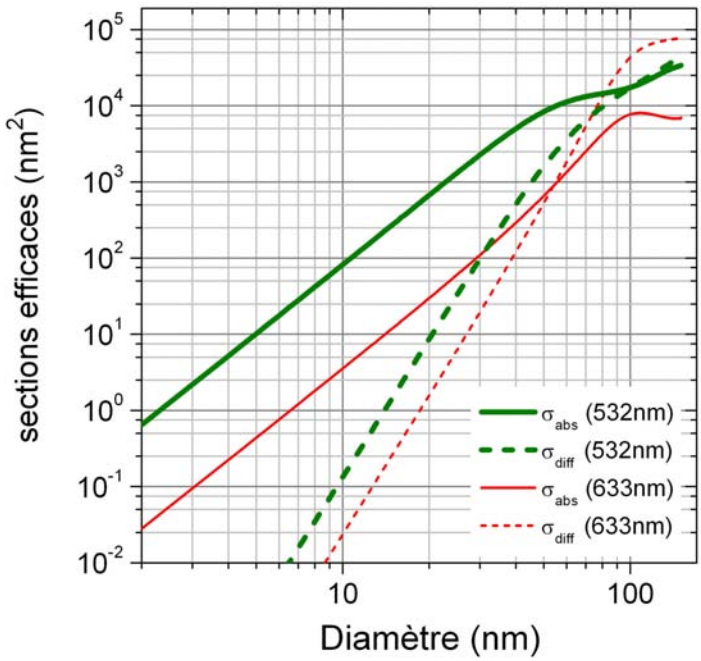

FIG. II.1 : Sections efficaces d'absorption et de diffusion de nanoparticules d'or insérées dans un milieu d'indice $n_m = 1.5$ (constante diélectrique $\varepsilon_m = 2.25$) en fonction du diamètre. Les valeurs sont calculées d'après la théorie de Mie [Mie, 1908, Bohren and Huffman, 1983] à 532 nm et 633 nm, deux longueurs d'onde laser usuelles. Figure extraite de [Van Dijk et al., 2006].

au voisinage de leur résonance plasmon de surface (cf. II.1.3, page 43) qui se situe dans le vert pour des nanoparticules d'or (ceci explique la couleur rouge en transparence des solutions colloïdales d'or). La section efficace d'absorption d'une nanoparticule d'or de 5 nm de diamètre autour de la résonance plasmon de surface est environ 100 fois plus importante que celle d'un bon colorant (qui est de l'ordre de 10^{-16} à 10^{-15} cm^2 à température ambiante). De plus, leur luminescence étant très faible, presque toute l'énergie absorbée est dissipée de manière non radiative, sous forme de chaleur, ce qui est fondamental pour la détection photothermique.

Par ailleurs, dans les métaux, l'énergie absorbée est rapidement transférée aux électrons de conduction qui subissent des collisions avec un temps caractéristique de l'ordre de la dizaine de femtosecondes. Le gaz d'électrons hors équilibre se thermalise en quelques centaines de femtosecondes [Link and El Sayed, 1999, Voisin et al., 2000]. Les collisions électron-phonon assurent la thermalisation du gaz d'électrons avec le réseau ionique après environ 1 ps [Link and El Sayed, 1999]. Ceci permet donc d'exciter les nanoparticules métalliques de manière importante sans problème de saturation. La nanoparticule atteint ensuite l'équilibre thermique avec la matrice extérieure avec un temps caractéristique plus long variant entre 1 à 100 ps [Bigot et al., 2000, Link and El-Sayed, 2003] (et cf. II.4, page 64).

Enfin, dans l'optique d'une utilisation en milieu biologique, il est à noter que les na-

noparticules d'or sont relativement faciles à solubiliser en milieu aqueux, et qu'elles sont peu cytotoxiques, tout au moins aux concentrations utilisées [Connor et al., 2005]. Les nanoparticules d'argent pourraient également être utilisée. Elles ont l'avantage de présenter une résonance plasmon environ 10 fois plus intense que celle de l'or et d'être excitées à une longueur d'onde différente, leur résonance plasmon se situant vers 400 nm, ce qui permettrait un marquage à deux « couleurs ». Cependant, cette longueur d'onde est plus nocive pour les échantillons cellulaires, et les nanoparticules d'argent sont également cytotoxiques à l'état brut [Hussain et al., 2005]. C'est pourquoi nous nous sommes limités à l'utilisation de nanoparticules d'or dans la suite de ce travail.

II.1.2 Réponse optique d'une nanoparticule métallique dans l'approximation dipolaire

L'interaction avec un champ électromagnétique plan et monochromatique, noté **E**, d'une sphère métallique homogène, de constante diélectrique relative complexe ε, plongée dans un milieu diélectrique homogène de constante diélectrique relative ε_m, est décrite dans le cadre de la théorie de Mie. Celle-ci consiste à résoudre les équations de Maxwell en prenant en compte la symétrie sphérique du système, les relations de passage à la surface de la sphère, et les conditions aux limites [Born and Wolf, 1959]. Lorsque la taille des particules devient très inférieure à la longueur d'onde, le premier ordre du développement de la théorie de Mie suffit à décrire les phénomènes observés : le champ incident de longueur d'onde λ crée une distribution de charges accumulées à l'interface nanoparticule/matrice. Cette distribution est assimilée à un petit dipôle unique **p** (Fig. II.2).

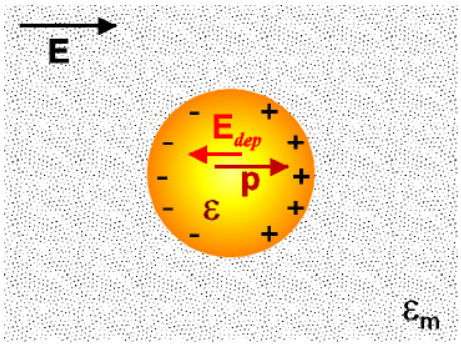

Fig. II.2 : Interaction entre une nanoparticule métallique de diamètre d et un champ extérieur dans l'approximation quasistatique.

Le moment dipolaire de la nanoparticule $\mathbf{p} = \mathbf{P}\,V$ est proportionnel au champ extérieur appliqué via la polarisabilité $\widetilde{\alpha}$.

$$\mathbf{p} = \varepsilon_0 \varepsilon_m \widetilde{\alpha} \mathbf{E} \tag{II.1}$$

Ce moment dipolaire crée à son tour un champ de dépolarisation qui s'oppose à **E** et qui

peut se calculer [Bohren and Huffman, 1983] :

$$\mathbf{E}_{dep} = -\frac{\mathbf{P}}{3\varepsilon_0\varepsilon_m} \tag{II.2}$$

Le champ à l'intérieur de la nanoparticule $\mathbf{E}_{int}$ est la somme du champ extérieur et du champ de dépolarisation . Il est donc proportionnel à $\mathbf{E}$.

$$\mathbf{E}_{int} = \mathbf{E} + \mathbf{E}_{dep} \tag{II.3}$$

Le champ $\mathbf{E}_{int}$ peut être calculé de fonction du champ dans la matrice $\mathbf{E}$ en utilisant les conditions de continuité à la surface de la nanoparticule. Il s'écrit :

$$\mathbf{E}_{int} = \frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m}\mathbf{E} \tag{II.4}$$

La polarisabilité de la nanoparticule s'écrit finalement :

$$\widetilde{\alpha} = 3V\frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \tag{II.5}$$

On définit les sections efficaces d'extinction, d'absorption et de diffusion par :

$$\sigma_{ext} = \frac{W_{abs} + W_{diff}}{I_0} \tag{II.6}$$

$$\sigma_{abs} = \frac{W_{abs}}{I_0} \quad et \quad \sigma_{diff} = \frac{W_{diff}}{I_0} \tag{II.7}$$

où W_{abs} et W_{diff} sont respectivement les puissances absorbée et diffusée et I_0 l'intensité du faisceau incident. La première étant liée à la partie du dipôle induit en quadrature par rapport au champ imposé et la seconde au carré de ce dipôle induit, ces sections efficaces se déduisent de $\widetilde{\alpha}$ par [Bohren and Huffman, 1983] :

$$\sigma_{ext} = k\,\mathrm{Im}\,[\widetilde{\alpha}] \tag{II.8}$$

$$\sigma_{diff} = \frac{k^4}{6\pi}\,|\widetilde{\alpha}|^2 \tag{II.9}$$

et s'écrivent donc :

$$\sigma_{ext} = 3V\,\varepsilon_m^{3/2}\,\frac{\omega}{c}\,\frac{3\varepsilon_2}{(\varepsilon_1 + 2\varepsilon_m)^2 + (\varepsilon_2)^2} \tag{II.10}$$

$$\sigma_{diff} = (3V)^2\,\varepsilon_m^2\,\left(\frac{\omega}{c}\right)^4\,\frac{(\varepsilon_1 - \varepsilon_m)^2 + (\varepsilon_2)^2}{(\varepsilon_1 + 2\varepsilon_m)^2 + (\varepsilon_2)^2} \tag{II.11}$$

où ε_1 et ε_2 sont respectivement les parties réelle et imaginaire de ε.

On retrouve la dépendance en ω^4 de σ_{diff}, caractéristique de la diffusion RAYLEIGH de particules nanométriques. Pour une même nanoparticule, le rapport des sections efficaces de

diffusion et d'extinction est proportionnel au volume V :

$$\frac{\sigma_{diff}}{\sigma_{ext}} \propto \frac{V}{\lambda^3} \tag{II.12}$$

Ainsi pour des nanoparticules beaucoup plus petites que la longueur d'onde, l'extinction est largement dominée par l'absorption (Fig. II.1) et nous avons :

$$\sigma_{abs} \approx \sigma_{ext} \tag{II.13}$$

II.1.3 Résonance plasmon de surface

Lors de l'excitation des électrons de conduction engendrée par l'interaction avec un champ électromagnétique extérieur, il existe parfois une condition de résonance. En effet, les constantes diélectriques dépendent de la longueur d'onde employée et d'après l'équation (II.4), l'exaltation du champ à l'intérieur de la nanoparticule est susceptible d'être résonante à condition qu'il existe une pulsation ω_R qui minimise le module du dénominateur $|\varepsilon + 2\varepsilon_m|$. Cette condition peut être satisfaite dans les métaux pour lesquels la partie réelle de la constante diélectrique ε_1 est négative dans le domaine optique.

Au voisinage de ω_R, le confinement diélectrique conduit à une résonance dans le spectre d'absorption et de diffusion d'une nanoparticule métallique (cf. (II.10, page 42) et (II.11, page 42)) : c'est le phénomène de *résonance plasmon de surface*. D'un point de vue classique, le champ extérieur exerce une force sur les électrons qui constituent la nanoparticule métallique. Le champ polarise donc le cortège électronique en créant une accumulation de charges négatives d'un côté de la nanoparticule (et donc une charge positive non compensée de l'autre côté). L'interaction entre cette densité de charge surfacique et le réseau ionique chargé positivement (dans et en dehors de la nanoparticule) et se traduit par une force de rappel. A résonance, le centre de masse du nuage électronique oscille à la fréquence du champ appliqué autour de sa position d'équilibre. En oscillant, la densité surfacique de charge rayonne un champ dont l'intensité, proportionnelle à σ_{diff}, est maximale à ω_R.

De nombreux paramètres entrent en jeu dans la position et la largeur de la résonance plasmon. Sa position dépend bien évidemment de la nature du métal (dans le vert pour l'or et le bleu pour l'argent), mais aussi de la matrice. Enfin, la taille et la forme des nanoparticules jouent aussi un rôle. On retiendra essentiellement que la résonance plasmon se décale vers le rouge lorsque la taille augmente (Fig. II.3) pour des raisons purement électrodynamiques (effets *extrinsèques*) : au-delà de 10 nm de diamètre typiquement, des effets de retard entrent en jeu et l'approximation dipolaire perd sa validité. Il faut alors prendre en compte les termes suivant dans le cadre de la théorie de Mie. Aux plus petites tailles, à cause de modifications de la constante diélectrique lorsque la taille des objets devient petite par rapport au libre parcours moyen des électrons (effets *intrinsèques*), on assiste plutôt à un élargissement de cette bande de résonance. Ces derniers ont fait l'objet d'une étude approfondie dans le cadre de la thèse de Stéphane Berciaud [Berciaud et al., 2005b].

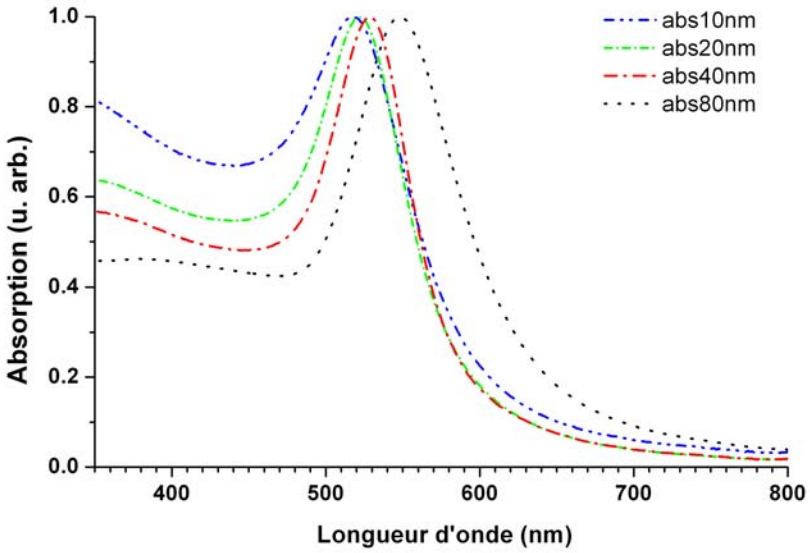

FIG. II.3 : Spectres d'absorption de solutions colloïdales d'or pour des diamètres moyens de nanoparticules de 10 à 80 nm. La résonance se décale vers le rouge lorsque la taille augmente.

II.1.4 Effet photothermique

L'effet photothermique correspond à des variations des propriétés optiques d'un milieu suite à l'absorption d'une onde lumineuse incidence et à l'élévation de température qui en résulte. En particulier, il apparaît un gradient d'indice optique n au voisinage de la région chauffée. De nombreux travaux ont exploité cet effet pour sonder les propriétés de différents milieux [Stone, 1972], y compris biologiques [Lapotko et al., 2002], en utilisant généralement un faisceau de chauffage et un second faisceau peu absorbé servant de sonde. Dans ces expériences, c'est un effet de lentille thermique [Leite et al., 1964, Gordon et al., 1965], ou de mirage, qui est à l'origine des perturbations de la sonde. En effet, les dimensions de la zone chauffée sont bien supérieures à la longueur d'onde, et les lois de l'optique géométrique sont bien adaptées pour décrire ce phénomène.

Dans la suite nous allons voir deux techniques basées sur la détection de l'effet photothermique mais à l'échelle d'un nano-objet individuel. Le profil d'indice s'étend alors sur une taille bien inférieure à la longueur d'onde. L'optique géométrique ne peut plus décrire le phénomène et l'on doit alors se placer dans le cadre d'un calcul électromagnétique (cf. II.3.4, page 53).

II.2 Contraste Interférentiel Photothermique

II.2.1 Description de la méthode

La méthode de Contraste Interférentiel Photothermique (PIC, pour *Photothermal Interference Contrast*) a été développée au sein du groupe Nanophotonique en 2002. Elle a permis la première détection de nano-objets via leur absorption. Dans cette technique, la variation d'indice locale due à l'échauffement est vue comme une source de déphasage que l'on va détecter par une méthode interférométrique classique.

Le dispositif expérimental est représenté sur la figure II.4 (a)). Il utilise la combinaison d'un faisceau laser excitateur fortement absorbé (à une longueur d'onde voisine de la résonance plasmon de surface des nanoparticules d'or) modulé temporellement à la pulsation Ω et d'un faisceau laser sonde peu absorbé polarisé horizontalement. Le faisceau sonde est séparé en deux faisceaux de polarisations orthogonales par un prisme de Wollaston. Un des deux faisceaux est superposé avec le faisceau excitateur, alors que l'autre est légèrement décalé. Les trajets de ces deux faisceaux constituent les deux bras d'un interféromètre. Ces faisceaux sont focalisés, à l'aide d'un objectif de microscope de grande ouverture numérique, sur un échantillon contenant une faible densité surfacique ($< 1\ \mu\text{m}^{-2}$) de nano-particules d'or insérées dans une fine matrice polymère. L'échantillon est monté sur un scanner piézo-électrique et peut être déplacé par rapport aux faisceaux avec une précision proche du nanomètre.

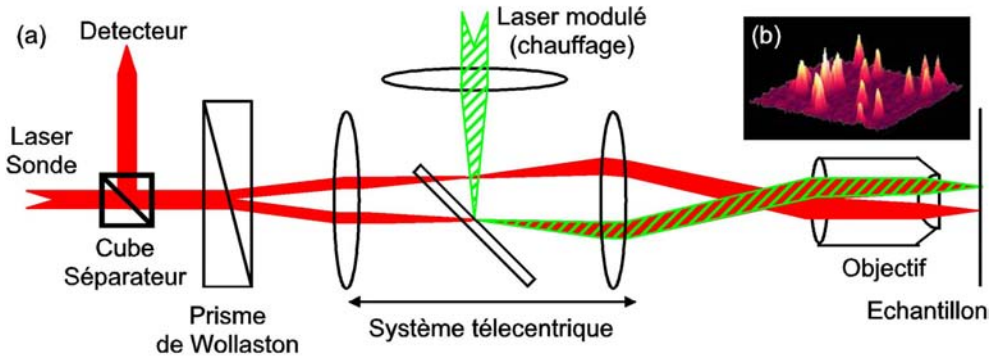

Fig. II.4 : Contraste interférentiel photothermique. (a) Dispositif expérimental. (b) Image photothermique ($10 \times 10\ \mu\text{m}^2$)de nanoparticules d'or de 5 nm de diamètre. Chaque pic correspond à une nanoparticule individuelle.

Lorsqu'une nanoparticule métallique se trouve au point de focalisation du faisceau excitateur, l'absorption partielle de ce faisceau induit un gradient local de température, et le profil d'indice résultant se comporte comme un objet de phase à travers lequel un seul des deux faisceaux sondes se propage. Il existe alors une différence de marche entre les chemins optiques parcourus par les deux faisceaux sondes. Après réflexion au niveau de l'échantillon, les deux faisceaux sondes parcourent le même chemin optique qu'à l'aller et se recombinent au niveau

du prisme de Wollaston à l'aide d'un système télécentrique. La composante polarisée verticalement est réfléchie par un cube séparateur de polarisations puis focalisée sur une photodiode rapide. Celle-ci contient un signal d'interférence à la pulsation Ω qui est extrait par détection synchrone. En utilisant des intensités d'excitation de l'ordre de 10 MW/cm^2, le Contraste Interférentiel Photothermique a permis de détecter pour la première fois des nanoparticules d'or individuelles de 5 nm avec un rapport signal à bruit de l'ordre de 10 (FIG. II.4 (b)) [Boyer et al., 2002].

II.2.2 Applications de la méthode PIC à la biologie : résultats et limitations

Une variante du dispositif de Contraste Interférentiel Photothermique a été développée pour des applications à la biologie, qui permet de travailler avec des échantillons épais. Elle a été utilisée pour détecter pour la première fois des protéines membranaires marquées avec des nanoparticules d'or de 10 nm par une méthode optique (FIG. II.5) [Cognet et al., 2003].

L'étude a été réalisée sur des échantillons cellulaires fixés et n'a pas pu être étendue aux cellules vivantes. En effet, le Contraste Interférentiel Pphotothermique autorise en principe l'étude de très petites nanoparticules métalliques et de manière plus générale de tout nano-objet non ou peu luminescent. Cependant, l'utilisation d'objectifs de microscope à grande ouverture numérique empêche d'atteindre cette limite car ils modifient la polarisation et le front d'onde des faisceaux incidents. Le recouvrement entre les deux « bras » de l'interféromètre n'est donc pas optimal et l'on perd en rapport signal sur bruit[1]. Ainsi, les intensités d'excitation nécessaires pour détecter de petites nanoparticules avec un bon rapport signal à bruit sont susceptibles d'induire des élévations de température trop importantes à la surface des plus petites nanoparticules, et ne sont pas compatibles avec des expériences *in vivo*.

II.3 Imagerie Photothermique Hétérodyne (LISNA) : réalisation expérimentale et modélisation du signal

II.3.1 Principe de l'Imagerie Photothermique Hétérodyne

L'Imagerie Photothermique Hétérodyne (PHI, pour *Photothermal Heterodyne Imaging*), a été développée au sein du groupe Nanophotonique en 2004 [Berciaud et al., 2004]. Elle a permis de gagner deux ordres de grandeur en sensibilité par rapport à la méthode précédente (PIC). Elle a depuis été rebaptisée LISNA (*Laser Induced Scattering around a NanoAbsorber*) pour des raisons de lisibilité, en particulier pour les applications à la biologie. Cette appellation sera utilisée dans la suite pour faire référence à l'Imagerie Photothermique Hétérodyne.

Cette technique utilise deux lasers (FIG. II.6). On focalise un faisceau laser vert, fortement absorbé (proche de la résonance plasmon), sur l'échantillon. Ce faisceau est modulé

[1] Ce phénomène est également connu en DIC car il empêche d'obtenir un contraste maximal, même si certains développements récents ont permis de s'en approcher [Ausserre and Valignat, 2006].

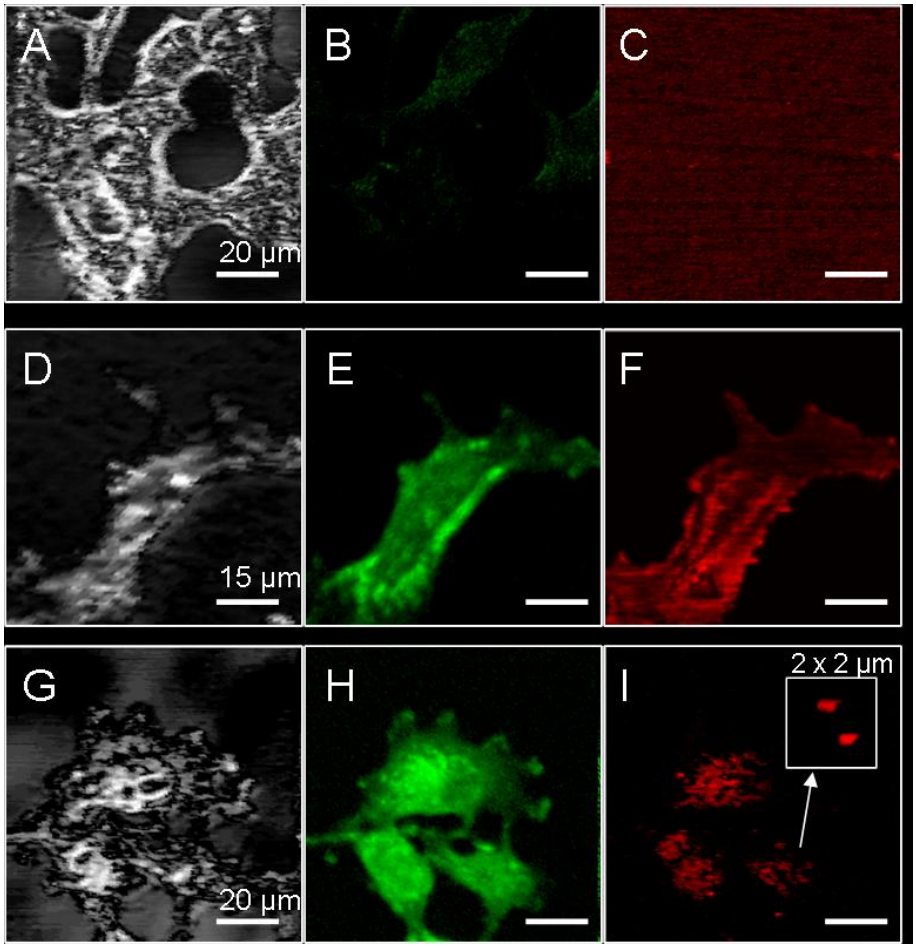

Fig. II.5 : Visualisation des cellules COS-7 grâce aux images de diffusion (A,D,G), et du marquage des protéines membranaires mGluR5 exprimées dans les cellules transfectées qui sont révélées par la détection de la fluorescence (B,E,H) ; visualisation photothermique de ce marquage membranaire (C,F,I) ; voir le Chapitre III pour plus de détails sur le système biologique étudié.

à une fréquence Ω de quelques centaines de kHz[2]. Si une nanoparticule se trouve au point d'observation, elle absorbe de l'énergie et s'échauffe (quelques degrés dans les conditions standard). La chaleur est évacuée autour de la particule ce qui induit une modification de l'indice optique de réfraction n du milieu environnant sur une distance typique de quelques dizaines de nm.

Pour la détection, on utilise un second faisceau laser focalisé, rouge, hors résonance. S'il traverse une région d'indice optique modifié à cause de l'élévation de température, la lumière est *diffusée*[3]. Le champ électromagnétique diffusé et modulé se propage alors dans toutes les

[2]Ceci permet de faciliter la détection en recherchant ensuite un signal à cette fréquence bien précise.
[3]et non *déviée*, comme pour un phénomène de mirage, car l'objet diffusant est de taille inférieure à la longueur d'onde, cf. II.3.4, page 53.

directions[4]. Le champ sonde vient interférer[5] avec ce champ diffusé pour générer un phénomène de battement optique. La lumière arrivant sur la photodiode utilisée pour la détection comporte ainsi une importante composante continue et une très faible (10^{-4} à 10^{-6} fois plus faible) composante à la fréquence de modulation. On utilise alors une détection synchrone (ou *lock-in amplifier*) qui permet d'extraire du signal de la photodiode cette très faible composante à la fréquence de référence.

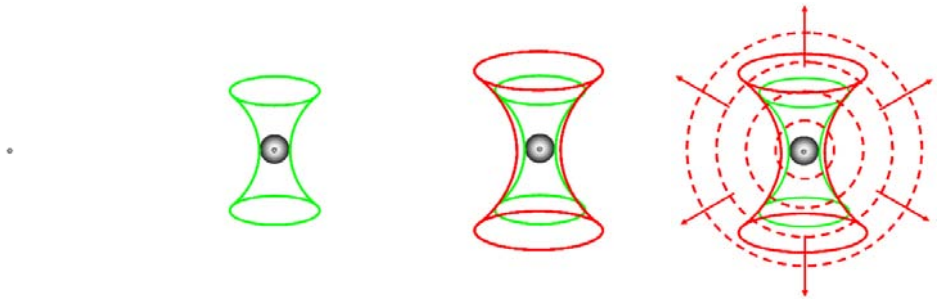

FIG. II.6 : Sur la nanoparticule, on focalise un laser modulé de longueur d'onde proche de la résonance plasmon. Ceci induit un chauffage autour de la particule qui se traduit par une variation (oscillante) de l'indice optique local. On envoie alors un faisceau sonde qui est en partie diffusé dans toutes les directions. On va ensuite détecter l'interaction du champ diffusé modulé avec le champ sonde.

II.3.2 Dispositif expérimental

Le montage optique principal s'inspire d'un montage confocal à deux couleurs. Il repose sur la superposition des deux lasers, rouge (HeNe, 632.8 nm) et vert (Nd :Yag doublé, 532 nm), au moyen d'un miroir dichroïque. Le laser d'excitation est modulé à 700 kHz au moyen d'un modulateur acousto-optique (MAO) piloté par un générateur basses fréquences. Les deux faisceaux sont focalisés sur l'échantillon au moyen d'un objectif de microscope de grande ouverture numérique (x100, $ON = 1.4$). L'échantillon est monté sur une platine piézo-électrique 3D, les directions X et Y étant pilotées par ordinateur. La détection dépend de la configuration utilisée.

Détection en réflexion (B pour backward*)*

D'une part, le champ diffusé rayonne dans toutes les directions, y compris vers l'arrière, dans la direction d'où arrivent les lasers. D'autre part, une partie du faisceau sonde est réfléchie par la surface de l'échantillon (à l'interface verre-polymère ou verre-eau, cf. II.3.3, page 51) et repart vers l'amont du système. On utilise alors sur le trajet du faisceau un dispositif anti-

[4]avec un diagramme de rayonnement préférentiellement orienté vers l'avant si la sphère d'indice modulé est de taille comparable ou supérieure à la longueur d'onde, symétrique sinon.

[5]On notera que les deux champs n'ont pas rigoureusement la même fréquence : le champ diffusé porte des bandes latérales en fréquence à $\pm\Omega$ à cause de la modulation. On parle alors d'interférences *hétérodynes* (« fréquences différentes »), d'où le nom d'origine de la méthode.

retour (lame $\lambda/4$ et cube séparateur de polarisations) pour séparer ces deux composantes du faisceau entrant et les focaliser sur une photodiode au niveau de laquelle on va détecter leur battement. C'est la méthode développée à l'origine.

Détection en transmission (F pour* forward*)

La méthode précédente n'est utilisable que pour détecter des billes d'or proche de la surface (par exemple déposées par « spin-coating »). Elle n'est plus utilisable lorsque l'on étudie des objets éloignés de l'interface (comme en milieu cellulaire). Dans ce cas, en effet, on perd le recouvrement entre le champ diffusé issu de la nanoparticule et le champ réfléchi. On peut alors utiliser une autre configuration, en transmission. Dans ce cas, on utilise un deuxième objectif de microscope (x80, $ON = 0.8$) pour collecter le champ diffusé vers l'avant et la partie du faisceau sonde qui est transmise au travers de l'échantillon. Là encore, on focalise les deux faisceaux sur une photodiode.

Les deux configurations ont globalement la même sensibilité. Les seules différences sont l'intensité lumineuse arrivant sur la photodiode (mais le rapport signal à bruit reste le même) et le dépendance du signal avec la fréquence de modulation (cf. II.3.4.e, page 61).

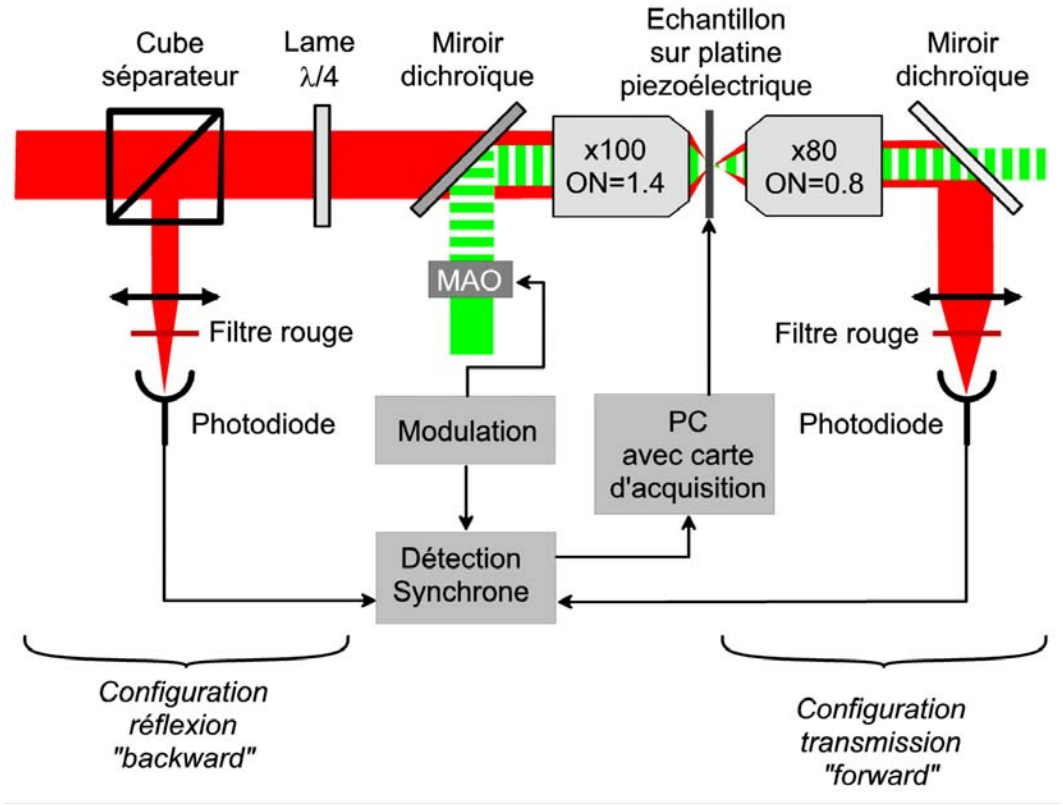

Fig. II.7 : Schéma du dispositif d'imagerie photothermique hétérodyne.

En plus du dispositif décrit ci-dessus, un certain nombre d'aménagements ont été mis en

place sur le montage afin de diversifier ses possibilités. On trouvera en annexe C un schéma complet du montage optique. Tout d'abord, un laser Argon (514 ou 488 nm) peut servir pour l'excitation en imagerie LISNA, en le combinant via un cube polariseur et des lames $\lambda/2$ au laser Nd :Yag. Les trois lasers (Argon, Nd :Yag et HeNe) peuvent également servir à l'excitation de fluorophores, soit en épifluorescence, soit en microscopie confocale (cf. I.2, page 19).

Le microscope est constitué d'un bâti rigide, conçu et usiné à l'atelier de mécanique du CPMOH par Touati DOUAR (FIG. II.8). Il assure le déplacement micrométrique de l'objectif de collection dans la configuration transmission, indépendamment du premier objectif et du scanner supportant l'échantillon. Ce microscope permet de travailler dans les deux configurations précitées. A son sommet sont placés la photodiode de collection de signal photothermique en configuration transmission et un dispositif d'éclairage en lumière blanche (lampe et condenseur), afin d'imager les échantillons cellulaires sur une caméra CCD.

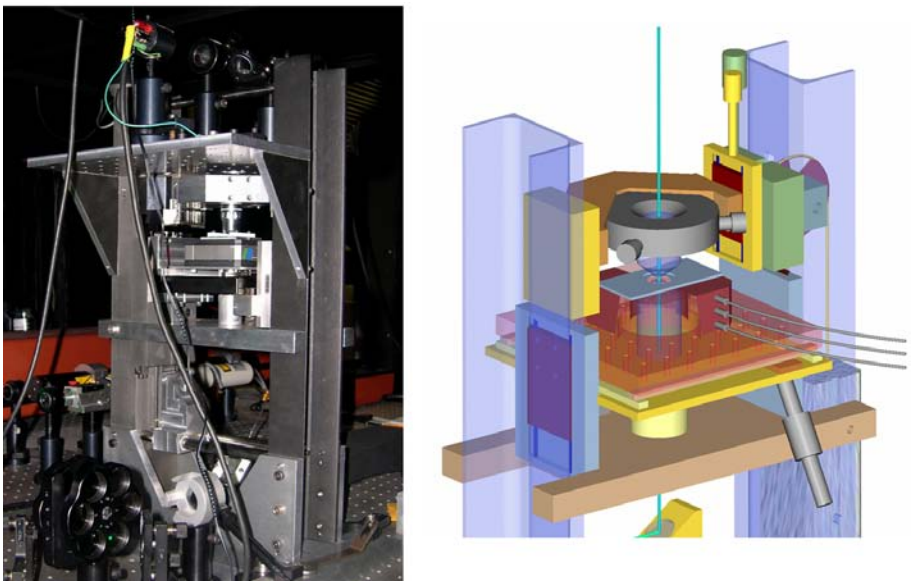

FIG. II.8 : Microscope conçu par l'atelier de mécanique.

Le dispositif est relié à un ordinateur via une interface et une carte d'acquisition National Instrument et contrôlé sous Labview. Une interface graphique (FIG. II.9) a été réalisée par Gerhard A. BLAB durant son séjour post-doctoral dans le groupe Nanophotonique (2005-2006). Elle permet de contrôler le déplacement de la platine piézo-électrique dans les directions X et Y, et d'acquérir le signal (photothermique ou fluorescence confocale), et ainsi de réaliser des images (balayage ligne par ligne), mais également de suivre le signal d'une bille d'or (cf. III.5, page 87).

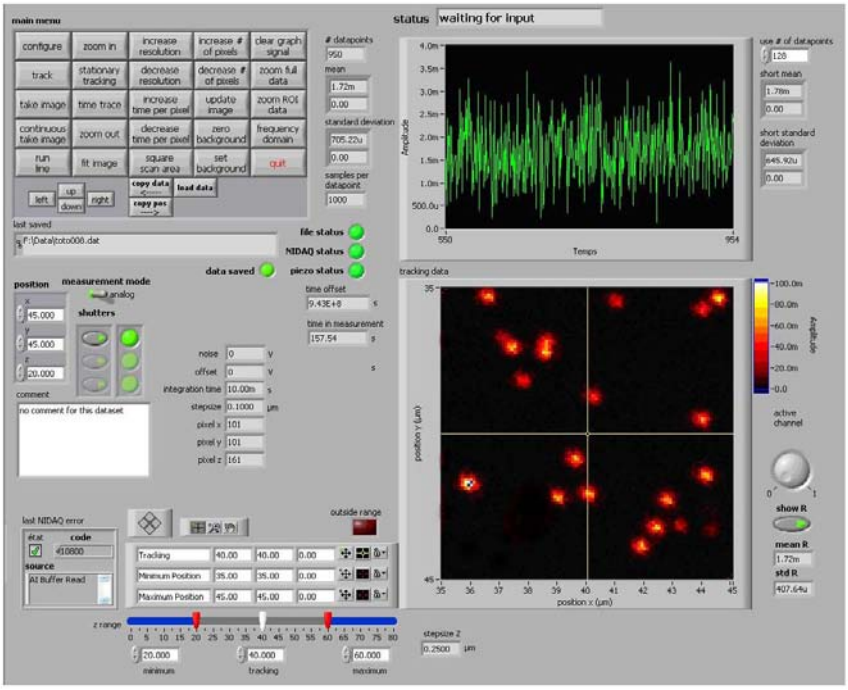

Fig. II.9 : Panneau de commande de l'interface Labview réalisée par Gerhard A. Blab.

II.3.3 Détection de nanoparticules d'or individuelles

II.3.3.a Préparation des échantillons

Pour les expériences de caractérisation du signal LISNA, les nanoparticules d'or sont insérées dans une matrice de polymère. Une solution de Poly-vinyl-alcool (PVA) à 1% en masse et contenant des nanoparticules d'or est déposée par centrifugation (*spin-coating*, à environ 2000 tours/min) sur une lamelle de microscope. La concentration en or de la solution est ajustée de manière à obtenir une concentration surfacique $\lesssim 1$ µm^{-2}. L'échantillon est ensuite recouvert d'une goutte d'huile silicone de forte viscosité afin d'optimiser la diffusion de la chaleur dans le voisinage des nanoparticules.

II.3.3.b Détection de nanoparticules individuelles : performances et critère d'unicité

La figure II.10 présente quelques résultats obtenus avec la méthode LISNA. A titre de référence, les conditions usuelles d'expérience (excitation de 400 kW/cm^2, à 532 nm, sonde de 5 mW focalisée à l'objectif, à 632.8 nm, 5 ms d'intégration par point) permettent de détecter des nanoparticules d'or de 10 nm de diamètre avec un rapport signal à bruit (RSB)[6] supérieur

[6]défini comme le rapport entre le signal maximum obtenu sur une nanoparticule et l'écart type (RMS) du bruit

à 100. Dans des conditions optimisées, la détection photothermique a permis d'imager des nanoparticules d'or de 1.4 nm de diamètre (des agrégats d'environ 70 atomes) avec un rapport signal à bruit supérieur à 10 [Berciaud et al., 2004].

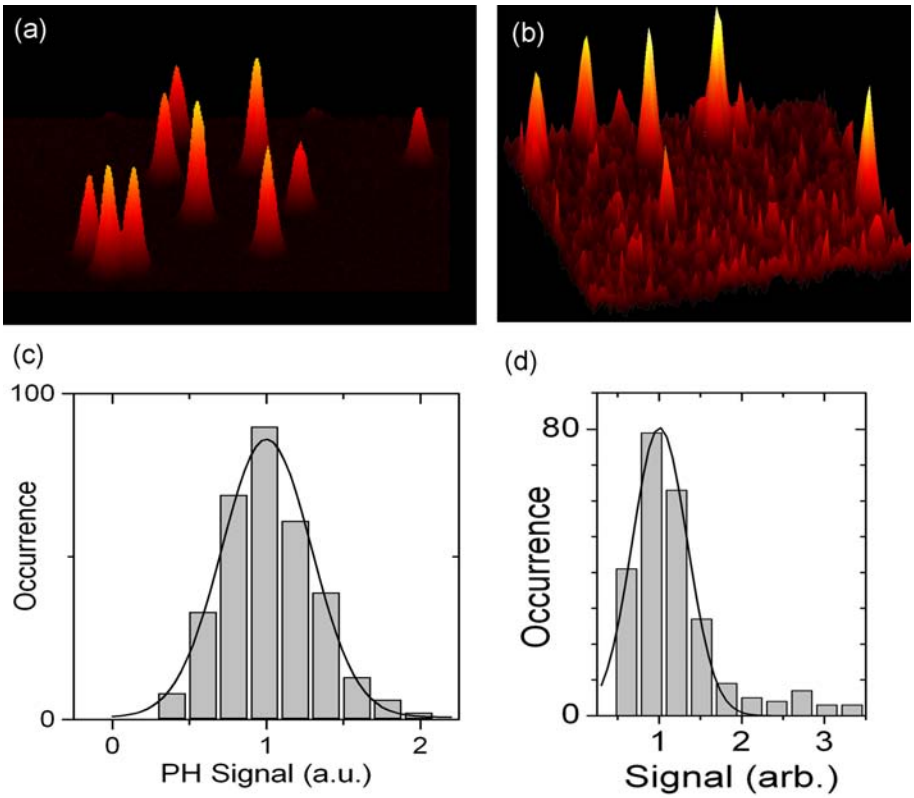

FIG. II.10 : (a) Nanoparticules de 10 nm détectées dans des conditions usuelles (excitation de 1 mW focalisée à l'objectif, à 532 nm, sonde de 5 mW focalisée à l'objectif, à 632.8 nm, 5 ms d'intégration par point). (b) Nanoparticules d'or de 1.4 nm (excitation de 3.5 mW focalisée, à 532 nm, sonde Ti :Sa 80 mW focalisée à l'objectif, 10 ms d'intégration par point). (c) Distribution en signal de nanoparticules de 10 nm. (d) Distribution en signal de nanoparticules d'or de 1.4 nm.

La distribution d'intensité des signaux obtenus est le critère utilisé pour justifier la détection de nano-objets *individuels*. En effet, la section efficace d'absorption étant proportionnelle au volume d'une nanoparticule métallique (cf. II.3.4.d, page 59), la dispersion des signaux photothermiques autour de leur valeur moyenne doit refléter la distribution en taille. En première approximation, une distribution en taille monodisperse et faiblement dispersée (écart type Δd) induit donc une dispersion $\Delta S = 3\,\Delta d$ du signal photothermique. Pour obtenir la distribution des signaux photothermiques, nous acquérons consécutivement plusieurs images dans différentes zones d'un même échantillon. Ces images sont analysées à l'aide d'un programme Matlab capable de localiser les pics de signal présents. Chaque pic identifié est ajusté par une fonction gaussienne à deux dimensions. Nous disposons après analyse d'un fichier contenant pour chaque pic les coordonnées et les paramètres de l'ajustement gaussien. L'aire

sous la fonction gaussienne d'ajustement est retenue comme estimation du signal photothermique moyen issu d'un pic donné. Dans les cas présentés ici, la distribution des signaux est monomodale, et la largeur du pic pour les nanoparticules de 10 nm de diamètre, de l'ordre de ±30%, est en accord avec la polydispersité en taille de l'échantillon employé (±10%).

II.3.3.c Intérêt de la configuration transmission ; résolutions transverse et axiale

Pour des échantillons épais (typiquement des échantillons cellulaires dans lesquelles les nanoparticules d'or sont à la surface des cellules), la configuration en réflexion n'est pas utilisable. Par contre, la configuration en transmission, dans laquelle le champ diffusé interagit avec le champ sonde transmis, est toujours valable, comme nous allons le montrer. Elle n'est généralement pas utilisée pour des échantillons « plats » pour de simples raisons pratiques (utilisation d'un deuxième objectif, risque de saturation de la photodiode, nécessité d'attendre la stabilisation de la couche d'huile de silicone pour éviter les effets de lentille variable...), mais les performances des deux configurations, en termes de rapport signal à bruit en particulier, sont sensiblement les mêmes (cf. II.3.5, page 62).

Afin de valider l'utilisation de la configuration en transmission dans des échantillons épais, nous avons réalisé des échantillons constitués de nanoparticules d'or de 20 nm de diamètre dans un gel d'agarose à 5% en masse. Dans un tel gel, si les nanoparticules restent d'une taille inférieure aux pores [Pluen et al., 1999], elles restent relativement fixes, ce qui permet de les imager en 3D (Fig. II.11). Pour cela, des images sont réalisées à différentes positions en Z, jusqu'à une dizaine de microns au dessus de la surface. Ceci montre tout d'abord qu'il est effectivement possible en configuration transmission de détecter des nanoparticules loin de la surface de l'échantillon.

Ceci a permis de plus de déterminer la dépendance spatiale du signal en 3D pour un objet ponctuel et donc les résolutions transverse et axiale du dispositif. On peut montrer que la forme du signal correspond au produit des deux faisceaux focalisés [Berciaud et al., 2006] et se présente comme un ellipsoïde de révolution gaussien (Fig. II.12) :

$$W(\mathbf{r}) = W_0 \exp\left\{ -\frac{2\left((x-x_0)^2 + (y-y_0)^2\right)}{w_{xy}^2} - \frac{2\,(z-z_0)^2}{w_z^2} \right\} \tag{II.14}$$

On déduit alors la résolution transverse $w_{xy} = 310 \pm 3$ nm et la résolution axiale $w_z = 2.6 \pm 0.3$ µm.

II.3.4 Évaluation du signal photothermique

Nous allons dans cette partie calculer le signal photothermique en étudiant l'influence de la variation de température au voisinage d'une nanoparticule excitée sur la propagation du faisceau sonde. Nous comparerons au fur et à mesure les résultats expérimentaux aux

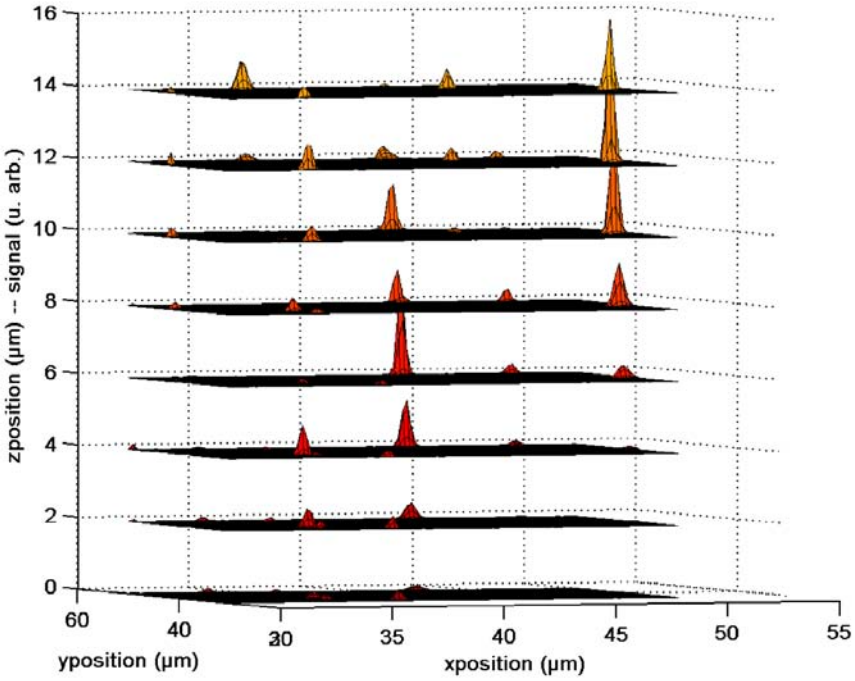

FIG. II.11 : Images LISNA de nanoparticules de 20 nm de diamètre dans un gel d'agarose, prises à différentes positions en Z.

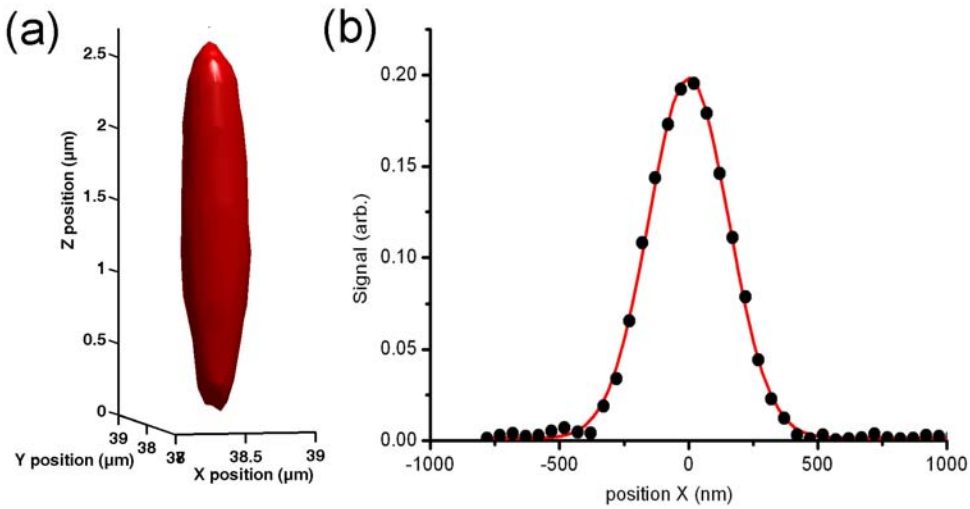

FIG. II.12 : (a) Image 3D d'une nanoparticule d'or dans un gel d'agarose (obtenue par seuillage du signal). (b) (•) Coupe transverse du signal à y et z correspondant au maximum ; (—) interpolation gaussienne, $w_{xy} = 310 \pm 3$ nm.

comportements théoriques attendus.

II.3.4.a Position du problème

L'élévation de température $\Delta T(r,t)$ induit une variation locale de l'indice optique n qui s'écrit simplement :

$$\Delta n(r,t) = \frac{\partial n}{\partial T}\Delta T(r,t) \tag{II.15}$$

où $\partial n/\partial T$ désigne les variations de l'indice de réfraction en fonction de la température (typiquement $\approx 10^{-4}$ K^{-1} dans les milieux que nous considérons). Le profil de température au voisinage de la nanoparticule absorbante sera calculé en détail, avec notamment les ordres de grandeur de cette élévation de température (cf. II.4, page 64). Étant donné que la méthode photothermique est basée sur une modulation et une détection synchrone, nous ne nous intéresserons dans la suite qu'à la composante modulée à Ω de ce profil de température (*resp.* d'indice) que nous noterons $\Delta T_\Omega(r)$ (*resp.* $\Delta n_\Omega(r)$). En notant P_{abs} la puissance absorbée par la nanoparticule et κ la conductivité thermique de la matrice entourant celle-ci, nous admettrons pour l'instant qu'il s'écrit :

$$\Delta T_\Omega(r,t) = \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa r}\exp\left(-\frac{r}{r_{th}}\right)\cos\left(\Omega t - \frac{r}{r_{th}}\right) \tag{II.16}$$

Notons simplement qu'il comporte une décroissance rapide en $1/r$ ainsi qu'une oscillation qui se propage dans le milieu sur une profondeur caractéristique $r_{th} \propto 1/\sqrt{\Omega}$, et que nous avons considéré que la nanoparticule se comporte comme une source ponctuelle de chaleur.

La géométrie du problème est schématisée sur la figure II.13. Afin de modéliser le signal photothermique détecté, nous devons dans un premier temps calculer le champ diffusé par le profil d'indice de réfraction donné par les équations (II.15) et (II.16) (point source de chaleur modulé). Pour cela nous considérons que le front d'onde du faisceau sonde incident est plan au niveau de son col w_s. Étant donné que $r_{th} < \lambda$, nous devons calculer le champ diffusé à l'aide d'un modèle électrodynamique. Le calcul présenté par la suite s'inspire du formalisme de l'ouvrage de B. Chu [Chu, 1974] et les travaux de thèse de J.B. Lastovka [Lastovka, 1967].

II.3.4.b Calcul du champ diffusé

Le champ sonde polarisé circulairement se propage selon $\mathbf{e_z}$ et s'écrit :

$$\mathbf{E_i}(\mathbf{r},t) = E_0\, e^{i(\mathbf{k_i}\cdot\mathbf{r}-\omega_s t)}\mathbf{e}_+ \tag{II.17}$$

où nous avons introduit $\mathbf{e}_+ = \left(\mathbf{e_x} + i\mathbf{e_y}\right)/\sqrt{2}$.

L'interaction entre ce champ et le gradient de susceptibilité diélectrique $\Delta\chi(r,t) \approx 2n\,\Delta n(r,t)$ est à l'origine d'une variation de la polarisation du milieu qui s'écrit :

$$\widetilde{\mathbf{P}}(\mathbf{r},t) = \frac{\epsilon_0\,\Delta\chi(r,t)}{n^2}\,\mathbf{E_i}(\mathbf{r},t) \tag{II.18}$$

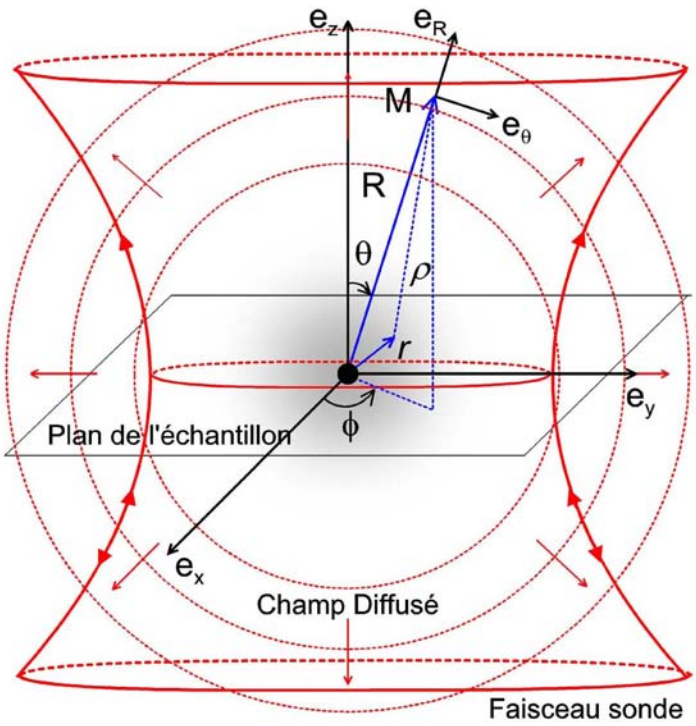

FIG. II.13 : Positions relatives du faisceau sonde et de la nanoparticule par rapport au point d'observation **M** considéré. La surface grisée correspond au gradient d'indice de réfraction. Le faisceau d'excitation n'est pas représenté.

où ϵ_0 désigne la permittivité diélectrique du vide.

L'expression du champ diffusé en un point **M** (avec $\mathbf{OM} = \mathbf{R}$) s'obtient à l'aide du potentiel de HERTZ $\mathbf{\Pi}(\mathbf{R}, t)$ [Jackson, 1998], qui obéit à une équation d'onde inhomogène dont le terme source est la variation de polarisation $\widetilde{\mathbf{P}}(\mathbf{r}, t)$.

$$\mathbf{\Pi}(\mathbf{R}, t) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \int d^3\mathbf{r} \int dt' \, \frac{\widetilde{\mathbf{P}}(\mathbf{r}, t)\, \delta\left(t' - t + |\mathbf{R} - \mathbf{r}| / c_m\right)}{|\mathbf{R} - \mathbf{r}|} \tag{II.19}$$

où c_m est la vitesse de la lumière dans le milieu considéré.

Les variations de la polarisation $\widetilde{\mathbf{P}}$ sont localisées au voisinage immédiat de la nanoparticule. Par conséquent, au niveau d'un point d'observation **M** situé dans la zone de radiation (ou de champ lointain), le champ électrique *total* diffusé s'obtient simplement à partir du potentiel de HERTZ selon :

$$\mathbf{E}(\mathbf{R}, t) = \nabla \times (\nabla \times \mathbf{\Pi}(\mathbf{R}, t)) \tag{II.20}$$

Le champ $\mathbf{E}(\mathbf{R}, t)$ contient une forte composante à la pulsation du champ sonde, ainsi que des bandes latérales situées à $\omega \pm \Omega$. Seules ces dernières composantes contribuent au

signal photothermique hétérodyne. En champ lointain, nous pouvons établir une expression analytique de $\mathbf{E}_\Omega(\mathbf{R},t)$, le champ diffusé modulé à Ω.

Comme l'extension de $\Delta\chi(r,t)$ est de l'ordre de r_{th}, les points $\mathbf{M}$ de la zone de champ lointain sont tels que $\rho = |\mathbf{R}-\mathbf{r}| \approx R - \mathbf{r}\cdot\mathbf{e_R}$. Dans l'équation (II.19) nous utiliserons l'approximation $|\mathbf{R}-\mathbf{r}| \approx R$ au dénominateur de l'intégrand. A partir de l'équation (II.20) et après avoir défini le vecteur $\Delta\mathbf{k} = \mathbf{k_i} - \mathbf{k_s} = 2\pi\, n/\lambda\left(\mathbf{e_z} - \mathbf{e}_R\right)$, nous pouvons écrire l'expression du champ diffusé selon :

$$\mathbf{E}_\Omega(\mathbf{R},t) = \frac{1}{2}\left[\mathbf{E}_\Omega^+(\mathbf{R},t) + \mathbf{E}_\Omega^-(\mathbf{R},t)\right] \tag{II.21}$$

avec

$$\mathbf{E}_\Omega^\pm(\mathbf{R},t) = 2n\frac{\partial n}{\partial T}\frac{P_{abs}}{(4\pi)^2\,\kappa}\,\frac{\epsilon_0}{n^2}\frac{1}{R}\,\nabla\times\left[\nabla\times\mathbf{e}_+\, I^\pm(\theta,\Omega)\;E_0\, e^{i(\mathbf{k_i}\cdot\mathbf{r}-\omega_s t)}\right] \tag{II.22}$$

et

$$I^\pm(\theta,\Omega) = \int \exp\left[-\frac{r}{r_{th}} + i\left(\Delta\mathbf{k}.\mathbf{r} \pm \frac{r}{r_{th}}\right)\right]\frac{d^3\mathbf{r}}{r} \tag{II.23}$$

Après intégration de l'équation (II.23), on obtient :

$$I^\pm(\theta,\Omega) = 2\pi\, r_{th}^2\;\left[f(\theta,\Omega) \pm i\, g(\theta,\Omega)\right] \tag{II.24}$$

Nous introduisons le paramètre $u(\theta,\Omega) = |\Delta\mathbf{k}|\, r_{th} = 4\pi n/\lambda\sqrt{2\widetilde{D}/\Omega}\,\sin(\theta/2)$. Les fonctions f et g s'écrivent alors :

$$f(u) = \frac{2u^2}{u^4+4} \tag{II.25}$$

$$g(u) = \frac{-4}{u^4+4} \tag{II.26}$$

Nous ne tenons compte que de la composante rayonnée (variant en $1/R$) du champ électrique diffusé. Après avoir éliminé les termes négligeables à grande distance ($\propto 1/R^n$ avec $n \geq 2$) issus du calcul du double rotationnel, celle-ci s'écrit :

$$\begin{aligned}\mathbf{E}_\Omega(\mathbf{R},t) = \\ -2\pi\, n\frac{\partial n}{\partial T}\frac{P_{abs}}{C\,\lambda^2}\left[\frac{f(\theta,\Omega)\,\cos(\Omega t) + g(\theta,\Omega)\,\sin(\Omega t)}{\Omega}\right]\frac{E_0}{R}\, e^{i(k_s r-\omega_s t)}\,\mathbf{e}_R\times\left(\mathbf{e}_R\times\mathbf{e}_+\right)\end{aligned} \tag{II.27}$$

II.3.4.c Signal photothermique

A partir de cette expression, nous pouvons évaluer le signal photothermique modulé à Ω en considérant le battement entre $\mathbf{E}_\Omega(\mathbf{R},t)$ et un oscillateur local proportionnel au champ sonde. Nous supposons que loin du foyer de l'objectif (*i.e.* dans la zone de radiation) le champ sonde peut être considéré comme une onde sphérique. La distribution de la puissance du signal

photothermique hétérodyne par unité d'angle solide dans la direction repérée par les angles (θ, φ) s'écrit donc :

$$\frac{d^2 P_{PHI}(\theta,\Omega)}{\sin\theta\, d\theta\, d\varphi} = \sqrt{2}\, n \frac{\partial n}{\partial T} \frac{P_{abs}}{C\, \lambda^2\, w_s} \sqrt{P_i P_{LO}} \left[\frac{f(\theta,\Omega)\, \cos(\Omega t) + g(\theta,\Omega)\, \sin(\Omega t)}{\Omega} \right] [1 + |\cos\theta|] \quad \text{(II.28)}$$

avec $P_i \propto E_0^2$ la puissance du champ sonde incident au foyer de l'objectif et P_{LO} la puissance de l'oscillateur local. Selon la configuration expérimentale choisie (cf. II.3.2, page 48), l'oscillateur local est le champ sonde transmis ou réfléchi par l'échantillon. Plus précisément $P_{LO} = \alpha_{B/F} P_i$, où $\alpha_B = R$ et $\alpha_F = T$ sont les coefficients de réflexion et de transmission (en intensité) à l'interface verre/échantillon. Le terme $\sqrt{P_i\ P_{LO}}$ traduit le battement hétérodyne entre le champ diffusé modulé à Ω et l'oscillateur local non modulé.

La puissance du signal photothermique oscillant à Ω s'obtient en intégrant l'équation (II.28) sur l'intervalle $[\theta_{min}, \theta_{max}]$ correspondant à la collection des faisceaux par l'objectif de microscope utilisé. Le signal ne dépend pas de φ, l'intégration sur l'angle azimutal est donc évidente. En considérant que les objectifs de microscope utilisés assurent une collection optimale (avec un angle solide de 2π dans les deux configurations expérimentales), nous avons $\theta_{min} = 0$ et $\theta_{max} = \pi/2$ pour une détection *vers l'avant* (respectivement, $\theta_{min} = \pi/2$ et $\theta_{max} = \pi$ pour une détection *vers l'arrière*). Nous obtenons alors :

$$P_{B/F}(\Omega, t) = \eta_{B/F} \sqrt{\alpha_{B/F}} P_i \left[2\pi\, \sqrt{2}\, n \frac{\partial n}{\partial T} \frac{P_{abs}}{C\, \lambda^2\, w_s} \right] \left[F_{B/F}(\Omega)\, \cos(\Omega t) + G_{B/F}(\Omega)\, \sin(\Omega t) \right] \quad \text{(II.29)}$$

où η_B *et* η_F sont les rendements de transmission optique dans les deux configurations (en pratique $\eta_B \approx \eta_F$) et

$$F_{B/F}(\Omega) = \frac{1}{\Omega} \int_{\theta_{min}}^{\theta_{max}} f(\theta,\Omega)\, [1 + |\cos\theta|] \sin\theta d\theta \quad \text{(II.30)}$$

$$G_{B/F}(\Omega) = \frac{1}{\Omega} \int_{\theta_{min}}^{\theta_{max}} g(\theta,\Omega)\, [1 + |\cos\theta|] \sin\theta d\theta \quad \text{(II.31)}$$

Notons que les deux composantes $F_{B/F}(\Omega)$ et $G_{B/F}(\Omega)$ sont respectivement en phase et en quadrature avec la commande de modulation. Enfin, après démodulation du signal par la détection synchrone, nous obtenons le signal photothermique hétérodyne dont l'amplitude est directement proportionnelle à $P_{B/F}(\Omega)$, la valeur efficace de $P_{B/F}(\Omega, t)$:

$$P_{B/F}(\Omega) = \eta_{B/F} \sqrt{\alpha_{B/F}} P_i \left[2\pi\, \sqrt{2}\, n \frac{\partial n}{\partial T} \frac{P_{abs}}{C\, \lambda^2\, w_s} \right] \sqrt{F_{B/F}(\Omega)^2 + G_{B/F}(\Omega)^2} \quad \text{(II.32)}$$

La puissance totale incidente sur le détecteur peut s'écrire de manière formelle :

$$P_{totale,\,B/F} = \eta_{B/F}\left[\alpha_{B/F} + 2\sqrt{\alpha_{B/F}}\,S_{B/F}(\Omega) + \left(S_{B/F}(\Omega)\right)^2\right]P_i \tag{II.33}$$

où

$$S_{B/F}(\Omega) = \frac{P_{B/F}(\Omega)}{\sqrt{\alpha_{B/F}}P_i} \tag{II.34}$$

Cette quantité sans dimension[7], proportionnelle au signal photothermique hétérodyne, qui servira de référence dans la suite. Elle correspond à l'amplitude du champ diffusé par le gradient d'indice de réfraction, normée par celle du champ incident. Nous la réutiliserons en particulier pour comparer les configurations B et F.

II.3.4.d Linéarité du signal avec la puissance absorbée

Le signal photothermique est proportionnel à la puissance absorbée par la nanoparticule. Elle doit donc varier linéairement avec l'intensité d'excitation I_0 et la section efficace d'absorption de l'objet observé.

Tout d'abord, nous avons vérifié la linéarité du signal avec la puissance d'excitation et nous avons montré que l'absorption ne présente pas de saturation (Fig. II.14). De plus, dans des conditions classiques d'imagerie ($I_0 \sim 100$ kW/cm^2), le signal photothermique reste parfaitement stable sur les durées d'acquisition (près d'une heure).

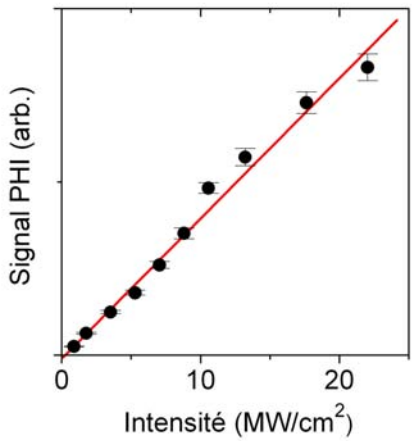

Fig. II.14 : Signal photothermique issu d'une nanoparticule individuelle de 10 nm de diamètre en fonction de l'intensité d'excitation à 532 nm.

Pour des nanoparticules sphériques, le signal photothermique est également proportionnel, comme la section efficace d'absorption, au cube du diamètre des nanoparticules. Ceci a

[7]Typiquement $S_{B/F}(\Omega) \approx 10^{-6}$ à 10^{-4} selon les valeurs de P_{abs} et de Ω.

été vérifié expérimentalement en réalisant des échantillons contenant deux populations de nanoparticules de tailles consécutives. Chaque échantillon présente une distribution de signaux bimodale, et le rapport entre les deux pics est mesuré. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure II.15 [Berciaud et al., 2004]. Sur six ordres de grandeur, les points expérimentaux sont bien ajustés par une loi de puissance d'ordre 3.

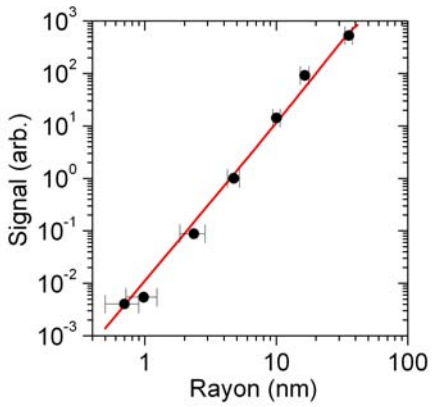

FIG. II.15 : Signal PHI moyen en fonction de la taille des nanoparticules d'or. Les points expérimentaux (•) sont ajustés par une loi de puissance d'ordre 3 (—).

Notons que ceci permet à l'inverse de déterminer la distribution de taille d'échantillons inconnus. On notera en particulier que si deux nanoparticules sont présentes dans le même volume de détection (à la suite d'un couplage biochimique par exemple), le signal sera le double de celui d'une nanoparticule seule[8]. Ceci peut être utilisé pour étudier l'agrégation de protéines marquées au moyen de nanoparticules d'or (cf. II.5.2, page 76).

Enfin, cette correspondance directe entre le signal LISNA et la section efficace d'absorption de la nanoparticule individuelle observée a permis, en faisant varier la longueur d'onde du faisceau d'excitation (en utilisant un laser à colorant, dont la longueur d'onde est réglable sur quelques dizaines de nm), de sonder le spectre d'absorption de nanoparticules individuelles. Ceci a été réalisé par Stéphane BERCIAUD dans le cadre de sa thèse [Berciaud, 2006]. Il a ainsi pu observer les effets de taille et de forme sur la position et la largeur de leur résonance plasmon de surface [Berciaud et al., 2005b]. Il a d'ailleurs poursuivi ces travaux en étudiant la spectroscopie d'absorption d'autres nano-objets individuels tels que les nanocristaux semiconducteurs [Berciaud et al., 2005a] et les nanotubes de carbone [Berciaud et al., 2007] pour lesquels la méthode LISNA est également bien adaptée.

[8]Ceci est vrai si l'interaction électromagnétique entre les nanoparticules est négligeable. En réalité, si deux nanoparticules sont proches de quelques nanomètres, il existe un couplage qui tend notamment à décaler légèrement la résonance plasmon [Sonnichsen et al., 2005]. Cet effet sera négligé dans tous les cas étudiés ici.

II.3.4.e Influence de la fréquence de modulation

La fréquence de modulation Ω influe sur le rayon thermique $r_{th} \propto 1/\sqrt{\Omega}$ du profil qui s'établit autour de la nanoparticule (cf. II.4, page 64) : il est d'autant plus faible que la fréquence est élevée.

Aux hautes fréquences, la taille de l'objet diffusant que constitue le profil d'indice est faible devant la longueur d'onde. Dans ce cas, la diffusion est aussi efficace vers l'avant que vers l'arrière, et elle décroît rapidement avec r_{th}.

Aux basses fréquences, le profil d'indice est plus étendu. En-deçà d' 1 MHz typiquement, sa taille atteint et dépasse la longueur d'onde du faisceau sonde et la diffusion devient significativement plus efficace vers l'avant. C'est pourquoi le signal continue d'augmenter dans le cas de la configuration F lorsque la fréquence diminue, tandis qu'il se stabilise pour la configuration B.

La figure II.16 illustre ces effets : des données expérimentales y sont comparées aux calculs théoriques (cf. II.3.4, page 53).

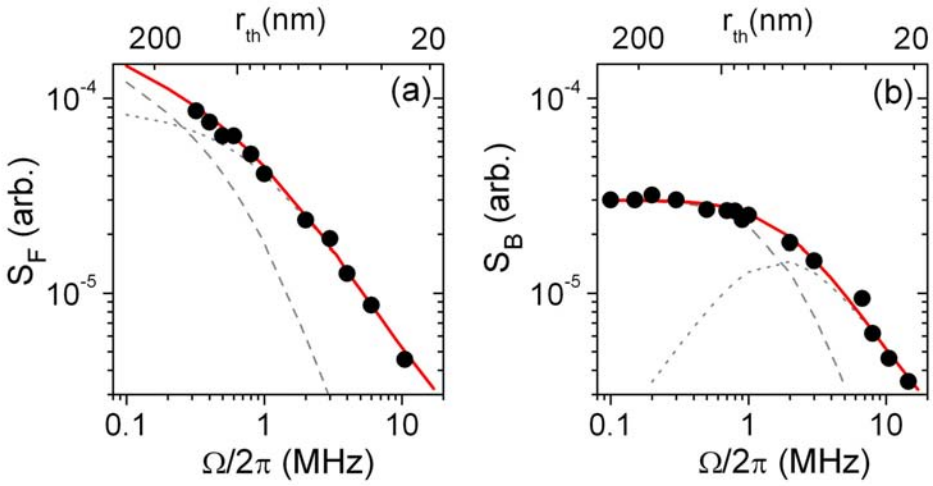

Fig. II.16 : Dépendance théorique (—) et expérimentale (•) des amplitudes de diffusion S_F et S_B en fonction de la fréquence de modulation pour les configurations F (a) et B (b). Les valeurs expérimentales ont été mesurées sur une nanoparticule d'or individuelle de 10 nm. Les composantes en phase (– –) et en quadrature (- -) vis-à-vis du signal de modulation, ainsi que les valeurs de r_{th}, sont également représentées [Berciaud et al., 2006].

II.3.5 Rapport signal à bruit

II.3.5.a Expression théorique et comparaison des deux configurations

Nous avons vu que la puissance mesurée sur le détecteur pouvait s'écrire comme :

$$P_{totale,\,B/F} = \eta_{B/F}\left[\alpha_{B/F} + 2\sqrt{\alpha_{B/F}}\,S_{B/F}(\Omega) + \left(S_{B/F}(\Omega)\right)^2\right]P_i \tag{II.35}$$

où

$$S_{B/F}(\Omega) = \frac{P_{B/F}(\Omega)}{\sqrt{\alpha_{B/F}}P_i} \tag{II.36}$$

Dans cette expression, le premier terme est proportionnel à la puissance de l'oscillateur local (réflexion ou transmission du champ sonde) : il correspond à une forte composante continue. Le deuxième terme, d'amplitude plus faible, est le signal photothermique hétérodyne oscillant à Ω. Le dernier terme est proportionnel au carré du champ diffusé. Son amplitude est très faible par rapport à celle des deux premiers termes et il sera donc négligé. En considérant que $\eta_B \approx \eta_F$, le rapport des signaux dans les deux configurations expérimentales s'écrit :

$$\frac{P_F(\Omega)}{P_B(\Omega)} = \sqrt{\frac{\alpha_F}{\alpha_B}}\frac{S_F(\Omega)}{S_B(\Omega)} \tag{II.37}$$

Idéalement, la détection est limitée par le bruit de photons dont la puissance varie comme la racine carrée de celle de l'oscillateur local $\sqrt{P_{LO}} = \sqrt{\alpha_{B/F}\,P_i}$. Dans ce cas, d'après (II.37), le rapport signal à bruit est donc proportionnel à l'amplitude de diffusion $S_{B/F}$. La constante de proportionnalité est indépendante de la configuration expérimentale, et ne dépend que de la puissance absorbée et de celle du faisceau sonde incident.

Par conséquent, dans l'hypothèse d'une diffusion du champ sonde symétrique par rapport au plan focal, le rapport signal à bruit est identique dans les deux configurations, quelles que soient les valeurs de coefficients $\alpha_{B/F}$ et malgré des valeurs très différentes pour P_B et P_F, comme le montre la figure II.17. En effet, le signal PHI mesuré vers l'avant, qui bénéficie d'une amplification hétérodyne plus importante, reste nettement supérieur au signal mesuré vers l'arrière, mais le bruit[9], essentiellement dû au bruit d'intensité de l'oscillateur local (faisceau sonde), est plus important dans ce cas. Expérimentalement, une détection limitée par le bruit de photons est difficile à obtenir pour les basses fréquences (< 300 kHz) en raison d'un bruit de décharges dans le laser et du bruit électronique qui est inversement proportionnel à la fréquence.

II.3.5.b Influence de la puissance du faisceau sonde

Nous avons mesuré le bruit (en l'absence de faisceau d'excitation) en fonction de sa puissance du faisceau sonde à l'objectif P_i dans la configuration F pour une fréquence de mo-

[9]Bien entendu, le bruit considéré est mesuré « à Ω », en sortie de la détection synchrone.

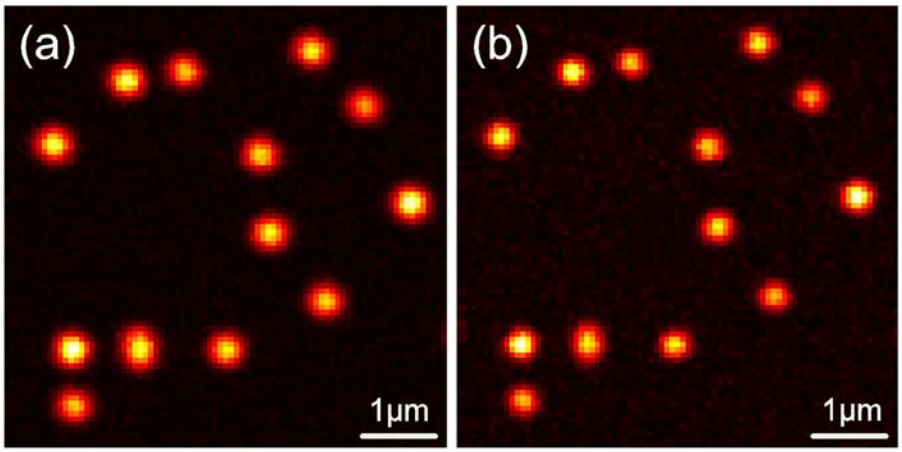

Fig. II.17 : Images LISNA de la même zone d'un échantillon de nanoparticules d'or de 10 nm de diamètre, obtenues (a) en configuration réflexion (B), et (b) en configuration transmission (F).

dulation $\Omega/2\,\pi = 700$ kHz. Les points expérimentaux sont ajustés par la somme d'un bruit constant d'origine électronique et d'une composante due au bruit de photons ($\propto \sqrt{P_i}$). Le bon accord entre l'ajustement et les points expérimentaux, en particulier pour les valeurs les plus élevées de P_i, signifie que la détection est limitée par le bruit de photons dans cette configuration pour $P_i > 500$ µW (le bruit électronique devient négligeable). Dans la configuration B, la puissance de l'oscillateur local est trop faible pour atteindre cette limite de détectivité, mais le rapport signal à bruit reste quasi optimal.

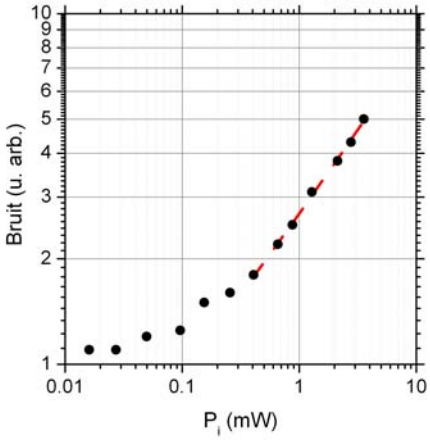

Fig. II.18 : Bruit mesuré en fonction de la puissance du faisceau sonde dans la configuration F (•). Les résultats sont ajustées par la somme d'un bruit constant et d'une composante due au bruit de photons en $\sqrt{P_i}$ (– –).

Le signal étant proportionnel à P_i tandis que le bruit est proportionnel à $\sqrt{P_i}$, on aura tout intérêt à utiliser des puissances laser pour le faisceau sonde les plus élevées possibles car

le rapport signal à bruit est proportionnel à $\sqrt{P_i}$. De plus, le faisceau hors résonance (632.8 nm) est relativement bien supporté par les échantillons cellulaires. On utilise généralement une puissance de 6 mW à l'objectif pour ce faisceau.

II.4 Évaluation de l'élévation de température

Dans la perspective d'applications de la méthode LISNA en milieu biologique, il nous est apparu très important d'évaluer le plus précisément possible l'élévation de température à la surface de la nanoparticule lié à l'effet photothermique. En effet, dans les expériences qui nous intéresseront dans la suite, des protéines, sensibles aux élévations de température[10], sont greffées à la surface des nanoparticules et observées sur des cellules vivantes. Nous allons cependant voir que l'élévation de température nécessaire à l'obtention du signal photothermique reste tout à fait compatible avec ces applications biologiques.

II.4.1 Position du problème

Afin de décrire quantitativement le signal photothermique issu d'objets nanométriques, nous considérons une nanoparticule de diamètre $d = 2a$ et de section efficace d'absorption σ_{abs} illuminée par un faisceau laser d'excitation de longueur d'onde λ. L'intensité modulée du laser s'écrit $I(t) = I_0\,[1 + \cos(\Omega t)]$. Comme d est très petit devant le col du faisceau focalisé ($\approx \lambda/2$), l'intensité au voisinage de la nanoparticule peut être considérée comme uniforme et la puissance absorbée s'écrit :

$$P_{abs}(t) = \sigma_{abs} I_0\,[1 + \cos(\Omega t)] \tag{II.38}$$

Nous noterons $P_0 = \sigma_{abs} I_0$, la puissance moyenne absorbée.

Le profil thermique est ensuite calculé en résolvant l'équation de diffusion de la chaleur à l'extérieur de la nanoparticule[11], dans un milieu de conductivité thermique κ et de capacité thermique volumique C, pour l'instant en l'absence de sources :

$$\widetilde{D}\nabla^2 T(r,t) - \frac{\partial T(r,t)}{\partial t} = 0 \tag{II.39}$$

où $\widetilde{D} = \kappa/C$ est la diffusivité thermique du milieu et le Laplacien en sphérique s'écrit :

$$\nabla^2 T(r,t) = \frac{1}{r^2}\frac{\partial}{\partial r}\left(r^2 \frac{\partial T(r,t)}{\partial r}\right) \tag{II.40}$$

A cette équation, il convient d'ajouter un terme de source ou des conditions aux limites particulières pour rendre compte de la puissance absorbée puis évacuée par la nanoparticule métallique. Deux modélisations sont possibles : compte tenu de la taille des objets étudiés, on

[10] Les températures de dénaturation des protéines son généralement de l'ordre de 50 à 70°C.

[11] Le problème étant à symétrie sphérique, celle-ci résulte simplement d'un bilan d'énergie sur une couche d'épaisseur dr à la distance r du centre de la nanoparticule.

supposera dans un premier temps que la nanoparticule se comporte comme un point source de chaleur, puis nous prendrons en compte la taille finie de la nanoparticule.

Dans le cas d'une excitation modulée de manière sinusoïdale autour d'une moyenne non nulle, le profil spatio-temporel de l'élévation de température résultant $\Delta T(r,t) = T(r,t) - T_0$ (où T_0 est la température au repos de l'échantillon) peut être calculé en résolvant (II.39), en considérant que la réponse est la somme de deux termes [Carslaw and Jaeger, 1959] :

- une élévation globale de la température liée au terme constant ;
- un terme oscillant à la fréquence de modulation qui possède comme nous allons le voir un amortissement sur une distance $r_{th} = \sqrt{\frac{2\widetilde{D}}{\Omega}}$ qui correspond à la profondeur de pénétration de l'onde thermique dans le milieu.

II.4.2 Point source de chaleur

On suppose tout d'abord que la nanoparticule interagissant avec le faisceau absorbé se comporte comme un point source de chaleur. Dans ce cas, la résolution la plus simple de l'équation (II.39) s'appuie sur la réponse impulsionnelle du système. Celle-ci correspond à l'élévation de température $\Delta T(r,t) = T(r,t) - T_0$ qui résulte de l'apport instantané (à $t = 0$) d'une énergie Q_{abs} à l'origine du système (prise au centre de la nanoparticule) [Carslaw and Jaeger, 1959] :

$$\Delta T(r,t) = T(r,t) - T_0 = \frac{Q_{abs}}{8C\left(\pi\widetilde{D}t\right)^{3/2}} \exp\left\{-\frac{r^2}{4\widetilde{D}t}\right\} \tag{II.41}$$

où $r^2 = x^2 + y^2 + z^2$ et $T_0 = T(\infty, t)$.

Il est en effet assez facile de se convaincre que le profil (II.41) est une solution de (II.39)[12] et qu'elle correspond bien au phénomène physique évoqué ci-dessus. Dans le cas d'un apport continu ou périodique avec une puissance $P_{abs}(t)$, il suffit d'intégrer temporellement le second terme de l'équation (II.41) en tenant compte de la propagation. Nous allons envisager deux cas : une excitation continue et une excitation sinusoïdale.

II.4.2.a Excitation continue

Pour un point source de chaleur avec une puissance continue P_{abs}, il vient :

$$\begin{aligned} \Delta T(r,t) &= \frac{P_{abs}}{8C\left(\pi\widetilde{D}\right)^{3/2}} \int_0^t \exp\left\{-\frac{r^2}{4\widetilde{D}(t-t')}\right\} \frac{dt'}{(t-t')^{3/2}} \\ &= \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa r}\mathrm{erfc}\left(\frac{r}{\sqrt{4\widetilde{D}t}}\right) \end{aligned} \tag{II.42}$$

[12] En fait, l'équation (II.39) se résout facilement en introduisant une nouvelle variable spatio-temporelle définie par $u^2 = \frac{r^2}{4\widetilde{D}t}$; on constate alors que (II.39) s'écrit simplement en termes de dérivées par rapport à u.

où l'on définit la *fonction erreur complémentaire* :

$$\mathrm{erfc}(x) = 1 - \mathrm{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^{\infty} e^{-u^2} du \tag{II.43}$$

Lorsque le régime permanent est établi, pour $t \to \infty$, le profil de température s'écrit :

$$\Delta T_{stat}(r,t) = \Delta T(r) = \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa r} \tag{II.44}$$

II.4.2.b Excitation sinusoïdale

Pour un point source de chaleur avec une puissance $P_{abs}(t) = P_{abs} \cos \Omega t$ (une puissance négative correspondrait à un puits de chaleur ; ceci est purement formel ici et découle de la décomposition de la source en une partie constante et une partie oscillante), on effectue le même type d'intégration temporelle. On peut montrer alors qu'il s'établit, après un transitoire que l'on n'explicitera pas, un profil de température oscillant qui s'écrit [Carslaw and Jaeger, 1959] :

$$\Delta T_{stat}(r,t) = \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa r} \exp\left(-\frac{r}{r_{th}}\right) \cos\left(\Omega t - \frac{r}{r_{th}}\right) \tag{II.45}$$

où l'on a noté :

$$r_{th} = \sqrt{\frac{2\widetilde{D}}{\Omega}} \tag{II.46}$$

qui correspond à la profondeur de pénétration de l'onde thermique dans le milieu ainsi qu'à sa longueur d'onde (à un facteur 2π près).

II.4.2.c Profil complet pour un point source

Pour un point source de chaleur avec une puissance $P_{abs}(t) = P_{abs}\,[1 + \cos(\Omega t)]$ avec $P_{abs} = \sigma_{abs} I_0$, il s'établit donc, après un transitoire, un profil de température oscillant qui s'écrit :

$$\Delta T_{stat}(r,t) = \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa r} \left[1 + \exp\left(-\frac{r}{r_{th}}\right) \cos\left(\Omega t - \frac{r}{r_{th}}\right)\right] \tag{II.47}$$

II.4.3 Sphère source de chaleur

II.4.3.a Nouvelles conditions aux limites

Afin de décrire plus précisément le phénomène étudié, prenons donc en compte la taille finie de la nanoparticule, supposée sphérique de rayon a. A l'extérieur de la nanoparticule, l'équation de la chaleur reste la même que précédemment :

$$\widetilde{D}\nabla^2 T(r,t) - \frac{\partial T}{\partial t} = 0 \text{ pour } r > a \tag{II.48}$$

mais les conditions aux limites s'écrivent maintenant :

$$T(\infty, t) = T_0 \tag{II.49}$$

$$T(r, 0) = T_0 \tag{II.50}$$

$$T(a, t) = T_0 + \Delta T(a, t) \tag{II.51}$$

où l'on a noté $\Delta T(a, t)$ l'élévation de température à la surface de la nanoparticule, pour l'instant quelconque. La solution de (II.48) a été calculée dans ce cas et vaut [Fluckiger et al., 1985, Carslaw and Jaeger, 1959] :

$$\Delta T(r, t) = T(r, t) - T_0 = \frac{2a}{r\sqrt{\pi}} \int_{\beta}^{\infty} \Delta T\left(a, t\left[1 - \frac{\beta^2}{\mu^2}\right]\right) \exp(-\mu^2) d\mu \tag{II.52}$$

où $\beta = \frac{r-a}{\sqrt{4\widetilde{D}t}}$

Calculons l'expression de l'élévation de température à la surface de la nanoparticule $\Delta T(a, t)$. Étant donné que la conductivité thermique des métaux nobles ($\kappa_{Au} \approx 320\ \mathrm{WK^{-1}m^{-1}}$) est largement supérieure à celle des milieux hôtes considérés (cf. Tab. II.1), nous pouvons considérer que la température à l'intérieur de la nanoparticule est uniforme et égale à sa température de surface $T(a, t)$. Cette température peut être calculée en effectuant comme précédemment un bilan d'énergie mais au niveau de la nanoparticule entière. La somme de la puissance absorbée par la nanoparticule et de la puissance quittant sa surface est égale à la chaleur qu'elle a emmagasinée sous forme d'une élévation de température [Chan, 1975] :

$$P_{abs}(t) = -4\pi a^2 \kappa \left.\frac{\partial T}{\partial r}\right|_{r=a} + \frac{4}{3}\pi a^3 C_{np} \left.\frac{\partial T}{\partial t}\right|_{r=a} \tag{II.53}$$

où C_{np} désigne la capacité calorifique volumique de la nanoparticule, assimilée à celle du métal massif ($C_{np} \approx 2.5 \times 10^7\ \mathrm{JK^{-1}m^{-3}}$ pour l'or massif).

Afin d'expliciter cette expression, il faut calculer les dérivées partielles de $T(r, t)$ en $r = a$ en dérivant (II.52) [13] [Fluckiger et al., 1985] :

$$\left.\frac{\partial T}{\partial r}\right|_{r=a} = -\frac{\Delta T(a, t)}{a} \tag{II.54}$$

$$\left.\frac{\partial T}{\partial t}\right|_{r=a} = \frac{d\Delta T(a, t)}{dt} \tag{II.55}$$

$$\tag{II.56}$$

On peut alors réécrire (II.53) sous la forme :

$$\frac{P_{abs}(t)}{4\pi\kappa a} = \Delta T(a, t) + t_0 \frac{d\Delta T(a, t)}{dt} \tag{II.57}$$

[13] en utilisant la règle de Leibniz : $\frac{\partial}{\partial z}\int_{a(z)}^{b(z)} f(x, z)dx = \int_{a(z)}^{b(z)} \frac{\partial f}{\partial z} dx + f(b(z), z)\frac{\partial b}{\partial z} - f(a(z), z)\frac{\partial a}{\partial z}$

où l'on a posé :

$$t_0 = \frac{a^2 C_{np}}{3\kappa} \tag{II.58}$$

On voit donc que t_0 correspond au temps caractéristique d'établissement du profil thermique autour de la nanoparticule. Par intégration de (II.57), avec la condition $\Delta T(a,0) = 0$, il vient :

$$\Delta T(a,t) = \frac{exp(-t/t_0)}{t_0} \int_0^t exp(t'/t_0) \frac{P_{abs}(t')}{4\pi\kappa a} dt' \tag{II.59}$$

En supposant pour l'instant que $P_{abs}(t)$ est une fonction sinusoïdale de pulsation Ω et en passant en notation complexe :

$$P_{abs}(t) = P_{abs}(0) \exp(i\Omega t) \tag{II.60}$$

L'intégration de l'équation (II.59) donne alors :

$$\Delta T(a,t) = \frac{P_{abs}(0)}{4\pi\kappa a\,(1 + i\Omega t_0)} \left[\exp(i\Omega t) - \exp(-t/t_0)\right] \tag{II.61}$$

Rappelons que $t_0 = a^2 C_{np}/3\kappa$ est le temps caractéristique d'établissement du profil thermique autour de la nanoparticule. Pour une nanoparticule d'or de 10 nm de diamètre, nous pouvons estimer $t_0 \approx 35$ ps. Or les fréquences typiques sont de l'ordre de $\Omega/2\pi \lesssim 1$ MHz. Ainsi, même pour les plus grosses particules considérées par la suite ($D \approx 70$ nm), nous aurons toujours $\Omega t_0 \ll 1$, et le terme transitoire exponentiellement décroissant peut être très rapidement négligé. Nous pouvons donc simplifier l'expression précédente :

$$\Delta T(a,t) \approx \frac{P_{abs}(0)}{4\pi\kappa a} \exp(i\Omega t) \tag{II.62}$$

Dans le cas général, on considérera donc que l'on peut négliger les régimes transitoires conduisant à l'établissement du gradient de température et que la température suit quasi-adiabatiquement la modulation temporelle de la puissance absorbée. Ceci donne en particulier à chaque instant la valeur de l'élévation de température à la surface en fonction de la puissance absorbée :

$$\Delta T(a,t) \approx \frac{P_{abs}(t)}{4\pi\kappa a} \tag{II.63}$$

II.4.3.b Excitation continue

Maintenant que nous connaissons la relation entre $\Delta T(a,t)$ et la puissance absorbée, reportons son expression dans (II.52). Tout d'abord, reprenons le cas d'une excitation avec une puissance continue P_{abs} :

$$\Delta T(r,t) = \frac{2a}{r\sqrt{\pi}} \int_\beta^\infty \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa a} \exp(-\mu^2) d\mu \tag{II.64}$$

où $\beta = \frac{r-a}{\sqrt{4\widetilde{D}t}}$

L'intégration [Carslaw and Jaeger, 1959] fait à nouveau apparaître la fonction *fonction erreur complémentaire* :

$$\Delta T(r,t) = \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa r}\mathrm{erfc}\left(\frac{r-a}{\sqrt{4\widetilde{D}t}}\right) \tag{II.65}$$

avec :

$$\mathrm{erfc}(x) = 1 - \mathrm{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}}\int_x^\infty e^{-u^2}du \tag{II.66}$$

ce qui, après établissement du régime permanent, pour $t \to \infty$, donne le même profil de température que dans le cas d'une source ponctuelle (pour $r > a$) :

$$\Delta T_{stat}(r,t) = \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa r} \tag{II.67}$$

II.4.3.c Excitation sinusoïdale

Envisageons maintenant le cas d'une excitation avec une puissance sinusoïdale notée $P_{abs}(t) = P_{abs}\cos\Omega t$:

$$\Delta T(r,t) = \frac{2a}{r\sqrt{\pi}}\int_\beta^\infty \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa a}\cos\left(\Omega t\left[1-\frac{\beta^2}{\mu^2}\right]\right)\exp(-\mu^2)d\mu \tag{II.68}$$

où l'on a noté $\beta = \frac{r-a}{\sqrt{4\widetilde{D}t}}$.

Cette intégrale peut se calculer et elle donne [Carslaw and Jaeger, 1959] :

$$\begin{aligned}\Delta T(r,t) = \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa r}\exp\left(-\frac{r-a}{r_{th}}\right)\cos\left(\Omega t - \frac{r-a}{r_{th}}\right)\\ - \frac{2P_{abs}}{4\pi^{3/2}\kappa r}\int_0^\beta \cos\left(\Omega t\left[1-\frac{\beta^2}{\mu^2}\right]\right)\exp(-\mu)d\mu\end{aligned} \tag{II.69}$$

en posant à nouveau :

$$r_{th} = \sqrt{\frac{2\widetilde{D}}{\Omega}} \tag{II.70}$$

Le second terme est un transitoire lié à l'établissement des oscillations à $t = 0$, et pour $t \to \infty$, il reste :

$$\Delta T_{stat}(r,t) = \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa r}\exp\left(-\frac{r-a}{r_{th}}\right)\cos\left(\Omega t - \frac{r-a}{r_{th}}\right) \tag{II.71}$$

II.4.3.d Profil complet pour la sphère source

Pour une nanoparticule de rayon a, source de chaleur avec une puissance $P_{abs}(t) = P_{abs}\left[1+\cos(\Omega t)\right]$, avec $P_{abs} = \sigma_{abs}I_0$, il s'établit donc, après un transitoire, un profil de

température oscillant qui s'écrit (pour $r > a$) :

$$\Delta T_{stat}(r,t) = \frac{P_{abs}}{4\pi\kappa r}\left[1 + \exp\left(-\frac{r-a}{r_{th}}\right)\cos\left(\Omega t - \frac{r-a}{r_{th}}\right)\right] \tag{II.72}$$

II.4.4 Comparaison des deux modèles et ordres de grandeur

Dans les deux expressions obtenues pour le profil stationnaire (équations (II.47) et (II.72)), deux tailles caractéristiques apparaissent : a et r_{th}. Le premier va en fait donner l'effet dominant : le profil d'élévation de température est en $\frac{a}{r}\Delta T(a,t)$, où $\Delta T(a,t)$ correspond à la température à la surface de la nanoparticule. Compte-tenu de l'ordre de grandeur de a, la température décroît très rapidement lorsque l'on s'éloigne de quelques dizaines de nanomètres de la nanoparticule.

Le terme modulé est également caractérisé par r_{th} qui correspond à la fois à la profondeur de pénétration de l'onde thermique et à sa longueur d'onde, à un facteur 2π près. Le tableau II.1 donne les caractéristiques thermiques et les valeurs des principaux paramètres introduits précédemment pour une nanoparticule de 10 nm de diamètre avec $\Omega/2\pi = 700$ kHz dans six milieux différents. Ces données mettent en évidence l'influence du milieu hôte sur r_{th}, mais on constate que r_{th} est dans tous les cas très grand devant a.

Milieu	C (JK^{-1}m^{-3})	κ (WK^{-1}m^{-1})	$\widetilde{D}$(m^2/s)	r_{th} (nm)
Air	1.3×10^3	0.025	1.9×10^{-5}	7×10^3
Eau	4.2×10^6	0.61	1.4×10^{-7}	632
PVA	2×10^6	0.2	10^{-7}	534
Huile silicone	1.5×10^6	0.1	6.7×10^{-8}	437
Glycérol	3.1×10^6	0.29	9×10^{-8}	507

TAB. II.1 : Paramètres thermiques pour quelques milieux, à 300 K : capacité thermique volumique C, conductivité thermique κ, diffusivité thermique $\widetilde{D}$ et rayon thermique r_{th} pour $\Omega/2\pi = 700$ kHz.

Enfin, les solutions données pour les deux modèles sont très comparables. La composante continue est même exactement identique ; le terme modulé est simplement décalé de r en $(r-a)$ et les deux expressions se rejoignent pour $a \to 0$ (FIG. II.19).

Pour la modélisation du signal LISNA (cf. II.3.4, page 53), nous avons utilisé par souci de simplicité le modèle du point source pour évaluer le profil de température et donc le profil d'indice optique. En effet, on s'intéresse dans ce cas aux échelles de l'ordre de $r_{th} \gg a$ où les différences entre les deux modèles sont minimes.

Pour évaluer la température à la surface des nanoparticules, cependant, nous allons utiliser le modèle de la sphère source pour plus de fidélité vis-à-vis de la situation réelle. En effet, c'est un paramètre crucial pour toutes les applications à la biologie et il convient de le modéliser au plus près. Le chauffage étant modulé, on évaluera la température *maximale* à la surface, étant

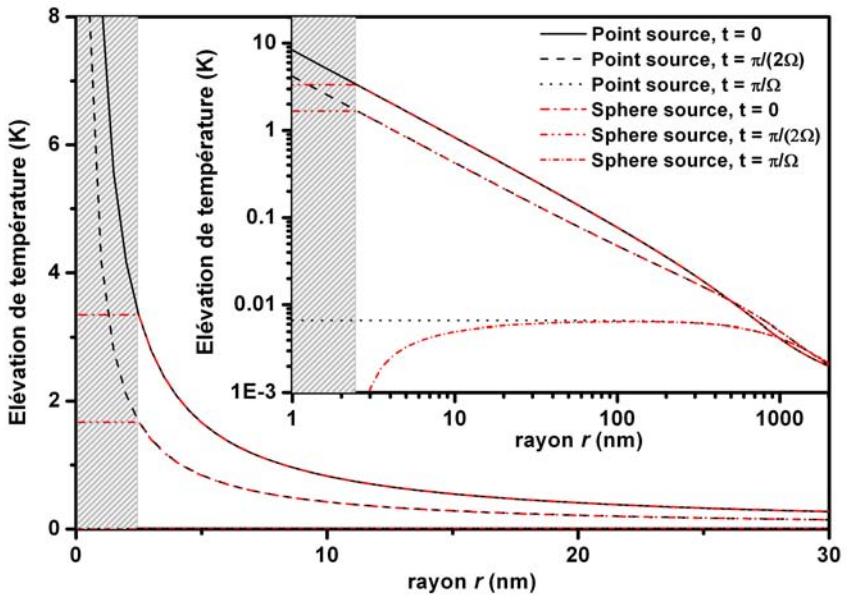

Fig. II.19 : Profils d'élévation de température au voisinage d'une nanoparticule d'or de 5 nm de diamètre excitée avec une intensité I_0 de 400 kW/cm^2 en milieu aqueux, pour les deux modèles (point source en noir, sphère source en rouge), à différents instants de la modulation ($t = 0$, $t = \pi/2\Omega$ et $t = \pi/\Omega$, c'est-à-dire aux instants pour lesquels la température à la surface de la nanoparticule est respectivement maximale, moyenne et minimale). Les deux modèles donnent des profils quasiment identiques dans la zone $r > a$. La seul différence visible, pour $t = \pi/\Omega$ (puissance déposée nulle), correspond à un effet de taille finie pour la sphère source (l'élévation de température s'annule à la paroi, pour $r = a$), alors qu'elle ne doit s'annuler que pour $r \to 0$ dans le cas du point source.

entendu que la température *moyenne* est exactement la moitié de celle-ci. Cette élévation maximale s'écrit :

$$\Delta T_{max}(a) = \frac{\sigma_{abs} I_0}{2\pi\kappa a} \tag{II.73}$$

Nous allons également évaluer l'élévation de température moyenne dans la sphère de rayon r_{th}, que l'on notera $\langle \Delta T \rangle$. Cette limite, quelque peu arbitraire, permet de donner un ordre de grandeur de la température à des échelles beaucoup plus grandes que a, plus proches de celles d'une portion de cellule. Nous la définissons par :

$$\langle \Delta T \rangle = \frac{3}{4\pi r_{th}^3} \int_a^{r_{th}} \Delta T(r,0) d^3\mathbf{r} \tag{II.74}$$

Nous allons pour cela prendre comme référence une excitation I_0 de 400 kW/cm^2, ce qui correspond à la puissance *maximale* que nous avons utilisée lors d'expériences en milieu biologique. Nous prendrons comme section efficace d'absorption celles présentées au début du Chapitre (Fig. II.1), à savoir $\sigma_{abs} = 8 \times 10^{-14}$ cm^2 pour une nanoparticule de 5 nm de

diamètre, et une loi en $\sigma_{abs} \propto a^3$. Enfin, on considérera que le milieu environnant est de l'eau pour évaluer l'élévation de température moyenne dans la sphère de rayon r_{th}. Les résultats sont présentés dans le tableau II.2.

diamètre $d = 2a$ (nm)	σ_{abs} (cm^2)	$\Delta T_{max}(a)$ (K)	$\langle \Delta T \rangle$ (K)
5	8×10^{-14}	3.3	0.014
10	6×10^{-13}	12.5	0.11
20	5×10^{-12}	52	0.89

TAB. II.2 : Élévation de température locale à la surface *au maximum de la modulation* ($\Delta T_{max}(a)$) et moyenne dans un voisinage de rayon r_{th} ($\langle \Delta T \rangle$) d'une nanoparticule d'or excitée avec une intensité I_0 de 400 kW/cm^2 en milieu aqueux.

Dans le tableau II.2, nous avons considéré une excitation constante. Mais pour les plus grosses nanoparticules, la puissance employée est en pratique beaucoup plus faible car on se fixe généralement un rapport signal à bruit donné. C'est pourquoi il est plus judicieux d'évaluer ces élévations de température à rapport signal à bruit fixe, c'est-à-dire à P_{abs} fixe. Dans ce cas, la température à la surface est simplement inversement proportionnelle à a, et la température moyenne reste la même (les seules modifications se font dans un très faible volume au voisinage immédiat de la nanoparticule), comme en témoigne le tableau II.3. On y a pris comme référence une nanoparticule de 5 nm éclairée avec $I_0 = 400$ kW/cm^2, ce qui correspond aux conditions expérimentales en milieu biologique, avec un rapport signal à bruit de 30 environ, comme nous le verrons (cf. Chapitre III).

diamètre d (nm)	$\Delta T_{max}(a)$ (K)	$\langle \Delta T \rangle$ (K)
5	3.3	0.014
10	1.7	0.014
20	0.8	0.014

TAB. II.3 : Élévation de température locale à la surface ($\Delta T_{max}(a)$) et moyenne dans un voisinage de rayon r_{th} ($\langle \Delta T \rangle$) d'une nanoparticule d'or en milieu aqueux, *pour un rapport signal à bruit fixe* (correspondant à une nanoparticule de 5 nm éclairée avec $I_0 = 400$ kW/cm^2).

On constate finalement que l'élévation de température moyen dans un rayon de quelques centaines de nanomètres est extrêmement faible, ce qui justifie l'application de la technique en milieu cellulaire : la cellule dans son ensemble n'est absolument pas chauffée. Seule l'élévation de température à la surface de la nanoparticule et dans les premiers *nanomètres* de son voisinage est non négligeable. Elle n'est alors ressentie que par les protéines servant au couplage de la nanoparticule à l'objet d'intérêt (anticorps, etc...). Mais cet échauffement demeure très faible : même en prenant des valeurs maximales comme cela a été fait ici, il ne dépasse

pas quelques degrés. On notera enfin que cette étude repose sur une description continue des milieux (nanoparticule et matrice), mais qu'aux échelles étudiées (quelques nanomètres), les notions de température et de conductivité thermique deviennent délicates à définir. On admettra simplement ici qu'elles demeurent valables et donnent un bon ordre de grandeur.

II.5 Applications de la méthode LISNA en biologie *in vitro*

Nous allons voir maintenant deux applications de la méthode LISNA sur des systèmes biologiques *in vitro*. La première, en collaboration avec la société Eppendorf et aujourd'hui aboutie, est une mise en évidence de l'intérêt de la méthode photothermique pour la lecture de puces à ADN une achevée. La seconde est en cours de développement et vise à étudier la stœchiométrie d'un complexe biochimique à l'échelle de la molécule unique, en collaboration avec plusieurs groupes de biologistes et de chimistes.

II.5.1 Application aux puces à ADN

II.5.1.a Principe des puces à ADN

Une puce à ADN est un ensemble de molécules d'ADN fixées sur une surface qui peut être du verre, du silicium ou bien encore du plastique. Cette biotechnologie récente [Schena et al., 1995] permet de visualiser les gènes exprimés (transcrits) dans une cellule d'un tissu donné, à un moment donné (embryon, adulte...) et dans un état donné (malade, saine...). La mesure de l'expression de gènes par puce à ADN s'applique à de nombreux domaines de la médecine comme l'étude de traitements, de maladies ou bien encore de stades de développement, mais également la recherche fondamentale en biologie.

La puce est une plaque de petite taille sur laquelle sont fixés des brins monocaténaires (un seul brin au lieu des deux habituels) d'ADN, chacun correspondant au brin complémentaire d'un ARN messager (ARNm). On peut fixer sur cette plaque plusieurs dizaines de milliers de fragments d'ADN (et donc étudier l'expression d'autant de gènes). Les ARNm (provenant des gènes exprimés) sont extraits de la cellule à analyser et des marqueurs (généralement des fluorophores) sont fixés dessus. Puis l'échantillon des ARNm est versé sur la plaque : chaque brin d'ARNm va s'hybrider au brin monocaténaire d'ADN qui lui est complémentaire pour former un double brin (*hybridation*). La plaque est ensuite nettoyée pour éliminer les brins d'ARNm ne s'étant pas hybridés. Elle est ensuite scannée en microscopie de fluorescence et une image de la puce est créée : chaque fois qu'il y a eu hybridation, cela est visible par un point de couleur. Les puces à ADN peuvent être fabriquées par des techniques diverses qui incluent l'impression sur des plaques de verre à l'aide de pointes, la photolithographie à l'aide de caches, de micro-miroirs, d'impression par jet d'encre, d'électrochimie sur des puces microélectroniques.

Le marquage le plus courant utilise des fluorophores couplés aux brins d'ADN ou d'ARNm complémentaires de ceux de la puce [Schena et al., 1995]. Cependant, cette technique souffre

de nombreuses limitations. L'autofluorescence liée au substrat ou à l'ADN lui-même [Raghavachari et al., 2003] introduit un biais dans les résultats, et le photoblanchiment, qui détruit une partie des marqueurs lors de la lecture, empêche de relire la puce et limite aussi le stockage des puces à ADN.

C'est pourquoi des marquages utilisant des nanoparticules métalliques ont été développés, avec deux alternatives. La première utilise des nanoparticules assez grosses ($\gtrsim$ 40 nm) pour permettre une visualisation directe par diffusion de la lumière aux longueurs d'onde visibles [Yguerabide and Yguerabide, 1998, Schultz et al., 2000]. Mais pour améliorer la réactivité et la spécificité, des particules plus petites sont préférables [Taton et al., 2000]. Leur taille ne permettant plus une détection optique directe, des techniques de révélation à l'argent ont été mises au point [Storhoff et al., 2004, Fritzsche and Taton, 2003]. Elles reposent généralement sur l'utilisation de sels d'argent et une croissance de l'argent métallique à la surface des nanoparticules d'or. Cette méthode présente cependant elle aussi des inconvénients. En effet, la taille des nanoparticules passant de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de nanomètres, il apparaît rapidement une saturation et la gamme de réponse linéaire de ce dispositif est donc limitée [Alexandre et al., 2001]. De plus, la réaction chimique de croissance de la couche d'argent peut conduire à des signaux non spécifiques comme la formation spontanée de cristaux [Alexandre et al., 2001].

II.5.1.b Lecture de puces à ADN par la méthode LISNA

Comme nous l'avons vu au cours de ce chapitre, la méthode LISNA permet de détecter des nanoparticules d'or individuelles en donnant une réponse proportionnelle au nombre de nanoparticules présentes. Son utilisation dans le cadre des puces à ADN est donc tout à fait appropriée car elle permet de détecter de petites nanoparticules d'or sans révélation à l'argent [Blab et al., 2006].

Des puces à ADN « modèles » ont été utilisées dans le cadre d'une collaboration avec Eppendorf. Elles sont formées d'une série de puits bien définis d'ADN biotinylé à des concentrations variables et de nanoparticules d'or anti-biotine de 20 nm de diamètre. Les brins d'ADN comportent 415 bases et une amine en 5'[14]. Ils ont été synthétisés par une réaction en chaîne par polymérase en utilisant une amorce aminée en 5' et des désoxyribonucléotides (éléments constitutifs de l'ADN) dCTP et dATP biotinylés[15]. Ils ont ensuite été déposés sur des lamelles de verre fonctionnalisée via un silane fonctionnel, ce qui permet d'obtenir une surface activée à l'aldéhyde. Des nanoparticules d'or de 20 nm couplées à une fonction anti-biotine (BBInternational) ont ensuite été appliquées. Différentes concentrations d'ADN ont été utilisées, dans toute la gamme permise par l'imagerie classique via révélation à l'argent (de 0 à 400 nM), ce qui permet un contrôle. Chaque ligne de la puce est constituée de 5 puits

[14] L'ADN (simple brin) est orienté : ses deux extrémités, différentes, sont notées 3' et 5'. Par exemple, la réplication de l'ADN et la transcription se font dans le sens 3' vers 5'.

[15] La biotine est une petite molécule qui possède une forte affinité (quasi covalente) avec plusieurs autres molécules, telles que la streptavidine. Ces couples sont très utilisés en biochimie et en biophysique pour « accrocher » deux objets. Pour plus de détails sur ce système, cf. V.5.2.a, page 148.

à la même concentration (Fig. II.20 (a)).

Sur chaque puits, des images LISNA ont été réalisées avec deux résolutions différentes. Les images « basse résolution » font 200×200 µm^2, avec un pas de 2 µm (Fig. II.20 (b)). Dans ces conditions, il est possible de balayer rapidement les puits complets en quelques sous-images. Dans le régime de « comptage », seule la partie centrale des puits est imagée avec une plus haute résolution (20×20 µm^2, avec un pas de 0.2 µm). Il est alors possible de distinguer les nanoparticules individuelles (Fig. II.20 (c)).

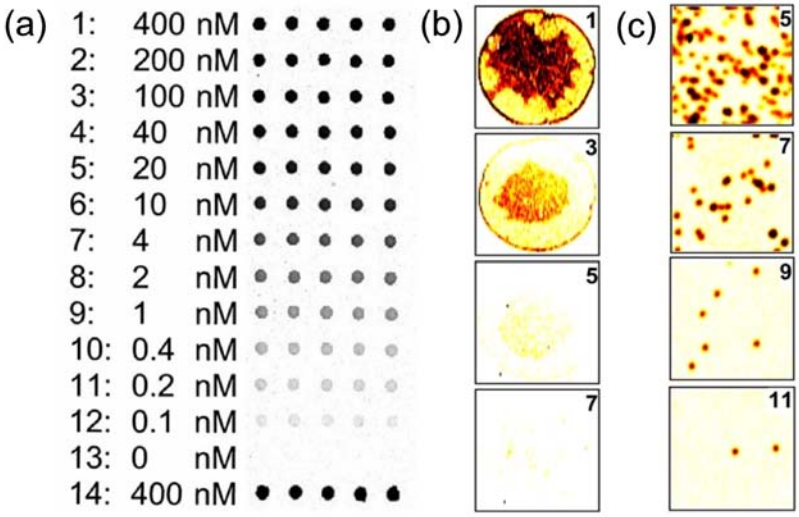

Fig. II.20 : (a) Image en lumière blanche des puits après révélation à l'argent. (b) Images « basse résolution » de puits à forte concentration. (c) Images « haute résolution » de puits à faible concentration.

Sur les images basse résolution, il n'est pas possible de visualiser les billes individuelles, mais les bords du puits sont clairement visibles. Le paramètre mesuré est alors la moyenne du signal sur l'ensemble du puits qui donne une mesure quantitative du taux d'hybridation. Le signal est linéaire sur deux ordres de grandeur. Lorsque la densité de nanoparticules est inférieure à une par pixel, on passe en mode « comptage » dans lequel on détecte chaque nanoparticule. On peut alors prolonger la série de mesures sur une décade vers les faibles concentrations (Fig. II.21), avec cependant un temps de mesure typiquement 10 fois plus long. On notera d'ailleurs que pour les cas intermédiaires (puits 5 et 6), les deux résolutions donnent des résultats identiques.

La méthode LISNA permet donc de mesurer quantitativement la concentration en ADN sur plus de trois décades (toute la gamme de concentrations testées ici). La mesure n'est plus limitée par la méthode de détection (chaque nanoparticule présente dans la zone scannée est détectée) mais par l'éventuel signal non spécifique aux faibles concentrations. Aux fortes concentrations, seule la taille des nanoparticules constitue une limite. En effet, au maximum, les nanoparticules seraient au contact, et ceci peut perturber leur réponse op-

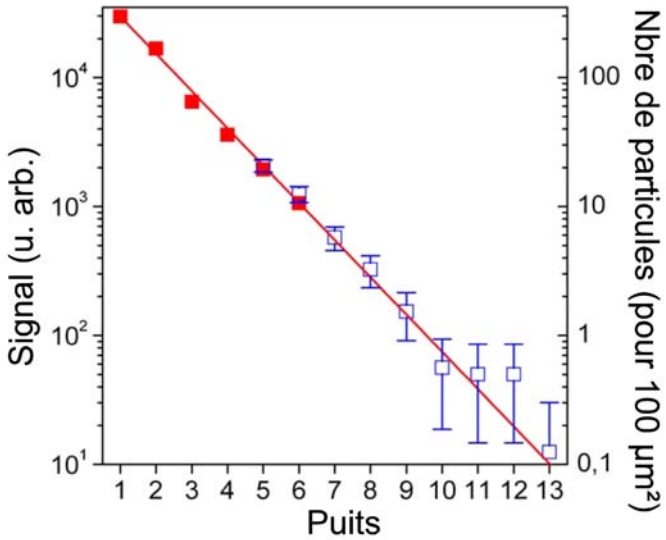

FIG. II.21 : Signal moyen à basse résolution (■) et nombre de nanoparticules par zone de 100 µm^2 (□) en fonction du puits.

tique [Sonnichsen et al., 2005]. Mais la technique LISNA permet de détecter des nanoparticules beaucoup plus petites que les billes de 20 nm utilisées ici (jusqu'à 1.4 nm de diamètre), ce qui permettrait de repousser de manière significative la limite aux fortes concentrations.

II.5.2 Étude à l'échelle de la molécule unique du complexe FGFR :FGF :HS

II.5.2.a Le complexe FGFR :FGF :HS

Dans le cadre d'une collaboration avec les groupes de David FERNIG et Mathias BRUST (Liverpool, UK), ainsi que celui de Kazuyuki SUGAHARA (Kobe, Japon), nous avons commencé une étude biochimique à l'échelle de la molécule individuelle. Il s'agit de déterminer les mécanismes de formation et la stœchiométrie du complexe FGF :FGFR :HSPG.

Les facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs) sont des petites protéines ($\approx$ 17 kDa) capables de stimuler des récepteurs spécifiques (FGFRs) et d'induire alors des cascades de signalisations ayant différents effets sur les cellules (et en particulier les fibroblastes) : prolifération, différenciation, migration, survie cellulaire... Ils sont donc essentiels au développement correct des tissus et organes. Les récepteurs quant à eux sont des protéines transmembranaires. La fixation des FGF sur les récepteurs se fait en présence de protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs, qui sont schématiquement des sucres situés à la surface des cellules). Il y a formation d'un complexe encore mal connu entre les trois types de molécules. En particulier, on sait qu'il est nécessaire d'avoir au moins une dimérisation des récepteurs pour obtenir un signal cellulaire. Cependant, la stœchiométrie exacte est sujette à débat et trois modèles issus d'expériences différentes sont proposés (FIG. II.22).

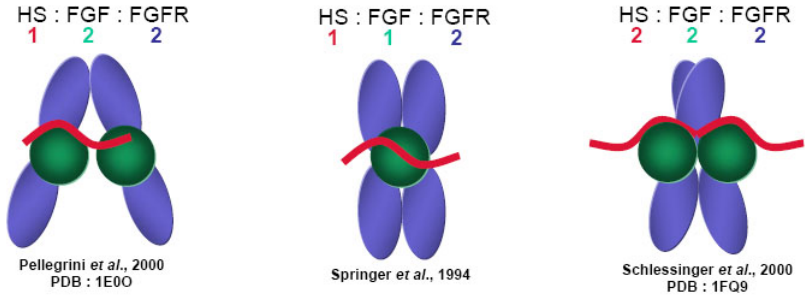

Fig. II.22 : Différentes stœchiométries présentées pour le complexe formé par le facteur de croissance fibroblastique (FGF, représenté par les cercles verts), le récepteur correspondant (FGFR, seules deux des trois boucles immunoglobulines extracellulaires sont représentées par des ellipses bleues) et les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs, représentés en trait rouge).

II.5.2.b Couplage des récepteurs FGFR1 à des nanoparticules d'or et utilisation de la méthode LISNA

Laurence Duschesne, du groupe de Dave Fernig, est parvenue à coupler une nanoparticule d'or avec un FRFR1 dans un ratio de 1 :1 selon une technique mise au point à Liverpool. Pour cela, les nanoparticules sont recouvertes d'une courte séquence peptidique (CALNN). La cystéine (C) en N-terminal comporte un groupement thiol (SH) qui a une très forte affinité (quasi-covalente) avec l'or. Les nanoparticules sont recouvertes de cette séquence (1.8 peptide/nm^2 de surface) qui les rend particulièrement stables dans une large gamme de pH et de salinité [Lévy et al., 2004]. Il est alors possible d'introduire un faible pourcentage de peptides plus longs, comportant un site de reconnaissance. En jouant sur cette concentration et par des méthodes de séparation par chromatographie, il est par exemple possible d'obtenir des billes marquées avec une et une seule biotine. Si le ratio est assez faible, on obtient environ 90% de nanoparticules sans étiquette, 10% de nanoparticules avec une seule étiquette et statistiquement aucune avec deux étiquettes ou plus [Lévy et al., 2006]. Ceci peut être utilisé pour coupler les nanoparticules à une vaste gamme de protéines.

Dans le cas qui nous intéresse ici, on utilise un faible ratio de peptides portant une étiquette constituée d'un complexe fonctionnel N-nitrilotriacétate du nickel (II) (NiNTA). Les nanoparticules sont ensuite mises en présence du récepteur FGFR1 qui a été modifié pour porter à l'une de ses extrémités une séquence de 6 histidines, qui a une forte affinité pour le nickel, et à l'autre une séquence Strep-TagII qui comme la biotine (cf. V.5.2.a, page 148) a une forte affinité pour la streptavidine [Duchesne et al., 2006]. On sélectionne alors les nanoparticules marquées en faisant passer l'ensemble sur une résine streptavidine-agarose : les billes portant un récepteur sont alors retenues. On les récupère ensuite en ajoutant de la biotine qui vient prendre leur place sur la résine (Fig. II.23).

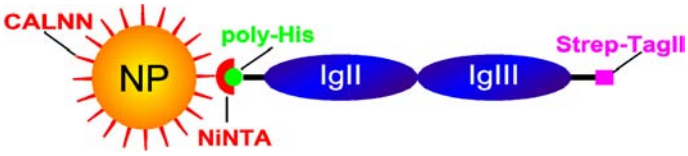

FIG. II.23 : Couplage biochimique du récepteur FGFR1 avec une nanoparticule d'or.

L'étude consiste donc maintenant à faire varier les concentrations en FGF et en HSPG et d'effectuer dans chaque cas des dépôt sur des lamelle de microscope. Ainsi, en mesurant la distribution d'intensité des signaux obtenus, nous devrions être capable de conclure quant au nombre de FGFRs impliqués dans le complexe (si le signal correspondant à deux nanoparticules devient prédominant, cela signifie que les FGFRs sont par deux). En répétant l'opération pour les FGFs et les HSPGs, nous devrions avoir accès à la stoechiométrie exacte du complexe. Des expériences préliminaires ont été réalisées en mars 2007 avec la venue de Laurence DUSCHESNE au CPMOH et ont donné des résultats encourageants (FIG. II.24), même si plusieurs problèmes expérimentaux restent à résoudre et qu'un certain nombre de contrôles sont nécessaires.

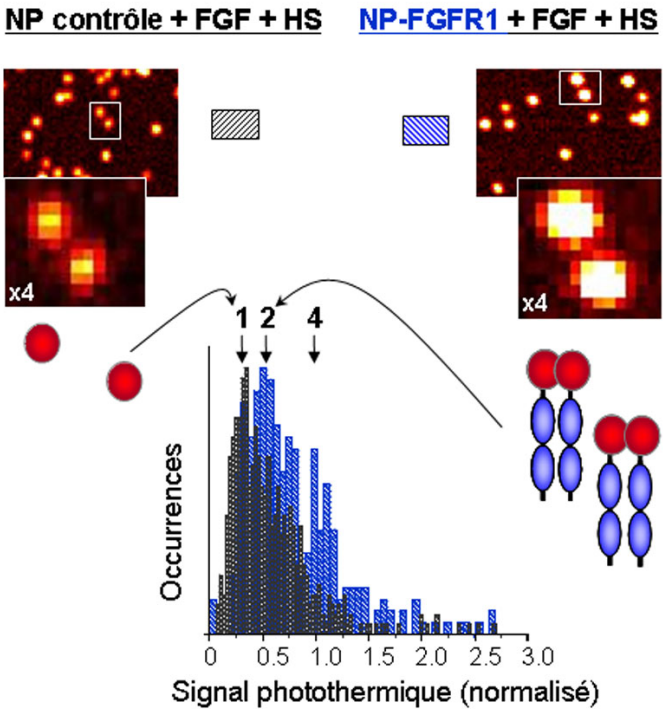

FIG. II.24 : Images et distributions de signal photothermique pour des nanoparticules contrôles ou couplées à des récepteurs FGFR1 en présence de FGF et d'HS.

II.6 Conclusion du Chapitre II

Ce Chapitre a été l'occasion de présenter une nouvelle technique de détection de nano-objets individuels. Basée sur l'effet photothermique aux échelles nanométriques, elle permet de détecter une grande variété de nano-ojets absorbants, parmi lesquels les nanoparticules d'or, qui en raison de leurs propriétés optiques, mais aussi biochimiques, constituent des candidats idéaux en tant que sondes nanométriques en milieu cellulaire. Nous avons en particulier décrit les fondements théoriques de cette technique, mais aussi sa mise en œuvre expérimentale, avec des applications *in vitro*. Dans le Chapitre suivant, nous allons voir comment cette technique a pu être utilisée pour suivre des nanoparticules d'or de 5 nm en milieu cellulaire.

Chapitre III

Détection et suivi de nanoparticules d'or individuelles en milieu cellulaire

Ce Chapitre est consacré à la technique de suivi en milieu biologique de nanoparticules d'or individuelles, baptisée SNaPT, que nous avons développée. En effet, pour passer des expériences *in vitro* aux expériences sur cellules vivantes, il a fallu adapter la technique LISNA afin de pouvoir suivre des nanoparticules d'or mobiles. Nous commencerons par exposer rapidement la problématique biologique qui sous-tend la majeure partie de ce travail de thèse. En étroite collaboration avec le groupe de Daniel Choquet, au Laboratoire de Physiolologie Cellulaire de la Synapse (CNRS - Université Bordeaux 2), nous nous sommes en effet efforcés de mettre au point de nouvelles méthodes de microscopie pour l'étude de la dynamique des récepteurs postsynaptiques. Nous verrons ensuite le principe de la méthode SNaPT, fondée sur un programme de triangulation à l'échelle nanométrique. Nous détaillerons ensuite les différentes expériences réalisées afin de valider cette méthode.

Les lecteurs qui ne sont pas familiers avec le fonctionnement de la synapse trouveront à la fin de ce Chapitre un appendice dans lequel sont détaillés les principaux concepts et définitions utiles à la compréhension de certains points techniques évoqués en particulier au début du Chapitre.

III.1 Diffusion membranaire des récepteurs postsynaptiques

III.1.1 Contexte général de l'étude des récepteurs postsynaptiques

Au niveau d'une synapse, zone de communication entre deux neurones, le signal arrivant du neurone présynaptique sous la forme d'un potentiel d'action, c'est-à-dire d'une dépolarisation de la membrane, est converti en signal chimique par la libération dans la fente synaptique des neurotransmetteurs. Sur le neurone postsynaptique, on trouve des récepteurs de neurotransmetteurs spécifiques qui activent ou non la transmission du potentiel d'action dans le neurone postsynaptique (cf. III.7.1.c, page 105). Le signal chimique est donc à nouveau converti en

signal électrique. On pense aujourd'hui que les mécanismes moléculaires élémentaires de la mémoire sont liés à ce que l'on appelle la plasticité synaptique, et en particulier aux variations du nombre (et à l'état de conduction) de ces récepteurs de neurotransmetteurs dans les synapses (cf. III.7.3, page 111).

Les mécanismes à l'origine de ces variations de population de récepteurs sont encore mal connus, mais plusieurs indices laissent à penser que la *diffusion latérale membranaire* joue un rôle essentiel. Tout d'abord, une grande proportion des récepteurs glutamatergiques sont extrasynaptiques (environ 70% pour les récepteurs ionotropiques du glutamate). De plus, l'exocytose des récepteurs GluR1 a lieu à l'extérieur des synapses [Passafaro et al., 2001], de même que leur endocytose [Blanpied et al., 2002]. Il doit donc exister une étape de diffusion membranaire précédant l'entrée de la synapse.

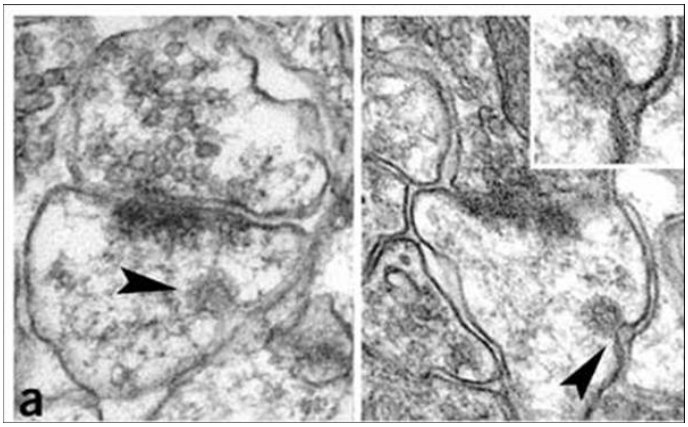

FIG. III.1 : Images en microscopie électronique de neurones. Les puits d'endocytose (flèches noires) sont clairement situés à l'extérieur de la PSD (zone dense, sur le neurone postsynaptique, en face des vésicules de neurotransmetteurs du neurone présynaptique) [Racz et al., 2004].

Enfin, des expériences de suivi de particules uniques (SPT) ont montré que ces récepteurs étaient extrêmement mobiles à l'extérieur des synapses et s'arrêtaient temporairement à la périphérie des synapses [Borgdorff and Choquet, 2002]. Ces expériences ont permis de montrer que ce récepteur alterne des mouvements diffusifs rapides et des mouvements diffusifs lents. A mesure que les neurones deviennent matures, les récepteurs demeurent confinés pendant des durées plus longues sur des surfaces plus étendues, et la diffusion, hors période de confinement, ralentit. De plus, ces lieux de résidence sont proches des synapses. Cependant, la taille des marqueurs employés (billes de latex de 500 nm de diamètre) n'a pas permis d'explorer la fente synaptique.

III.1.2 Mobilité des récepteurs à l'intérieur des synapses révélée par suivi de molécules fluorescentes individuelles

La première mise en évidence expérimentale de la diffusion des récepteurs AMPA à l'intérieur des synapses a été réalisée au sein du groupe Nanophotonique durant la thèse de Catherine Tardin. Les sous-unités GluR2 de récepteurs AMPA natifs à la surface de neurones de culture issus d'hippocampe d'embryons de rat ont été marquées avec des anticorps couplés à des fluorophores individuels (Cy5), tandis que les synapses étaient marquées au moyen d'un fluorophore spécifique (FM1-43, cf. Fig. III.2). En suivant le mouvement des fluorophores au moyen d'un montage d'épifluorescence (cf. I.2.2, page 20 et I.2.3.c, page 26), Tardin *et al.* ont montré que les récepteurs étaient mobiles à l'extérieur mais aussi à l'intérieur des synapses, avec des échanges entre les deux (Fig. III.3). De plus, les comportements diffusifs sont différents, les récepteurs extrasynaptiques présentant plutôt un comportement de diffusion libre, les récepteurs synaptiques plutôt un mouvement de diffusion confinée[1]. Enfin, l'effet de différents agents pharmacologiques simulant des phénomènes de plasticité synaptique (TTX, BAPPTA, glutamate et Bib/Gly) sur la dynamique des récepteurs a pu être testé [Tardin et al., 2003].

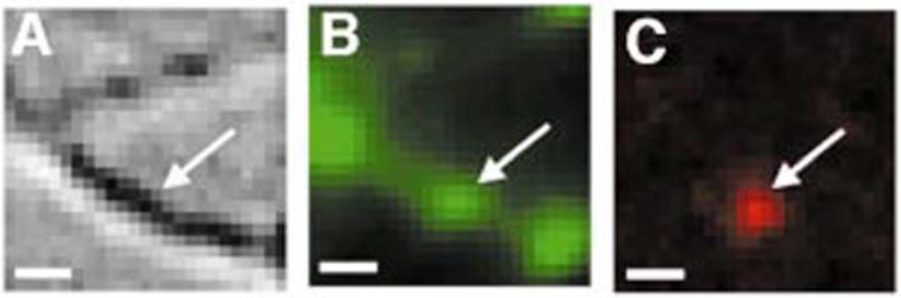

Fig. III.2 : Images simultanées d'une portion de neurone en DIC (A) et en épifluorescence. Le canal vert (B) correspond au marquage des synapses avec FM1-43. Sur le canal rouge (C), on distingue l'image, limitée par diffraction, d'un anticorps anti-GluR2 individuel marqué avec Cy5, colocalisée avec l'une des sites synaptiques de (B) (échelle = 1 µm).

Cependant, en raison du photoblanchiment rapide de fluorophores individuels (typiquement au bout d'une seconde d'observation), cette technique n'a pas permis d'accéder à des informations sur la dynamique aux temps longs des récepteurs telles que leur temps de résidence dans les synapses.

[1]Les variations de mobilité membranaire des récepteurs sont principalement dues à des changements dans les interactions entre les récepteurs et d'autres protéines membranaires et qui jouent donc un rôle fondamental dans la plasticité synaptique [Meier et al., 2001, Sergé et al., 2002, Choquet and Triller, 2003]

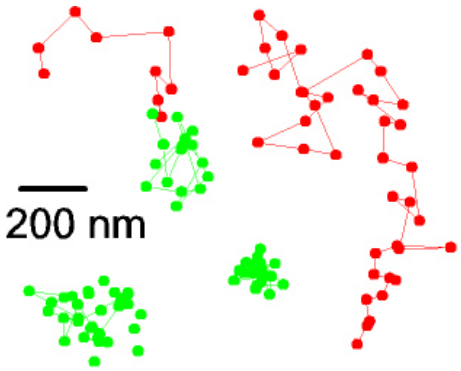

FIG. III.3 : Exemples de trajectoires synaptiques (•—•) et extrasynaptiques (•—•) enregistrées pour des récepteurs AMPA marqués avec des fluorophores Cy5 [Tardin et al., 2003].

III.1.3 Suivi de nanocristaux semiconducteurs individuels

Une approche alternative et prometteuse a été développée récemment avec l'utilisation de nanocristaux semiconducteurs comme marqueurs fluorescents. En 2003, les équipes de Maxime DAHAN et d'Antoine TRILLER ont utilisé des QDs pour suivre des récepteurs de la glycine individuels et analyser leur diffusion sur la membrane de neurones vivants pendant plusieurs minutes [Dahan et al., 2003].

D'autres études ont été menées par la suite en utilisant ces marqueurs pour la dynamique des récepteurs du glutamate. Une collaboration le laboratoire PCS et le groupe Nanophotonique a ainsi permis de suivre la dynamique des récepteurs AMPA et NMDA avec des QDs et des molécules individuelles (Cy3). Cependant, il a été noté que les Quantum Dots accédaient moins facilement dans les synapses que les molécules uniques [Groc et al., 2004]. Ceci pourrait s'expliquer par la taille relativement importante des QDs qui, s'ils sont initialement d'une taille inférieure à 10 nm, doivent être recouverts de couches de polymères ou de peptides pour être solubles et biocompatibles. Ils atteignent ainsi des tailles de l'ordre de 20 nm, ce qui n'est plus négligeable devant l'ouverture de la fente synaptique de certaines populations de synapses (environ 30 nm).

III.1.4 Questions en suspens et intérêt d'une nouvelle méthode

De nombreuses questions concernant la dynamique des récepteurs du glutamate restent donc en suspens. En particulier, il serait intéressant de pouvoir mesurer leur temps de résidence dans la région synaptique, et les modifications induites par la présence d'agents pharmacologiques. Pour cela, il faudrait accéder à l'ensemble de l'histoire d'un récepteur pour observer son arrivée et son entrée dans la zone postsynaptique, les modifications éventuelles dans son régime de diffusion, puis son départ.

Malheureusement, aucune des méthodes citées ci-dessus ne semblent pouvoir apporter de réponse à cette question, comme le résume la figure III.4. Le suivi de particules uniques ne

permet pas d'explorer la synapse et les fluorophores ont une durée d'observation trop courte. Quant aux nanocristaux, leur photophysique et leur taille relativement importante ne permet pas encore de les utiliser de manière fiable dans ce cadre.

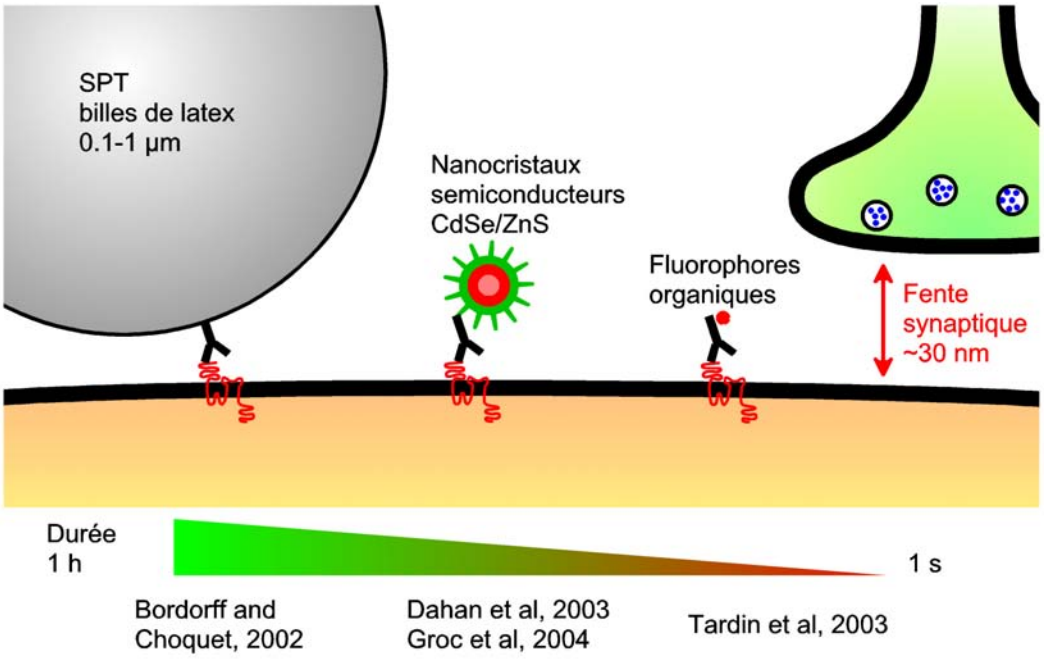

Fig. III.4 : Différentes techniques d'étude en molécule unique utilisées pour la neurobiologie et ordres de grandeurs associés.

C'est pour cette raison que nous avons développé une nouvelle technique de suivi de molécules uniques basée la méthode LISNA de détection de nano-objets non fluorescents par effet photothermique, que nous avons vue au Chapitre précédent. Nous allons montrer qu'adaptée à la biologie, elle combine les avantages d'un marqueur de taille nanométrique (nanoparticule d'or de 5 nm de diamètre) à des temps d'observation de plusieurs minutes.

III.2 Suivi Photothermique de Nanoparticules Individuelles (SNaPT) : principe et tests

III.2.1 Nécessité d'une méthode de suivi

La méthode LISNA est une méthode de type confocal. Elle nécessite une intégration de quelques millisecondes par point (généralement 5 ms), et une image est obtenue en quelques minutes en balayant ligne par ligne l'échantillon. Cette méthode n'est donc pas utilisable en l'état pour étudier un phénomène dynamique. En particulier, si l'on couple des nanoparticules d'or à des protéines membranaires sur une cellule vivante, on ne pourra pas suivre leur mouvement d'image à image. C'est pourquoi nous avons développé une méthode de suivi de

nanoparticules basée sur une triangulation qui ne nécessite que trois points de mesure pour trouver la position de l'objet.

III.2.2 Description de la méthode de suivi

La méthode SNaPT (*Single Nanoparticle Photothermal Tracking*, Suivi Photothermique de Nanoparticules Individuelles) est basée sur un algorithme de triangulation à l'échelle nanométrique, une sorte de « nano-GPS ». Conçue pour une utilisation à 2D, elle pourrait être modifiée pour une utilisation 3D sans difficulté, en utilisant 4 points de mesure au lieu de 3. Elle tire profit du fait que le profil spatial du signal d'une nanoparticule est gaussien, avec une largeur bien définie (cf. II.3.3.c, page 53) que l'on peut caractériser complètement par la position (x_0, y_0) et l'intensité du maximum de signal S_0. Ainsi, la mesure du signal en trois points bien définis aux alentours de la nanoparticule permet par ajustement de retrouver avec précision sa position et l'intensité de son signal.

En pratique, après acquisition d'une image LISNA mettant en évidence la présence de nanoparticules en mouvement, ce qui se traduit pas des signaux sous formes de petits traits (cf. III.3.3, page 92), une zone de travail est définie dans laquelle le signal est mesuré à différentes positions (au choix : aléatoirement, en balayant ligne à ligne, ou en un point fixe) jusqu'à ce qu'un signal supérieur au seuil préalablement défini par l'utilisateur soit détecté. A partir de ce point, trois mesures sont effectuées aux sommets d'un triangle équilatéral centré sur cette position. Un premier triplet de coordonnées (x_t, y_t, S_t) est ainsi déterminé. Si le signal S_t est au-dessus d'un second seuil (défini en tenant compte de l'intensité du bruit de fond), la procédure est répétée de manière itérative en recentrant le triangle équilatéral sur (x_t, y_t) pour la mesure suivante qui donnera $(x_{t+\Delta t}, y_{t+\Delta t}, S_{t+\Delta t})$, et ainsi de suite. On obtient ainsi directement la trajectoire complète de la nanoparticule.

Cette technique permet d'acquérir directement des trajectoires à cadence vidéo. En effet, nous utilisons des temps d'intégration de 5 ms séparés par 6 ms de temps d'attente pour le transfert de données, le calcul, et surtout pour assurer la stabilité du piézo-scanner, ce qui donne une fréquence d'environ 30 Hz. La vitesse maximum d'une nanoparticule en mouvement est limitée par le fait que durant l'acquisition des trois mesures, l'objet ne doit pas s'échapper du triangle de détection. En utilisant un rayon de triangulation de $r_0 \approx 180$ nm ($\approx$ 1.5x la largeur du signal LISNA d'une nanoparticule), cette limite devrait être de l'ordre de $r_0^2/4\Delta t \approx 0.2$ µm^2/s (en termes de constante de diffusion, cf. III.2.3, page 86).

III.2.3 Analyse des trajectoires

Les trajectoires sont la plupart du temps analysées en termes de déplacement quadratique moyen (MSD, *Mean Square Displacement*) en fonction du temps :

$$\Delta r^2(\delta t) = \left\langle (x(t+\delta t) - x(t))^2 + (y(t+\delta t) - y(t))^2 \right\rangle_t \tag{III.1}$$

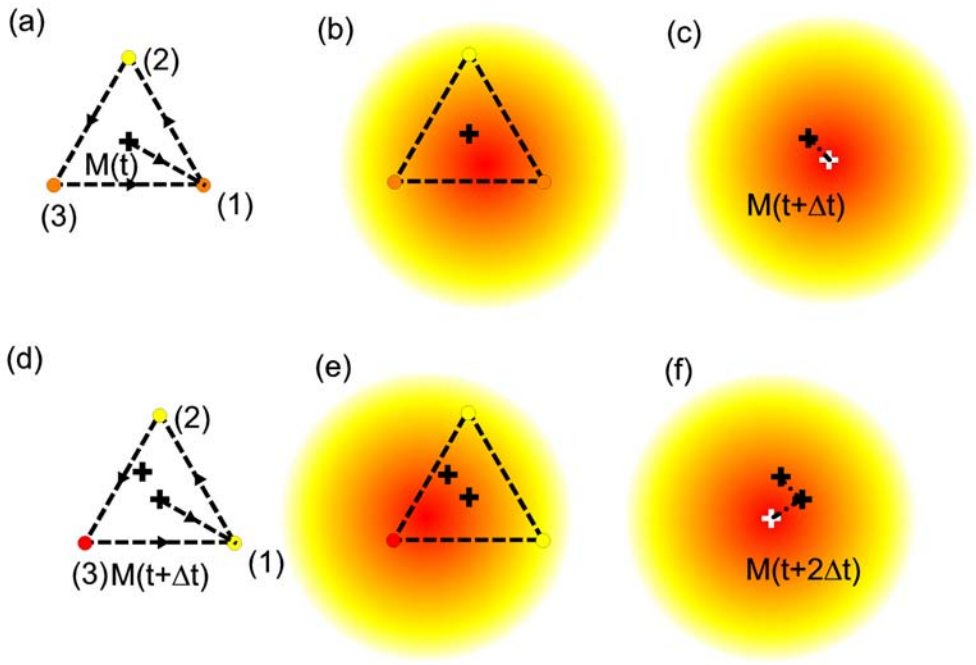

Fig. III.5 : Schéma décrivant l'algorithme de suivi de nanoparticules : (a) A partir d'un premier point où un signal non négligeable a été détecté, trois mesures consécutives sont effectuées aux sommets d'un triangle équilatéral. (b) Le signal est interpolé avec une gaussienne de largeur connue. (c) La position du maximum de signal donne la position de la nanoparticule. (d) Le triangle de mesure est recentré sur la position trouvée et trois points sont à nouveau évalués. (e) Nouvelle interpolation. (f) Le point suivant de la trajectoire est obtenu.

Pour un mouvement brownien (cf. V.1.4, page 134) à 2 dimensions, on peut montrer que :

$$\Delta r^2(\delta t) = 4D\delta t \tag{III.2}$$

où D est la constante de diffusion .

On peut également montrer qu'un décalage Δr_0^2 doit être introduit pour tenir compte de la précision de pointé (correspondant en fait à $\sqrt{\Delta r_0^2}$) de l'appareil [Saxton and Jacobson, 1997] ; on peut se convaincre aisément qu'un objet fixe donne un MSD constant si le système de détection oscille aléatoirement autour de sa position réelle.

Dans le cas de la diffusion membranaire de protéines, le mouvement n'est souvent pas rigoureusement brownien (cf. III.1, page 81). On trouve par exemple assez couramment des mouvements de type diffusion confinée, qui se traduisent par une saturation de $\Delta r^2(\delta t)$ aux temps longs, vers une valeur correspondant à la taille caractéristique r_c du domaine exploré

[Saxton and Jacobson, 1997] :

$$\Delta r^2(\delta t) = \langle r_c^2 \rangle \left[1 - A_1 \exp\left(-4A_2\delta t / \langle r_c^2 \rangle\right)\right] \tag{III.3}$$

où A_1 et A_2 sont des constantes dépendant de la géométrie du domaine de confinement.

III.2.4 Tests sur trajectoires simulées

Afin de déterminer les possibilités et la validité de la méthode de suivi, nous l'avons testée sur des trajectoires browniennes simulées. A chaque pas de temps Δt, un déplacement dans la direction définie par l'angle θ et de longueur r aléatoires, respectant la statistique d'un mouvement brownien de constante D, est généré et utilisé pour piloter la platine piézo-électrique :

$$p(\theta) = \frac{1}{2\pi} \tag{III.4}$$

$$p(r) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D\Delta t}} \exp\left(-\frac{r^2}{4D\Delta t}\right) \tag{III.5}$$

On utilise un échantillon de nanoparticules fixes et on lance en parallèle le programme de suivi et celui générant les pas aléatoires ; on reconstitue alors la trajectoire simulée. Les tests ont été réalisés pour un rapport signal à bruit de 30. A partir des trajectoires obtenues, pour chaque valeur de la constante de diffusion imposée D_{in}, plusieurs paramètres ont été évalués. Le premier est le pourcentage de traces suivies jusqu'au bout (limite fixée à 200 points, soit 7.5 s). Le second est la constante de diffusion mesurée D_{out}, mesurée à partir du déplacement quadratique moyen (cf. III.2.3, page 86). Le troisième est l'écart entre la trajectoire simulée et la trajectoire mesurée, qui donne la précision de pointé (FIG. III.6).

Pour un rapport signal à bruit de 30, en utilisant un rayon de triangulation de 180 nm, il apparaît une valeur limite de D_{in}, de l'ordre de $D_{max} \approx 0.15$ µm^2/s, au-delà de laquelle la plupart des trajectoires sont perdues en cours de route (FIG. III.7). Elle correspond effectivement à la limite attendue compte tenu de la vitesse d'acquisition (cf. III.2.2). En deçà de cette limite, les valeurs de D_{out} mesurées sont en très bon accord avec les valeurs générées sur plus de deux ordres de grandeur.

L'écart type de la différence entre les trajectoires mesurées et simulées donne la précision de pointé de la méthode. Elle dépend essentiellement du rapport signal à bruit : de l'ordre de 20 nm pour un RSB de 30, elle atteint 7 nm pour un RSB de 100. Elle dépend par contre assez peu de la vitesse de diffusion tant que celle-ci reste inférieure à D_{max} (FIG. III.8).

Quelques trajectoires rapides (0.15 à 0.3 µm^2/s) ont également pu être obtenues. Nous verrons (cf. III.5, page 100) comment il serait possible d'améliorer ces performances dans l'avenir.

Cette analyse donne enfin la limite pour les basses constantes de diffusion, qui se confondent avec les objets immobiles, pour lesquels une constante de diffusion apparente de $4 \pm 10 \times$

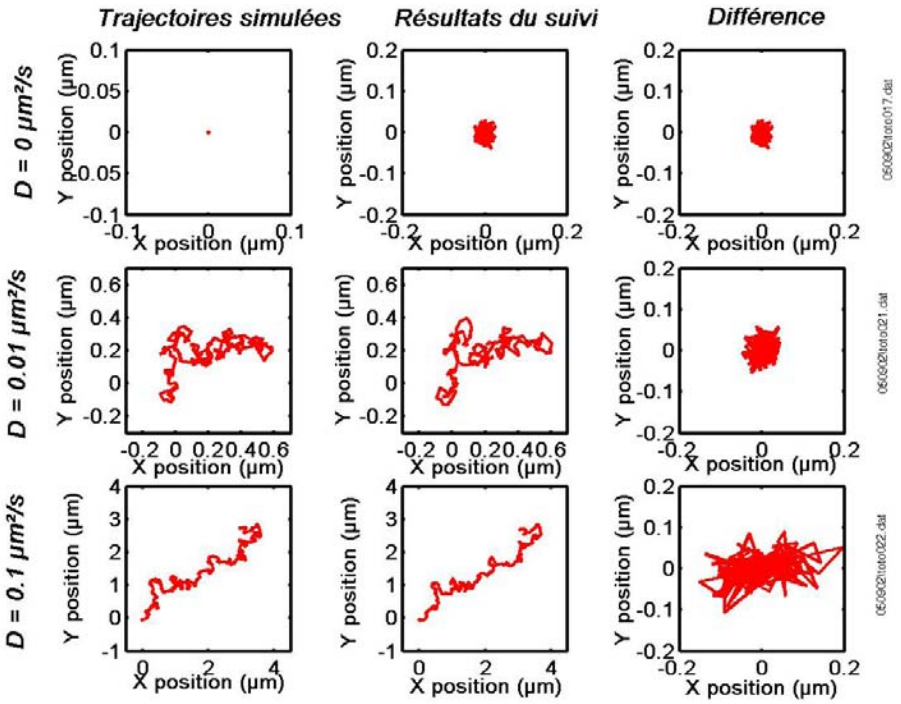

Fig. III.6 : Exemples de trajectoires simulées et suivies par le programme (RSB≈ 30) ; la différence donne la précision de pointé.

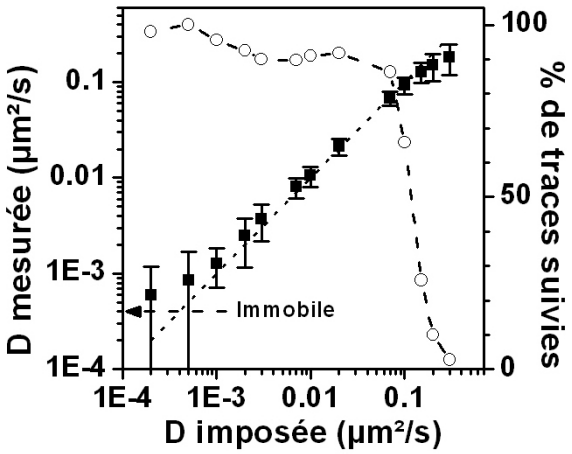

Fig. III.7 : Performances de la méthodes de suivi : (○) pourcentage de traces suivies ; (■) constantes de diffusion mesurées (et dispersion) pour le mouvement brownien 2D simulé de billes d'or fixées dans un film de PVA (RSB ≈ 30). La flèche indique la constante de diffusion moyenne apparente trouvée pour des nanoparticules immobiles (4×10^{-4} µm^2/s).

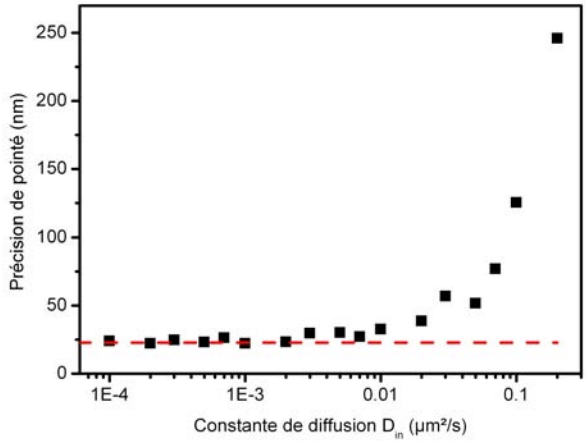

FIG. III.8 : (■) Précision de pointé du SNaPT en fonction de la constante de diffusion, évaluée à partir de l'écart aux trajectoires simulées, pour un RSB de 30. (- -) Précision de pointé pour un objet immobile (22 nm).

10^{-4} µm^2/s a été mesurée. La limite de sensibilité de la technique a donc été fixée à un écart-type au-dessus de la moyenne des constantes de diffusion apparentes mesurées sur des objets immobiles, soit $D_{min} = 1.4 \times 10^{-3}$ µm^2/s.

III.3 Étude d'un système modèle : la diffusion membranaire de récepteurs postsynaptiques sur des cellules COS-7 transfectées

III.3.1 Système biologique étudié

Afin de valider la méthode SNaPT comme un outil valide pour des études en biologie, nous avons réalisé un certain nombre de contrôles sur un système modèle constitué de cellules COS-7 . Ce sont à l'origine des cellules rénales de singe vert d'Afrique, traitées avec un virus (SV40) qui les rend tumorales : les cellules se divisent ainsi quasiment indéfiniment. Elles sont ensemencées deux fois par semaine selon le protocole donné en annexe (cf. B.1, page 161), ce qui consiste à les décoller de leur support et à les diluer à 1/10 avant de les laisser se redéposer sur un support, par exemple sur des lamelles de microscope, où elles vont continuer à se diviser.

Ces cellules n'expriment pas naturellement de récepteurs postsynaptiques. Elles sont donc *transfectées* selon le protocole donné en annexe (cf. B.2, page 162). Cette opération consiste à introduire dans les cellules une séquence d'ADN codant pour une protéine, en l'occurrence un récepteur de neurotransmetteur mGluR5a (cf. III.7.2.c). Ce récepteur est modifié pour porter en N-terminal (à son extrémité extracellulaire) une *étiquette* myc, c'est-à-dire une séquence d'acides aminés qui est reconnue par des anticorps spécifiques. Ce récepteur a déjà été étudié

au sein du laboratoire PCS [Sergé et al., 2002].

Ces récepteurs sont marqués au moyen d'anticorps (IgG) anti-myc portant un fluorophore Cy5 qui servira pour des expériences de contrôle en SMT. On utilise ensuite un second anticorps spécifique au premier (anti IgG) portant une nanoparticule d'or de 5 ou 10 nm de diamètre.

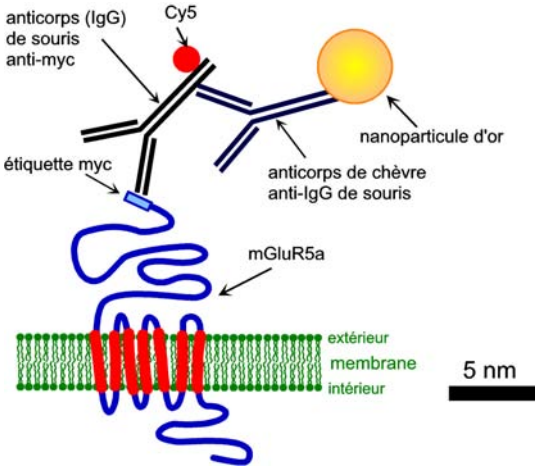

Fig. III.9 : Système biologique étudié : cellules COS-7 transfectées avec mGluR5a-N-myc, marquées avec un premier anticorps anti-myc couplé à Cy5, puis un second anticorps spécifique au premier portant une nanoparticule d'or (5 ou 10 nm).

III.3.2 Protocole de préparation des échantillons

Initialement préparées par Pierre Gonzalez au laboratoire de Physiologie Cellulaire de la Synapse, les cellules COS-7 ont ensuite été cultivées au laboratoire dans du milieu DMEM contenant de la streptomycine (100 µg/mL), de la pénicilline (100 U/mL), et 10% de serum bovin sous atmosphère humide à 5% de CO_2 et à 37°C. Utilisées pendant 12 à 15 passages, les cellules sont étalées tous les 4 jours et déposées sur des lamelles de 15 mm de diamètre. Lorsque la confluence (pourcentage de la surface recouverte par les cellules) atteint 30%, elles sont incubées avec 1 µL de FUGENE et 0.5 µg d'ADN codant pour un mutant de mGluR5a portant une étiquette myc en N-terminal, à l'extrémité extracellulaire [Sergé et al., 2002], avec une efficacité de transfection de l'ordre de 40%.

Douze heures après la transfection, on effectue une première incubation avec des anticorps (IgG de souris, anti-myc, 20 µg/mL) marqués avec Cy5 (Auroprobes Amersham, voir protocole de couplage en annexe B.3, page 163) pendant 3 minutes à température ambiante. Après trois rinçages dans du PBS, les cellules sont incubées avec des anticorps anti-IgG (anticorps de chèvre, anti-IgG de souris) portant des nanoparticules d'or (BBInternational, 300 ng/mL) pendant 3 minutes à température ambiante. Après trois nouveaux rinçages, les lamelles sont montées sur un porte-échantillon en les fixant avec un anneau de graisse à vide. On dépose 150 µL de milieu de culture additionné d'Hepes à 20mM (pour maintenir le pH en l'absence de

CO_2, puis une seconde lamelle est posée de manière non étanche afin d'obtenir une chambre ouverte. Toutes les mesures sont effectuées à température ambiante dans les 20 minutes qui suivent le dernier rinçage.

III.3.3 Images et trajectoires obtenues

Les échantillons cellulaires ont tout d'abord été observés en épifluorescence afin de repérer les cellules transfectées. Celles-ci sont clairement visibles grâce au marquage avec le premier anticorps portant Cy5. Les images LISNA alors réalisées sur ces cellules marquées (en utilisant une puissance moyenne de 400 kW/cm^2 pour les billes de 5 nm et 200 kW/cm^2 pour les billes de 10 nm, avec un temps d'intégration de 5 ms) montrent des signaux punctiformes dûs à des nanoparticules liées à des récepteurs fixes ou faiblement mobiles. Mais la plupart des signaux ont la forme de petits traits correspondant au passage des nanoparticules à travers le faisceau pendant le balayage, ligne après ligne, de l'échantillon (FIG. III.10).

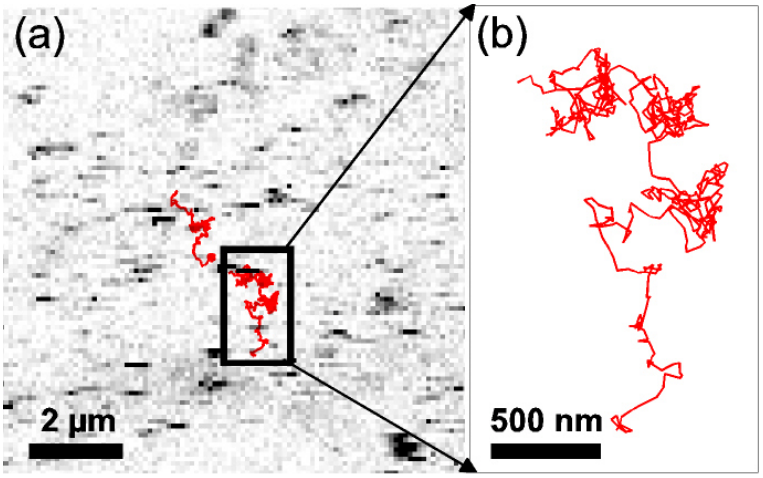

FIG. III.10 : (a) Image LISNA d'une portion (10×10 µm) de cellule COS-7 marquées avec des nanoparticules de 5 nm (RSB ≈ 30). (—) Exemples de trajectoires obtenus par SNaPT (b) Zoom sur l'une des trajectoires.

Toutes les cellules présentent également un signal LISNA structuré près du noyau. Ce signal est dû aux mitochondries, comme nous le verrons (cf. Chapitre IV). Nous avons donc exploré des portions de cellules éloignées du noyau, dans lesquelles aucun signal intrinsèque aux cellules n'est observé. Ces zones présentent d'autant plus d'intérêt qu'elles sont relativement plates, ce qui permet d'employer sans problème le programme de suivi de nanoparticules à 2D. Dans ces zones, nous avons utilisé la technique SNaPT pour obtenir des trajectoires de protéines membranaires. Le rapport signal à bruit en milieu cellulaire est de l'ordre de 30 dans les conditions présentées ici. Deux exemples de trajectoires (d'une durée de 20 secondes chacune) ainsi qu'un grossissement sur l'une d'elles sont présentés sur la FIG. III.10. On remarque dès à présent une grande variété de régimes de diffusion et des changements de régimes rapides à l'intérieur d'une même trajectoire. Ce phénomène a déjà été observé (par

des méthodes de fluorescence notemment) sur des cellules PtK-2 (une autre lignée cellulaire couramment employée) et des neurones [Sergé et al., 2002].

III.3.4 Suivi de fluorophores individuels (SMT)

Nous avons souhaité valider la méthode SNaPT en la comparant à une méthode couramment employée : le suivi de molécules uniques fluorescentes (cf. I.2.3.c, page 26). C'est pourquoi nous avons utilisé comme anticorps primaire un anticorps marqué avec un fluorophore Cy5. Parallèlement aux expériences en SNaPT, un certain nombre d'échantillons (réalisés de la même manière, mais sans marquage secondaire) ont été observés en épifluorescence.

Pour cela, nous avons réalisé des expériences en épifluorescence en utilisant le laser HeNe. Les échantillons sont illuminés pendant 10 ms sur une surface de 20×20 µm^2 avec une intensité de 7 ± 1 kW/cm^2, et la fréquence d'acquisition est de 30 Hz. La fluorescence est collectées via des filtres (DCLP 650 et HQ 700/100) sur une caméra CCD.

A partir des séquences vidéo obtenues, les trajectoires des protéines sont reconstituées grâce à un programme d'analyse d'images sous Matlab [Schmidt et al., 1995] [Schuetz et al., 1997, Tardin et al., 2003]. Celui-ci détecte sur chaque image les points lumineux via un ajustement gaussien (ajustement le mieux adapté à ce type d'études [Cheezum et al., 2001]) d'une largeur à mi-hauteur de 360 ± 40 nm, ce qui correspond à la résolution du dispositif d'imagerie. Puis les points sont connectés d'image à image en calculant la probabilité pour que deux pics détectés dans des images successives puissent correspondre à une même trajectoire (algorithme de Vogel). Les traces sont arrêtées lors du premier photoblanchiment. Seules les trajectoires d'au moins 25 points ont été retenues.

III.3.5 Analyse des trajectoires et comparaison entre les deux méthodes

Pour toutes les trajectoires, le Déplacement Quadratique Moyen (MSD) est calculé sur les 25 premiers points (750 ms) de la trajectoire (en décalant de 10 points pour les trajectoires SNaPT afin d'éviter la phase d'accrochage du signal). On détermine des « constantes de diffusion » instantanées D_{1-7} données par la pente à l'origine (sur les 7 premiers points) des MSD calculées sur des portions de trajectoires de 25 points consécutifs (Fig. III.11). Il ne s'agit pas là de constantes de diffusion à proprement parler, le mouvement n'étant pas toujours brownien, mais cet abus de langage est couramment utilisé, et ce paramètre est bien adapté aux études biologiques. On étudie en particulier la distribution de ces « constantes » en fonction des facteurs expérimentaux.

La distribution des constantes de diffusion instantanées obtenues est justement présentée sur la figure III.12. Sur chaque graphe, le nombre d'événements recensés est indiqué en fonction de la gamme de constantes de diffusion concernée (échelle logarithmique pour D en raison de la grande diversité des régimes de diffusion rencontrés). La première barre, en blanc et marquée d'une étoile, concerne l'ensemble des points immobiles, ou si faiblement mobiles que le mouvement n'est pas discernable. Cette limite est de $D_{min} = 1.4 \times 10^{-4}$ µm^2/s pour les

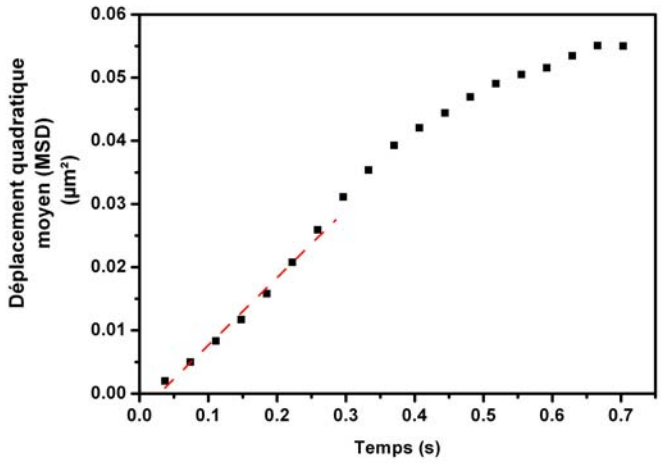

FIG. III.11 : Déplacement quadratique moyen calculé sur une portion de la trajectoire présentée sur la figure III.10 (b). La « constante de diffusion » instantanée D_{1-7} est calculée en prenant la pente à l'origine (sur les 7 premiers points).

trajectoires SNaPT (cf. III.2.4, page 88), et légèrement plus importante ($D_{min} = 2 \times 10^{-4}$ µm^2/s) pour les trajectoires SMT.

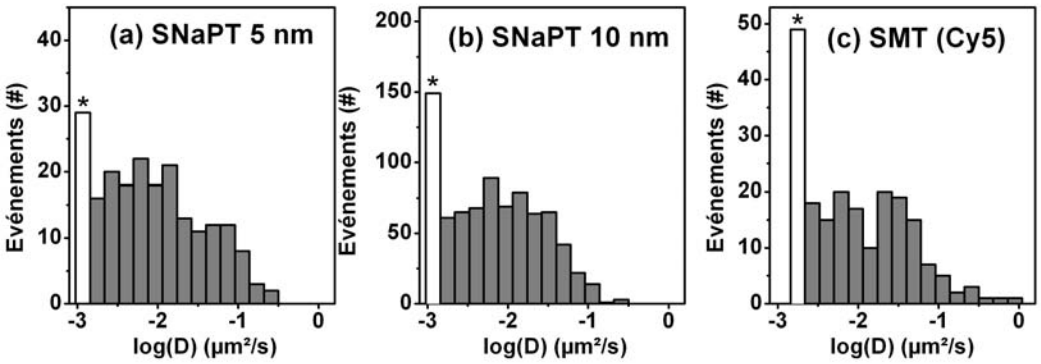

FIG. III.12 : Distribution des constantes de diffusion instantannées mesurées (a) en SNaPT avec des nanoparticules de 5 nm, (b) en SNaPT avec des nanoparticules de 10 nm (c) en SMT avec Cy5. La première barre de chaque graphe (*) contient toutes les données pour lesquelles $D < D_{min}$.

On constate que les trois distributions sont semblables. Ceci a été confirmé par un test de MANN-WHTNEY-WILCOXON [Mann and Whitney, 1947, Wilcoxon, 1945] attestant que les médianes des trois distributions ne sont pas significativement différentes.

Cette étude permet d'affirmer que la méthode SNaPT donne des résultats comparables au suivi de molécules uniques aux échelles de temps courts.

III.3.6 Analyse du signal mesuré en SNaPT

Bien que le signal calculé à l'issue de la procédure de triangulation présente des fluctuations plus importantes lorsque la protéine diffuse plus rapidement, il demeure relativement stable durant l'ensemble de la mesure (Fig. III.13). Ceci permet de déterminer précisément le nombre de nanoparticules suivies. On peut déduire de l'ensemble des 48 traces obtenues avec des nanoparticules de 5 nm de diamètre la distribution des signaux LISNA calculés par triangulation (Fig. III.14). Celle-ci présente clairement deux pics correspondant aux particules seules et aux doublets (deux billes sur le même anticorps, ou deux anticorps sur la même protéine) [Cognet et al., 2003].

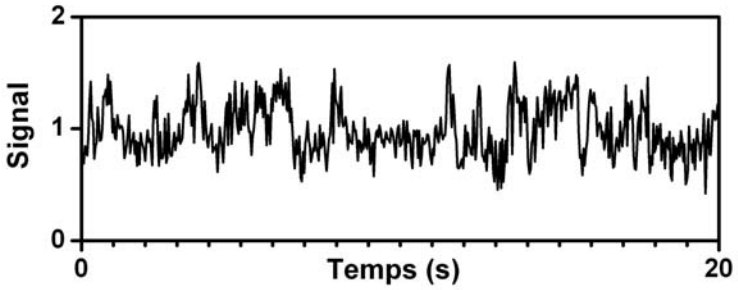

Fig. III.13 : Signal mesuré (reconstitué par triangulation) au cours de la trajectoire présentée sur la figure III.10.

III.3.7 Non-invasivité de la méthode LISNA

Nous allons maintenant justifier que les intensités laser utilisées dans les expériences décrites ci-dessus n'induisent pas d'effet sur les objets biologiques étudiés afin de pouvoir les utiliser avec fiabilité en milieu cellulaire.

Tout d'abord, l'élévation de température à la surface d'une nanoparticule a été calculée précédemment (cf. II.4, page 64). Pour une nanoparticule d'or de 5 nm dans un milieu aqueux, avec une intensité d'excitation de 400 kW/cm^2, elle n'est que d'environ 3.3 K. De plus, le profil de température décroît comme l'inverse de la distance à la surface de la nanoparticule (à 2.5 nm de la surface, cette élévation de température est donc divisée par 2, soit 1.7 K). Par ailleurs, sur les temps courts, les résultats obtenus par SNaPT et SMT sont semblables, malgré des intensités d'excitation très différentes.

Un troisième test a été réalisé en observant 115 trajectoires SNaPT de 600 points (20 s) sur 15 cellules différentes (nanoparticules de 5 nm) et en calculant D sur une fenêtre glissante de 25 points consécutifs le long de la trajectoire et chaque séquence est analysée séparément. Le MSD est là aussi calculé sur ces 25 points glissants, et la distribution de D_{1-7} obtenue pour chaque fenêtre est évaluée. La figure III.15 montre que la fraction d'objets immobiles reste constante, de même que la valeur moyenne et l'écart-type de la distribution de la fraction mobile. Ceci montre que la méthode SNaPT (et en particulier l'illumination laser) n'induit

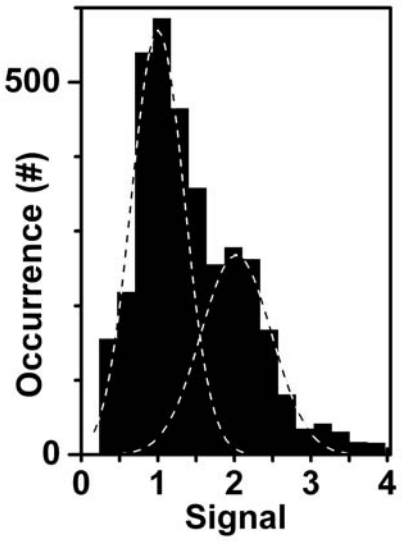

FIG. III.14 : Distribution des signaux pour l'ensemble des traces obtenues (cellules COS-7 marquées avec des nanoparticules de 5 nm). Elle présente clairement deux pics correspondant aux particules seules et aux doublets (deux billes sur le même anticorps, ou deux anticorps sur la même protéine. On note également une faible proportion d'événements correspondant à 3 nanoparticules.

pas de modifications locales dans le comportement diffusif des protéines membranaires aux échelles de temps étudiées.

Enfin, trois zones de 2×2 µm^2 ont été illuminées continûment pendant 10 minutes chacune avec un laser d'excitation à 532 nm avec une intensité de 400 kW/cm^2. La comparaison entre les images avant et après illumination (FIG. III.16) montre que la morphologie des cellules n'a pas été affectée, ce qui permet de penser que la technique LISNA n'induit pas de dommages majeurs aux cellules.

III.4 Suivi de nanoparticules d'or individuelles sur neurones vivants

III.4.1 Système biologique étudié

Nous avons montré dans la section précédente que la méthode SNaPT permettait des études en molécule unique sur cellules vivantes, avec un intérêt particulier lorsqu'il est nécessaire de pouvoir suivre un objet pendant des temps longs avec un marqueur de taille nanométrique. C'est bien évidemment le cas de la problématique biologique posée au début du Chapitre, à savoir la diffusion membranaire des récepteurs de neurotransmetteurs dans la zone synaptique. Nous avons donc montré que la technique SNaPT devait pouvoir apporter des informations intéressantes dans ce cadre.

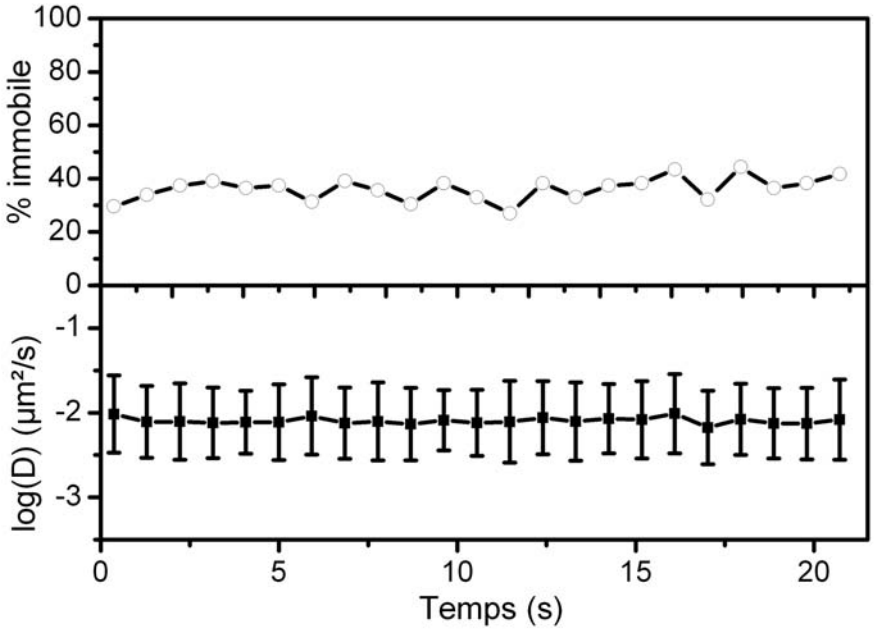

Fig. III.15 : (○) Pourcentage de récepteurs immobiles et (■) moyenne (et écart-type) des constantes de diffusion (pour la fraction mobile) en fonction du temps (SNaPT 5 nm sur COS-7).

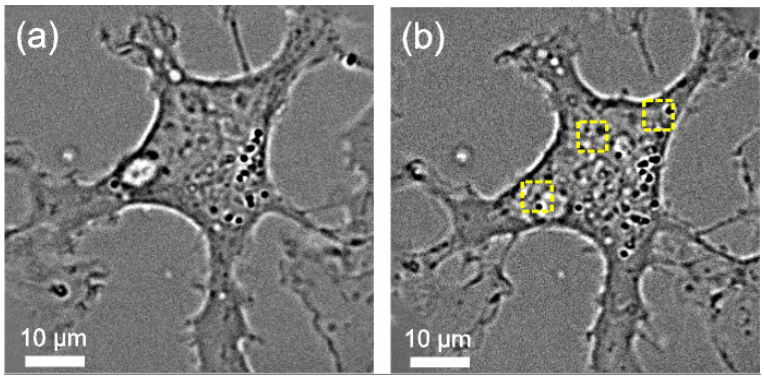

Fig. III.16 : Images en lumière blanche d'une cellule COS-7 avant (a) et après (b) illumination de 3×10 minutes dans les zones indiquées (- -).

Nous avons pour cela utilisé des neurones d'hippocampe d'embryon de rat en culture. Ceux-ci portent naturellement des récepteurs au glutamate de type AMPA. Nous avons marqué les sous-unités GluR2 de ces récepteurs AMPA au moyen d'anticorps spécifiques. La seconde étape de marquage utilise des fragments F(ab')2 d'anticorps[2] spécifiques au premier (anti-IgG) portant une nanoparticule d'or de 5 nm de diamètre.

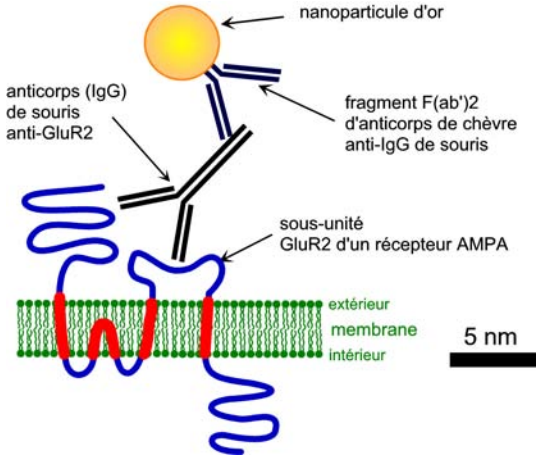

FIG. III.17 : Système biologique étudié : neurones vivants marqués avec un premier anticorps anti-GluR2, puis un fragment F(ab')2 d'anticorps spécifique au premier portant un nanoparticule d'or de 5 nm.

III.4.2 Protocole de préparation des échantillons

Les neurones sont préparés au laboratoire de Physiologie Cellulaire de la Synapse par Christelle BREILLAT et Delphine BOUCHER-TEISSIER. Ce sont des neurones extraits de l'hippocampe d'embryons de rats de 18 jours par dissection. En effet, les neurones ont la propriété de ne pas se multiplier, il faut donc en extraire pour chaque expérience. Ils sont dissociés les uns des autres avec de la trypsine puis déposés sur des lamelles de 15 mm en présence de milieu de culture. Après une dizaine d'heures, les lamelles sur lesquelles les neurones se sont fixés sont retournées et suspendues au-dessus d'un tapis de cellules gliales au moyen de petits plots de parafine. Les cellules gliales assurent entre autres la nutrition des neurones. L'ensemble peut ensuite être maintenu plusieurs semaines *in vitro* dans un incubateur à 37°C. Dans les expériences qui suivent, des neurones âgés de 7 à 10 jours *in vitro* (7-10 DIV) ont été utilisés.

On effectue une première incubation avec des anticorps (IgG de souris, anti-GluR2, 10 µg/mL) pendant 3 minutes à température ambiante. Après trois rinçages dans du milieu de culture N2 additionné d'Hepes à 20 mM, les neurones sont incubés avec des anticorps anti-IgG (fragments F(ab')2 d'anticorps de chèvre, anti-IgG de souris) portant des nanoparticules

[2]un fragment F(ab')2 d'un anticorps est constitué des deux « bras » du Y et du site de liaison entre les deux, il possède deux sites de reconnaissance, mais est sensiblement plus petit que l'anticorps complet.

d'or de 5 nm de diamètre (BBInternational, 300 ng/mL) pendant 3 minutes à température ambiante. Après trois nouveaux rinçages, les lamelles sont montées sur un porte-échantillon en les fixant avec un anneau de graisse à vide. On dépose 150 µL de milieu de culture additionné d'Hepes à 20 mM, puis une seconde lamelle est posée de manière non étanche afin d'obtenir une chambre ouverte. Toutes les mesures sont effectuées à température ambiante dans les 20 minutes qui suivent le dernier rinçage.

III.4.3 Résultats

Comme dans le cas des cellules COS-7, les images LISNA obtenues montrent des nanoparticules immobiles, mais aussi un grand nombre de signaux caractéristiques de billes en mouvement (Fig. III.18). On distingue aussi parfois dans certaines zones un signal intrinsèque aux neurones lié aux mitochondries (cf. IV, page 115). En choisissant des neurites pauvres en mitochondries, nous avons pu enregistrer des trajectoires de billes de 5 nm pendant plus de 5 minutes (> 10000 points de mesure).

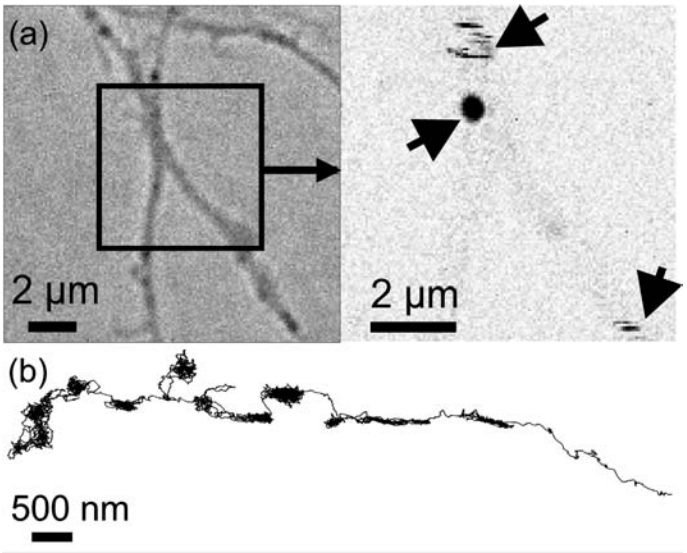

Fig. III.18 : (a) Image en lumière blanche (gauche) et images LISNA (droite) d'une portion de neurone marqué avec des nanoparticules de 5 nm de diamètre. Sur l'image LISNA on distingue 2 récepteurs mobiles (traits) et un immobile (point), repérés par les flèches. (b) Trajectoire d'une nanoparticule de 5 nm (plus de 5 minutes, 9158 points) obtenue à cadence vidéo sur un neurone vivant.

La figure III.18 (b) montre un exemple de trajectoire obtenue sur un neurone vivant. On y distingue nettement la forme du neurite sur lequel se déplace le récepteur suivi, ainsi que des changements de régime de diffusion, parfois libre et parfois plus confiné. Ceux-ci pourraient correspondre à des passages entre zones extrasynaptiques et intrasynaptiques.

Cependant, les nanoparticules de 5 nm suivies, si petites soient-elles, sont couplées aux protéines au moyen d'un jeu d'anticorps finalement relativement gros. C'est pourquoi nous

avons choisi de ne pas poursuivre l'étude pour justifier de telles hypothèses au-delà de cette démonstration de faisabilité.

III.5 Quelques perspectives

III.5.1 Couplage des billes d'or aux protéines d'intérêt : nouvelles approches

Plusieurs approches sont envisagées pour parvenir à un couplage plus direct entre la nanoparticule et les protéines. La première consisterait à utiliser une toxine, la bungarotoxine. Cette petite protéine, extraite de venin de cobra, reconnaît spécifiquement une séquence peptidique nommée BBS, laquelle peut être insérée par génie génétique dans la séquence codant pour GluR2. On peut alors transfecter des neurones avec GluR2-BBS. Nous avons réalisé des tests utilisant des bungarotoxines marquées avec des fluorophores [Sekine-Aizawa and Huganir, 2004]. Ils ont montré que cette technique était valide, mais les billes d'or couplées à la bungarotoxine commerciales que nous avons testées n'étaient pas fonctionnelles. Il faut donc envisager une autre stratégie de couplage réalisé par nos soins.

Pour ce faire, nous pourrions tirer parti de la collaboration avec l'équipe de David FERNIG, à Liverpool, que nous avons déjà évoquée (cf. II.5.2, page 76). Comme nous l'avons vu, ce groupe a développé une méthode de couplage des nanoparticules d'or avec différentes protéines avec la possibilité de contrôler le nombre de ligands par nanoparticule . Il serait donc envisageable de coupler une bungarotoxine à cette séquence par une méthode similaire et de réaliser ainsi des nanoparticules marquées de manière plus contrôlée.

Un autre approche a été utilisée récemment dans le cadre de cette même collaboration en y associant Grégory GIANNONE, du laboratoire PCS. En utilisant des nanoparticules de 5 nm de diamètre marquées avec un faible ratio de groupements tris-NiNTA [Lata et al., 2005], qui possèdent une forte affinité pour les poly-histidines, il est possible de les lier à des protéines portant une étiquette extracellulaire composée de 6 histidines. De même, un fragment Fab d'anticorps[3] anti-GluR2 portant une étiquette composée de 6 histidines a été préparé et testé sur des échantillons cellulaires avec succès comme en témoigne la figure III.19. De plus, nous avons observé à plusieurs reprises des nanoparticules situées *sous* la cellule avec ce type de marquage. Ceci semble indiquer que les marqueurs utilisés (aussi bien les nanoparticules que les ligands) sont suffisamment petits pour permettre de suivre des protéines entre la cellule et la lamelle. Ceci pourrait être utilisé pour étudier d'autres types de protéines membranaires telles que les protéines d'adhésion.

III.5.2 Mesurer des constantes de diffusion plus élevées

La technique de suivi de nanoparticules d'or SNaPT n'est pas capable en l'état actuel de suivre des objets diffusant avec des taux supérieurs à 0.2 $\mu m^2/s$ typiquement. Cependant, plu-

[3]un fragment Fab d'un anticorps est constitué d'un des « bras » du Y, il n'a qu'un site de reconnaissance

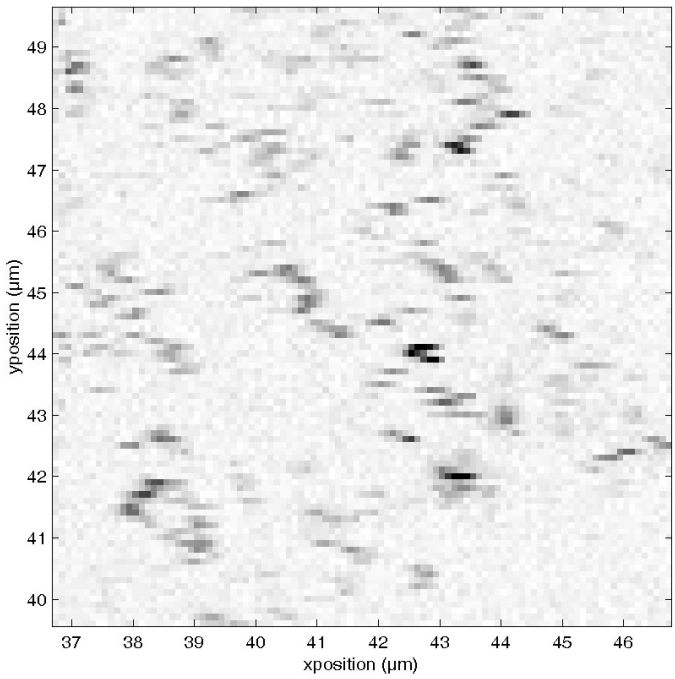

Fig. III.19 : Image LISNA d'une portion de COS transfectée avec GluR2 et marquées avec des nanoparticules d'or couplées à des fragments Fab d'anticorps anti-GluR2 via des groupements tris-NiNTA et histidine.

sieurs possibilités sont envisageables pour améliorer les performances de la méthode SNaPT. Comme nous l'avons vu, la limite de diffusion détectable est étroitement liée à la possibilité ou non pour une nanoparticule de s'échapper du triangle de mesure pendant l'acquisition des trois points (cf. III.2.4, page 88). Deux voies sont donc possibles : la première consiste à utiliser un triangle de mesure plus grand, la deuxième à réduire le temps nécessaire à la mesure des trois points.

Il est possible d'élargir le triangle de mesure en augmentant en parallèle la taille des faisceaux. Ceci a été testé en augmentant des paramètres de 50%. Ceci a permis de repousser de 30% environ la limite de suivi (Fig. III.20). Cependant, en procédant ainsi, on diminue la résolution du système et donc la précision de pointé de 10 à 20 %.

L'autre alternative consisterait à diminuer le temps nécessaire à la mesure du signal aux trois points. Ce temps est constitué pour moitié d'un temps d'acquisition (5 ms par point) qui ne peut être réduit qu'au prix d'une perte de signal à bruit, ce qui n'est généralement pas souhaitable, et pour moitié d'un temps de déplacement et surtout de stabilisation de la platine piézo-électrique. Ce temps pourrait être réduit en utilisant par exemple des miroirs galvanométriques pour faire rapidement les petits déplacements aux trois points de mesure, tout en conservant le piézo-poscanner pour le mouvement d'ensemble et l'imagerie. Ceci nécessiterait essentiellement une modification du montage et de l'interfaçage (afin de piloter les miroirs galvanométriques).

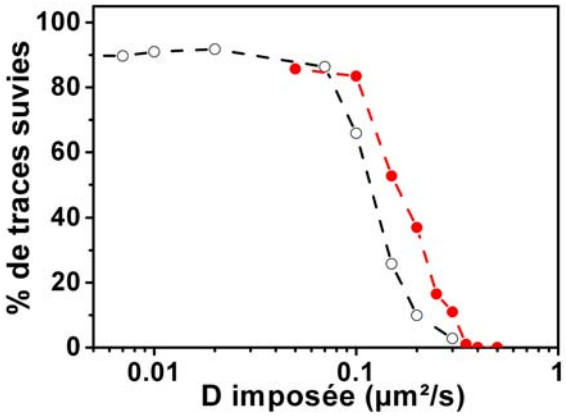

FIG. III.20 : Pourcentage de traces suivies (○) dans les conditions normales et (●) en élargissant les faisceaux et le triangle de mesure.

III.6 Conclusion du Chapitre III

Nous avons vu dans ce Chapitre comment la technique LISNA, permettant de détecter des nanoparticules d'or individuelle, a pu être appliquée au suivi de protéines membranaires, grâce à une méthode de triangulation en temps réel. La technique Single Nanoparticle Photothermal Tracking (SNaPT) combine les avantages du suivi de molécules individuelles, à savoir la petite taille du marqueur (5 nm) et du suivi de particules, à savoir des durées d'observation illimitées. Nous avons montré que testée sur des récepteurs postsynaptiques diffusant sur des membranes de cellules vivantes, elle donnait des résultats identiques, aux temps courts, à ceux obtenus par SMT, et qu'elle pouvait également être utilisée pour suivre des récepteurs du glutamates sur des neurones vivants pendant des temps arbitrairement longs. Nous verrons au Chapitre V une méthode alternative et complémentaire permettant de mesurer la constante de diffusion des objets les plus rapides.

III.7 Appendice au Chapitre III : Introduction à la diffusion membranaire des récepteurs postsynaptiques

III.7.1 Neurones et synapses : vue générale

III.7.1.a Le neurone, unité fonctionnelle du système nerveux

Le neurone est un type de cellule différenciée composant avec les cellules gliales le tissu nerveux. Ce sont les neurones qui constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux, les cellules gliales assurant le soutien et la nutrition des neurones, et jouant comme on l'a découvert très récemment un rôle facilitant l'établissement de nouvelles connexion [Pfrieger, 2002]. Il y a environ neuf fois plus de cellules gliales que de neurones dans le cerveau. On estime que le système nerveux humain comprend environ 10^{11} à 10^{12} neurones. Les neurones permettent la transmission d'un signal que l'on nomme influx nerveux. Le rôle du neurone en tant qu'unité fonctionnelle du système nerveux a été découvert au début du XXème siècle par un anatomiste espagnol, S. Ramón y Cajal. Il avait émis l'hypothèse que les neurones étaient des cellules individuelles, séparées par de fins espaces, et qui communiquaient entre elles via des connexions particulières.

Le corps cellulaire du neurone, appelé encore *péricaryon* ou *soma*, contient le noyau, bloqué en interphase et donc incapable de se diviser, et le cytoplasme. On trouve dans le cytoplasme le réticulum endoplasmique rugueux, les appareils de Golgi, des mitochondries et des neurofilaments qui se regroupent en faisceau pour former des neurofibrilles. De forme très variable, le péricaryon assure la synthèse des constituants nécessaires à la structure et aux fonctions du neurone et ce, pendant toute la vie de l'individu. Le diamètre du corps des neurones varie selon leur type, de 5 à 120 µm.

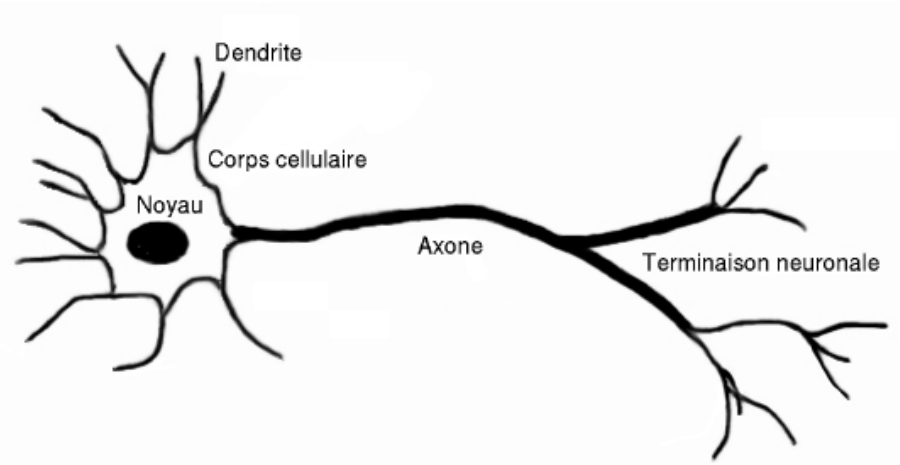

Fig. III.21 : Schéma d'un neurone.

Le neurone présente plusieurs prolongements, qui émergent du corps cellulaire et s'arborisent plus ou moins abondamment. Ces prolongements lui permettent d'établir des contacts

(*synapses*) avec d'autres neurones ou d'autres cellules de l'organisme (cellules sensorielles, cellules musculaires). Ces prolongements sont de deux types : les *dendrites* et l'*axone*, qui se distinguent sur la base de critères morphologiques, métaboliques et fonctionnels.

Les dendrites, lorsqu'elles émergent du soma, sont de simples prolongements du péricaryon (troncs dendritiques). Ces troncs dendritiques se divisent successivement pour donner un arbre dendritique, dont les caractéristiques morphologiques sont propres à chaque population neuronale. Les contours irréguliers des dendrites de certains neurones sont dus à la présence, à leur surface, d'épines dendritiques, expansions latérales reliées aux branches dendritiques par un pédicule plus ou moins long. Les neurones sont ainsi dits « épineux » ou « lisses ».

Les dendrites et le soma reçoivent de très nombreux contacts synaptiques venant d'autres neurones et constituent la principale surface de réception du neurone. Ils intègrent les messages afférents et génèrent, en réponse à ces messages, des signaux électriques (potentiels post-synaptiques, cf. III.7.1.c, page 105).

L'axone (ou fibre nerveuse) a un diamètre compris entre 1 et 15 µm, sa longueur varie d'un millimètre à plus d'un mètre. Le cône d'émergence, région extrêmement riche en microtubules, est le point de départ de l'axone. Il est également appelé cône axonique ou zone gâchette du fait de son rôle premier dans la genèse des potentiels d'action axoniques. Il se prolonge sur un trajet plus ou moins long et se termine en se ramifiant (c'est l'arborisation terminale). Chaque ramification se termine par un renflement, le bouton terminal ou bouton synaptique. Certains axones sont recouverts d'une gaine de myéline, formée par des cellules gliales, les cellules de SCHWANN dans le système nerveux périphérique, et les oligodendrocytes dans le système nerveux central. L'influx nerveux quitte le péricaryon par l'axone : c'est un prolongement *efférent*.

III.7.1.b Influx nerveux et potentiel d'action

Dès la fin du XVIIIème siècle, GALVANI montrait que l'information nerveuse était de nature électrique : il contractait un muscle en appliquant un courant électrique sur son nerf. Au début du XXème siècle, ADRIAN démontrait clairement la nature électrique du message nerveux spontané de même que le fait qu'une contraction musculaire s'accompagne d'une activité électrique. Ainsi, les nerfs et les muscles en activité donnent naissance à des signaux électriques. Ces éléments, capables d'émettre des signaux électriques, sont eux-mêmes excitables : ils répondent par un signal électrique à une stimulation électrique. L'excitabilité est la propriété fondamentale à la base de leur fonctionnement.

Si l'on place l'extrémité d'une microélectrode dans une cellule nerveuse, il est possible, dès l'entrée dans la cellule, d'enregistrer une différence de potentiel par rapport au milieu extérieur d'environ 60 mV. Cette différence de potentiel, appelée potentiel de repos, est variable d'une cellule à l'autre et caractéristique de toutes les cellules vivantes. L'intérieur de la cellule est négatif par rapport à l'extérieur, ce qui s'exprime par un potentiel de repos ou potentiel de membrane égal à −60 mV. Cette différence de potentiel vient d'une part d'une différence de concentration en ions entre l'intérieur et l'extérieur du neurone et d'autre part

d'un courant ionique traversant la membrane du neurone. Ce dernier, appelé courant de fuite, est essentiellement dû aux ions potassium (K^+) qui sortent de la cellule en passant dans des canaux ioniques spécifiques du potassium constamment ouverts.

L'influx nerveux se caractérise par une modification instantanée et localisée de la perméabilité de la membrane du neurone : des ions sodium (Na^+) pénètrent dans la cellule en passant au travers de canaux ioniques sélectivement perméables au sodium. Le potentiel de membrane prend alors une valeur positive (environ +35 mV). Ce phénomène porte le nom de dépolarisation. Puis, très rapidement des ions potassium (K^+) sortent de la cellule en passant au travers d'autres canaux ioniques, perméables au potassium. Le potentiel de membrane reprend alors une valeur négative : on parle de repolarisation. L'ensemble constitué par la dépolarisation suivie de la repolarisation s'appelle le *potentiel d'action*. Il ne dure que quelques millisecondes. Le potentiel d'action, ou influx nerveux, se propage de proche en proche, sans atténuation, le long de l'axone du neurone.

III.7.1.c Transmission synaptique

La synapse désigne une zone de contact fonctionnelle qui s'établit entre deux neurones, ou entre un neurone et un autre type de cellule. Elle assure la conversion d'un potentiel d'action déclenché dans le neurone présynaptique en un signal dans la cellule postsynaptique. On estime, pour certains types cellulaires (par exemple cellule pyramidale, cellule de PURKINJE...), qu'environ 40% de la surface membranaire est couverte de synapses. On distingue habituellement deux types de synapses :

- les synapses électriques, qui sont surtout retrouvées chez les invertébrés et les vertébrés inférieurs, rarement chez les mammifères ;
- les synapses chimiques, très majoritaires, et quasi exclusives chez l'homme.

La synapse chimique est la plus fréquente des synapses du système nerveux. Ce type de synapses transmet le signal nerveux d'un neurone à un autre en utilisant un vecteur chimique, appelée *neurotransmetteur* qui est émis par le neurone afférent, diffuse dans la fente synaptique et se lie aux *récepteurs postsynaptiques* .

Les vésicules synaptiques sont en permanence chargées de neurotransmetteurs. Ceux-ci sont produits par le neurone à partir de précurseurs présents dans le sang (en général des acides aminés). Une grande partie de leur synthèse a lieu dans le péricaryon, ce qui nécessite un transport le long du cytosquelette de l'axone dans des vésicules. Le changement de polarité de membrane provoqué par l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau d'une synapse déclenche l'ouverture de canaux calcium membranaires dépendants du voltage. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui en résulte provoque la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique et la libération des neurotransmetteurs. Ce phénomène s'appelle l'*exocytose*.

Les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique atteignent la membrane postsynaptique par simple diffusion. Avec le délai nécessaire pour provoquer l'exocytose, c'est l'étape qui nécessite le plus de temps dans la transmission synaptique.

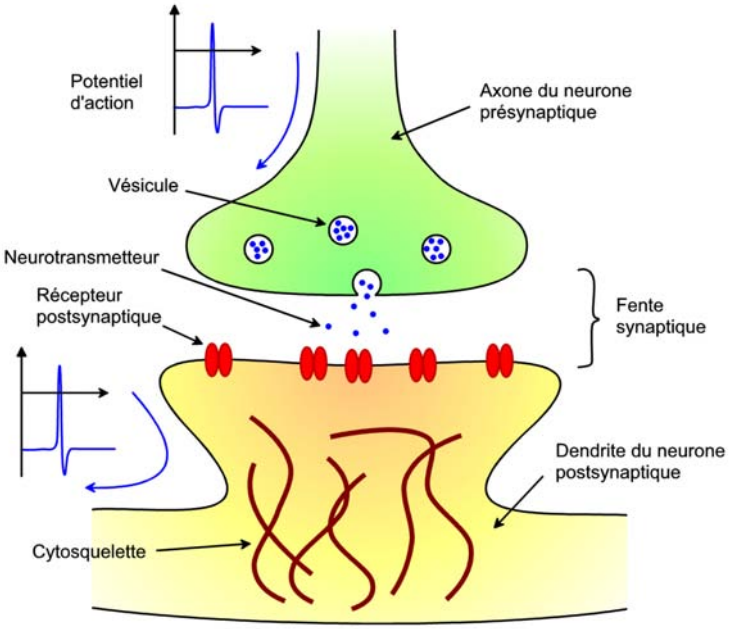

FIG. III.22 : Schéma de fonctionnement d'une synapse (cas d'une synapse excitatrice) : le potentiel d'action (un signal électrique sous forme de dépolarisation de la membrane du neurone) déclenche la libération de neurotransmetteurs. Ceux-ci activent des récepteurs sur le neurone postsynaptique, ce qui provoque (sous certaines conditions) la propagation d'un potentiel d'action.

Les neurotransmetteurs se fixent alors sur des récepteurs de la membrane postsynaptique. Il en existe de deux sortes (cf. III.7.2.c, page 108) :

- les récepteurs *ionotropiques* qui sont des protéines-canal s'ouvrant pour générer un courant ionique, permettant ainsi la dépolarisation du neurone postsynaptique ;
- les récepteurs *métabotropiques* qui en réponse à l'action d'un ligand activent une cascade d'événements intracellulaires. En général, les récepteurs métabotropiques sont couplés à des molécules appelées *protéines G*. L'activation du récepteur entraîne le clivage de la protéine G qui va alors interagir directement avec un canal ionique ou bien déclencher une cascade d'événements intracellulaires impliquant différentes protéines effectrices.

Pour éviter que la stimulation du neurone postsynaptique ne se prolonge, deux systèmes éliminent la molécule de la fente synaptique (en général les deux sont associés) :

- la dégradation, qui met en jeu des enzymes spécifiques qui vont métaboliser le neurotransmetteur, mettant fin à son effet sur le neurone postsynaptique ;
- la recapture, pendant laquelle les neurotransmetteurs ou ses précurseurs issus de la dégradation enzymatique sont récupérés par le neurone présynaptique et les cellules gliales pour être réutilisés ou détruits.

Suivant leur effet, on différencie les synapses excitatrices et les synapses inhibitrices :

- les synapses *excitatrices*, qui sont le siège d'un Potentiel Postsynaptique Excitateur

(ou PPSE) qui diminue la différence de potentiel entre les deux côtés de la membrane plasmique. Autrement dit le PPSE dépolarise localement la membrane.
- les synapses *inhibitrices*, qui sont le siège d'un Potentiel Postsynaptique Inhibiteur (ou PPSI) qui augmente la différence de potentiel.

Si la membrane dépasse le seuil critique de dépolarisation, un potentiel d'action est initié. Les PPSI empêchent le déclenchement d'un potentiel d'action alors que les PPSE le favorisent. En général, un neurone est couvert de synapses excitatrices et de synapses inhibitrices. Il se produit alors une sommation à la fois temporelle et spatiale des entrées synaptiques, appelée *intégration* pour « décider » du déclenchement ou non d'un potentiel d'action.

III.7.2 Biochimie de la synapse

III.7.2.a La membrane plasmique neuronale

La membrane plasmique est constituée d'une bicouche lipidique, dans laquelle sont incluses des protéines. C'est le modèle de la « mosaïque fluide » [Singer and Nicolson, 1972]. Les lipides de la membrane appartiennent à 3 classes principales : les phospholipides, le cholestérol et les glycolipides. Tous ces lipides possèdent une tête polaire hydrophile et une queue, peu chargée, hydrophobe. Les phospholipides les plus représentés sont les phosphoglycérides. Placés en milieu aqueux, ils s'orientent spontanément, les têtes hydrophiles se mettant en contact de l'eau et les queues se rassemblant entre elles afin d'exclure l'eau. Dans la membrane, ils forment ainsi deux films monomoléculaires, accolés et parallèles, appelés bicouche lipidique, d'une épaisseur de l'ordre de 4 nm. Les molécules de cholestérol s'intercalent dans la membrane parallèlement aux phospholipides. Le cholestérol joue un rôle dans la fluidité de la membrane : sa molécule contient, en effet, une partie plane et rigide (noyaux stéroïdes) qui assure la stabilité mécanique de la membrane.

Les protéines transmembranaires traversent complètement la bicouche lipidique. Leurs régions hydrophobes (acides aminés apolaires) s'organisent dans la bicouche (hélices transmembranaires) tandis que les régions hydrophiles (acides aminés polaires) se placent au contact des milieux aqueux intra et extracellulaire. Les protéines périphériques sont présentes d'un seul côté de la membrane et ne traversent pas la bicouche lipidique. Elles sont soit « collées » soit « ancrées » à la membrane. Les protéines collées interagissent avec les régions polaires des protéines transmembranaires par des interactions ioniques. Les protéines ancrées dans la membrane renferment dans leur structure une chaîne lipidique d'attache, liée par une liaison covalente avec un acide aminé. Elles sont ancrées du côté cytoplasmique ou du côté extracellulaire.

Le caractère fluide de la membrane plasmique se manifeste par le fait que la plupart des protéines membranaires diffusent sur cette surface. S'il n'est induit par aucun moteur moléculaire, mais uniquement par l'agitation thermique, ce mouvement n'est pas systématiquement un mouvement brownien. En effet, de nombreuses interactions avec d'autres constituants de la membrane, mais aussi avec le cytosquelette, peuvent perturber le mouvement des protéines

membranaires, conduisant à des régimes de diffusion généralement plus complexes.

III.7.2.b Neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs sont divisés en différentes catégories :

- les monoamines, qui sont synthétisées à partir d'un acide aminé (dopamine, adrénaline, sérotonine...)
- les acides aminés (acide glutamique ou glutamate, acide aspartique, GABA, glycine)
- les neuropeptides (vasopressine, somastatine, insuline, glucagon, calcitonine, neurotensine...)
- substances chimiques diverses : acétylcholine, ATP...

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur le plus courant, le GABA et la glycine sont des neurotransmetteurs inhibiteurs bien connus. Dans toute la suite, nous nous limiterons pour l'essentiel au cas des synapses glutamatergiques qui sont l'objet principal d'étude du groupe de Daniel CHOQUET.

III.7.2.c Récepteurs du glutamate

Les récepteurs ionotropiques au glutamate sont subdivisés sur la base de leur affinité pour différents agents pharmacologiques (agonistes, c'est-à-dire des molécules qui viennent activer les récepteurs, et antagonistes, qui bloquent ou diminuent l'effet d'un agoniste), en deux groupes principaux : les récepteurs NMDA (activables sélectivement par le *N-méthyl-D-aspartate*) et les récepteurs de type non-NMDA (insensibles au NMDA). Les récepteurs non-NMDA sont subdivisés en deux sous-groupes, les récepteurs AMPA (activés sélectivement par l'*acide α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique*) et les récepteurs Kaïnate (qui présentent une plus grande affinité pour l'acide kaïnique). Il existe également une famille de récepteurs métabotropiques.

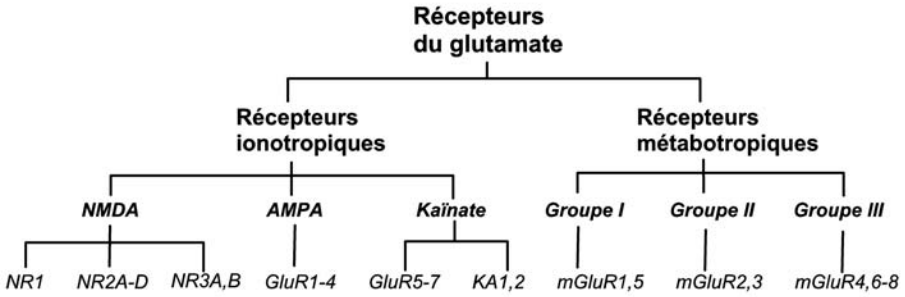

FIG. III.23 : Récepteurs du glutamates et sous-unités.

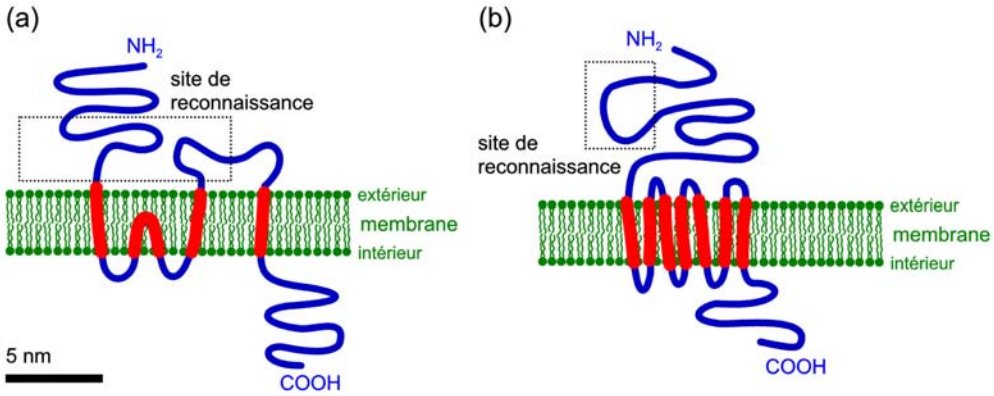

Fig. III.24 : Structures schématiques des sous-unités des récepteurs ionotropiques (a) et des récepteurs métabotropiques (b) du glutamate.

Récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA (NMDARs, pour *N-methyl-D-aspartate Receptors*) sont des récepteurs ionotropiques activés par le NMDA, un agoniste spécifique sélectif du glutamate. Ils sont formés de l'association de sous-unités NR1, NR2(A à D) et NR3(A ou B). Ces sous-unités forment une structure tétramérique, où la sous-unité NR1 se combine à NR2A-D ou à NR3A-B.

Les récepteurs NMDA sont des canaux ioniques non spécifiques qui permettent le passage d'ions Na^+ K^+, et dans une moindre mesure d'ions Ca^{2+}[Curtis et al., 1959]. En fait, les récepteurs NMDA ne peuvent être activés qu'en présence de la glycine qui est alors coagoniste avec le glutamate. La glycine se lie à un site présent sur NR1 et le glutamate à un site localisé sur une sous unité NR2. Le pore des récepteurs NMDA s'ouvre donc lorsque ceux-ci sont activés par le glutamate et la glycine, et que la membrane est dépolarisée, de sorte que l'ion Mg^{2+} s'échappe du canal [Cull-Candy et al., 2001]. Les récepteurs NMDA ont donc une fonction de détecteur de coïncidences entre une excitation présynaptique et une excitation post-synaptique, ce qui leur donne la capacité de déclencher des processus de plasticité (cf. III.7.3, page 111).

Récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA (AMPARs, pour *α-Amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-pro- pionate Receptors*) sont des récepteurs ionotropiques activés par l'AMPA, un autre agoniste spécifique du glutamate. Les récepteurs AMPA proviennent de quatre gènes différents, qui forment les sous unités GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4 ; ils forment des tétramères contenant des proportions variables de chaque sous unité, le plus souvent des homo-tétramères de GluR1 ou GluR4, ou des « dimères de dimères » symétriques de GluR2/3 avec GluR1 ou GluR4 [Rosenmund et al., 1998].

Les propriétés du canal changent en fonction des sous-unités qui le composent. En effet, il existe des récepteurs résultant de l'assemblage des sous-unités GluR1, GluR3 et GluR4 entre elles, ce qui confère aux récepteurs AMPA une perméabilité aux ions Na^+, K^+ et Ca^{2+}. La présence de la sous-unité GluR2 rend au contraire le canal imperméable au Ca^{2+} [Burnashev et al., 1995]. Notons enfin que la densité des récepteurs AMPA à une synapse définit sa force synaptique ; ce récepteur est donc aussi impliqué dans la plasticité synaptique.

Récepteurs Kaïnate

Les récepteurs kaïnate résultent de l'assemblage de cinq types de sous-unités, nommées GluR5-7 et KA1-2. Les récepteurs kaïnate peuvent former des complexes homomériques fonctionnels à partir des sous-unités GluR5 et GluR6. Ils sont principalement perméables aux ions Na^+ et K^+. Néanmoins les récepteurs homomériques composés de GluR6 sont aussi perméables au Ca^{2+} [Dingledine et al., 1999].

Les récepteurs kaïnate ont la particularité d'être localisés aussi bien au niveau postsynaptique [Castillo et al., 1997], que présynaptique [Represa et al., 1987]. L'activation des récepteurs présynaptiques inhibe la libération des neurotransmetteurs tels que le glutamate ou le GABA.

Récepteurs mGluR

Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) sont des protéines transmembranaires avec sept segments hydrophobes. Les mGluRs sont classés en trois groupes en fonction de leur homologie de séquence, de leur pharmacologie et de la voie de transduction à laquelle ils sont couplés. Le groupe I comprend les récepteurs mGluR1 et mGluR5 ; le groupe II inclut les récepteurs mGluR2 et mGluR3 et le groupe III les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8.

Il est intéressant de noter que les mGluR sont localisés au niveau périsynaptique sur les neurones, mais également à la surface des cellules gliales. Bien que leur rôle reste encore en partie mal défini, les mGluRs sont connus pour moduler l'excitabilité neuronale [Coutinho and Knopfel, 2002]. En effet, leur activation inhibe la transmission synaptique excitatrice et/ou inhibitrice, en bloquant les canaux calciques présynaptiques responsables de la libération de neurotransmetteur [Nakanishi, 1994]. Au niveau postsynaptique, l'activation des mGluRs régule un certain nombre de canaux cationiques (par exemple la fermeture de canaux potassiques ou l'ouverture de canaux cationiques non-spécifiques) et ont donc un effet excitateur [Charpak et al., 1990].

III.7.2.d La densité postsynaptique

L'élément postsynaptique de la synapse glutamatergique se caractérise par une région dense aux électrons (donc clairement identifiable en microscopie électronique), la densité postsynaptique (*postsynaptic density*, PSD). Ce sous-domaine, ayant la forme d'un disque

de 200 nm de diamètre et 40 nm d'épaisseur, correspond à la concentration de protéines d'échafaudages (interagissant avec les récepteurs), de protéines d'adhésion (permettant le « contact » entre les deux neurones, comme le couple neuroligine-neurexine ou les cadhérines), de molécules du cytosquelette (actine) et d'intermédiaires métaboliques des voies de transduction (Fig. III.25). Pour les récepteurs du glutamate qui se trouvent dans la membrane postsynaptique, de multiples interactions protéiques peuvent réunir plusieurs partenaires formant ainsi des complexes. Ces complexes permettent le couplage métabolique et l'ancrage des récepteurs au niveau de la synapse.

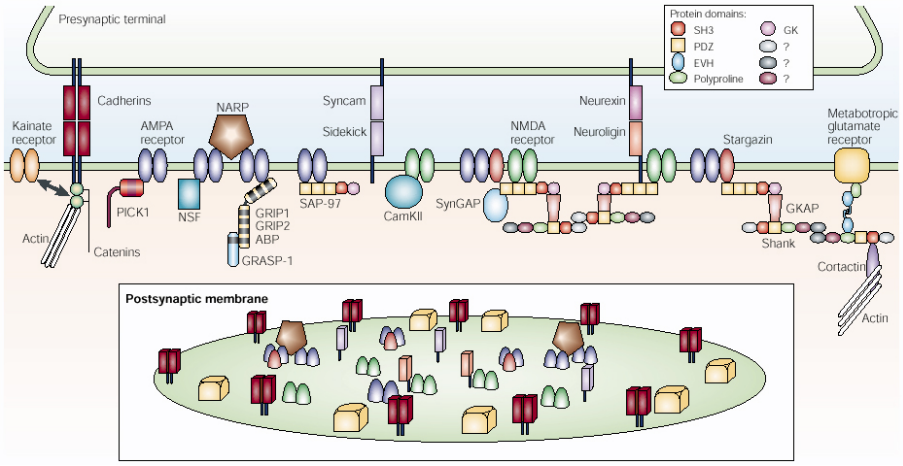

Fig. III.25 : Une vue simplifiée (!) de la zone post-synaptique de la synapse glutamatergique [Choquet and Triller, 2003].

III.7.3 Mémoire et plasticité synaptique

La plasticité synaptique est la faculté pour une connexion entre deux neurones, c'est-à-dire une synapse, à modifier son efficacité. Avant de décrire certains changements physiologiques pouvant entraîner une telle modification, nous allons voir que cette capacité joue un rôle fondamental dans le fonctionnement du système nerveux, et en particulier dans le phénomène de mémoire.

III.7.3.a Réseaux de neurones : de la biologie aux mathématiques

Le fonctionnement du système nerveux central, et en particulier du cerveau, reste aujourd'hui encore très mal compris. Différentes approches sont généralement exploitées pour tenter de l'appréhender, mais aussi d'en restituer toutes les capacités en créant des dispositifs doués d'*Intelligence Artificielle*.

Les réseaux de neurones formels sont à l'origine une tentative de modélisation mathématique du cerveau humain. Les premiers travaux datent de 1943 et sont l'oeuvre de Mac Culloch et Pitts [McCulloch and Pitts, 1943]. Ils présentent un modèle assez simple pour les neu-

rones et explorent les possibilités de ce modèle. L'idée principale des réseaux de neurones « modernes » est la suivante : on se donne une unité simple, un neurone, qui est capable de réaliser quelques calculs élémentaires, à partir de plusieurs entrées (les « dendrites »), vers une sortie (l' « axone »). On relie ensuite entre elles un nombre important de ces unités et on essaye de déterminer la puissance de calcul du réseau ainsi obtenu. Le réseau neuronal humain est constitué d'environ 10^{12} neurones, comportant chacun de l'ordre de 10 000 synapses, ce qui tend à expliquer sa formidable puissance de calcul.

On joue sur l'efficacité des connections entre les neurones pour modifier le résultat obtenu en sortie. Le *perceptron* inventé par F. ROSENBLATT [Rosenblatt, 1958] est le premier modèle de neurone artificiel. Son principe est le suivant : il fait la somme des N entrées binaires e_i pondérées par des coefficients w_i puis la compare à un seuil α, pour donner une sortie S égale 0 ou 1 selon que la somme dépasse ou non le seuil (ce qui n'est pas sans rappeler le phénomène d'*intégration*, cf. III.7.1.c, page 105) :

$$S = \begin{cases} 1 & \text{si } \sum_{i=1}^{N} w_i e_i > \alpha, \\ 0 & \text{sinon.} \end{cases} \tag{III.6}$$

On peut ensuite créer des algorithmes permettant de simuler son apprentissage. Schématiquement, on initialise les poids du perceptron à des valeurs quelconques. On lui présente alors une série d'exemples, c'est-à-dire de combinaisons d'entrée et on regarde la sortie. A chaque fois que l'on présente un nouvel exemple, on modifie les poids w_i (d'une manière bien définie) si le perceptron n'a pas correctement répondu. L'algorithme s'arrête lorsque tous les exemples ont été présentés sans modification d'aucun poids. Bien sûr, un certain nombre de subtilités n'ont pas été envisagées ici : l'algorithme converge-t-il toujours ? Que se passe-t-il si, après l'apprentissage, on présente au système un cas encore jamais envisagé ? Toutes ces questions font l'objet de travaux en mathématiques et en algorithmique.

Toujours est-il que l'on peut montrer qu'un système relativement simple, constitué d'un ensemble de « neurones » connectés entre eux, peut sous certaines conditions effectuer des calculs complexes et « apprendre » en modifiant l'efficacité des connections entre ses éléments constitutifs. On citera par exemple les travaux du physicien américain J. J. HOPFIELD [Hopfield, 1982] qui a imaginé un réseau de neurones artificiels fonctionnant sur un principe proche de celui du perceptron.

III.7.3.b Le phénomène de mémoire : la contribution de HEBB

L'une des contributions les plus importantes de HEBB [Hebb, 1949] à la neuropsychologie est l'idée que deux neurones activés ensemble renforcent leur connexion de sorte que l'activation en sera plus facile à l'avenir :

> When an axon of cell A is near enough to excite B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is

increased.

C'est la synapse de Hebb, le mécanisme de base de l'apprentissage hebbien. Cette idée donne un support concret crédible aux phénomènes d'apprentissage et a ouvert la voie à de nombreuses recherches empiriques en neuropsychologie et en intelligence artificielle. En réalité, le fonctionnement du système nerveux est bien plus complexe et Hebb, qui considérait ses théories comme un simple moyen de progresser dans notre compréhension de l'esprit humain, en avait pleinement conscience. Néanmoins, plus de vingt ans après, des chercheurs en neurosciences ont mis en évidence le phénomène de potentialisation à long terme (cf. III.7.3.c, page 113), un équivalent biologique de la synapse de Hebb qui joue un grand rôle dans les théories neurobiologiques de la mémoire.

Une autre idée importante de Hebb est une sorte de généralisation des mécanismes d'association entre neurones. Par stimulation conjointe répétée, un groupe de neurones pourrait former une « assemblée de cellules » qui resterait activée après la présentation d'un stimulus et formerait ainsi une représentation mentale de ce stimulus. La pensée devient alors l'activation en séquence de ces assemblées de neurones. Cette théorie permet de rendre compte de la nature distribuée du fonctionnement nerveux qui fait que les capacités cognitives peuvent être étonnamment bien conservées en cas de lésion cérébrale.

III.7.3.c Plasticité synaptique et potentialisation à long terme

La transmission synaptique n'est pas un phénomène linéaire, la réponse de l'élément postsynaptique à l'excitation de la terminaison présynaptique est variable et répond à des processus *adaptatifs*. L'ensemble de ces modifications constitue la plasticité, c'est-à-dire la capacité d'une synapse à adapter son activité en fonction des stimulations qu'elle reçoit et de l'environnement synaptique. On pense aujourd'hui que la mémoire est « stockée » dans les synapses du cerveau et que la plasticité synaptique est le fondement neurochimique essentiel de l'apprentissage et de la mémoire (cf. III.7.3.b).

La plasticité de la synapse glutamatergique peut être caractérisée selon deux principaux critères, la direction des modulations, *potentialisation* ou *dépression*, et sa durabilité, court terme ou long terme. La potentialisation à long terme (LTP : *Long Term Potentialisation*) est une augmentation de la force chimique d'une synapse pendant plus d'une heure. Découverte par T. Lømo et T. Bliss [Bliss and Lomo, 1973] à la suite de recherche sur des lapins anesthésiés pour comprendre le rôle de l'hyppocampe dans la mémoire à court terme, on l'a observée sur des neurones en culture et chez les animaux vivants : expérimentalement, une série de courtes stimulations électriques à haute fréquence sur une synapse peut renforcer cette synapse pendant des minutes voire des heures. Dans le cas de cellules vivantes, la LTP se produit naturellement et peut durer des heures voire des jours, des mois, et même des années. Les neurones reliés par une synapse qui a subi une LTP ont une tendance à être en activité simultanément, c'est-à-dire que les stimulus suivants appliqués à la cellule présynaptique ont plus de chance de déclencher des potentiels d'action dans la cellule postsynaptique. Bien que

ses mécanismes biologiques ne soient pas encore entièrement déterminés, la LTP est censée contribuer à la plasticité synaptique chez les animaux vivants, fournissant la base pour un système nerveux fortement adaptable. Il existe bien évidemment d'autres phénomènes du même type, comme la LTD (*Long Term Depression*), qui se caractérise par le phénomène inverse, à savoir une diminution de l'efficacité synaptique. Elle peut être obtenue par des stimulations basse fréquence.

La plasticité synaptique repose sur un large répertoire de modifications moléculaires conduisant toutes à une modification de la réponse synaptique. Ces modifications peuvent intervenir au niveau de la terminaison présynaptique et ainsi modifier la probabilité de libération du neurotransmetteur, la quantité de neurotransmetteur libéré ou encore la demi-vie du neurotransmetteur dans la fente synaptique [Liu, 2003]. Au niveau postsynaptique, les récepteurs des neurotransmetteurs sont la principale cible des modifications plastiques, leur nombre, leur couplage ou encore leur propriétés biophysiques déterminent l'efficacité de la transmission synaptique [McGee and Bredt, 2003]. Le nombre de synapses actives est aussi un facteur déterminant dans la plasticité synaptique à l'échelle du neurone [Harris, 1999].

Enfin, et c'est le point qui nous intéresse en particulier, la diffusion des récepteurs au neurotransmetteur dans la membrane postsynaptique est un élément important qui pourrait conditionner l'efficacité de la transmission synaptique [Choquet and Triller, 2003].

III.7.3.d Transport, endocytose et exocytose des récepteurs postsynaptiques

Les protéines membranaires sont généralement produites dans le soma, au niveau du réticulum endoplasmique, et maturées au niveau de l'appareil de GOLGI. Elles sont ensuite véhiculées dans des vésicules par des moteurs moléculaires comme les kinésines le lond des microtubules présents à l'intérieur des dendrites et des axones jusqu'à leur destination où elles sont libérées par fusion des vésicules avec la membrane (exocytose).

Si les changements de concentration en récepteurs AMPA jouent un rôle important dans la plasticité synaptique, les mécanismes à l'origine de ces variations ne sont pas encore complètement élucidés. Le mécanisme de circulation des récepteurs le plus couramment cité est constitué de quatre étapes [Carroll et al., 2001] :

1. Arrivée des récepteurs à la membrane (exocytose)
2. Stabilisation des récepteurs dans la densité postsynaptique via des interactions avec des protéines dites d'échafaudage
3. Internalisation (endocytose) des récepteurs dans des vésicules (endosomes)
4. Recyclage ou dégradation des récepteurs dans des lysosomes

Un modèle simple suggérerait que la LTP est liée à une augmentation de l'exocytose et la LTD à une augmentation de l'endocytose des récepteurs. Cependant, plusieurs résultats récents montrent que la diffusion des récepteurs sur la membrane plasmique joue un rôle important dans la circulation des récepteurs AMPA, comme nous l'avons vu au tout début de ce Chapitre.

Chapitre IV

Imagerie de mitochondries par la méthode photothermique

Au cours des expériences que nous avons réalisées en milieu cellulaire, décrites au Chapitre III, nous avons observé un signal intrinsèque provenant des cellules. Présent au voisinage du noyau dans les cellules COS-7, il se situe à une position bien précise dans l'épaisseur de la cellule et est très structuré, généralement sous forme de filaments (Fig. IV.1). Ce signal est également présent sous forme de points ou de formes allongées dans certains neurites. C'est cette forme caractéristique qui nous a amenés à penser que ces structures correspondaient aux mitochondries.

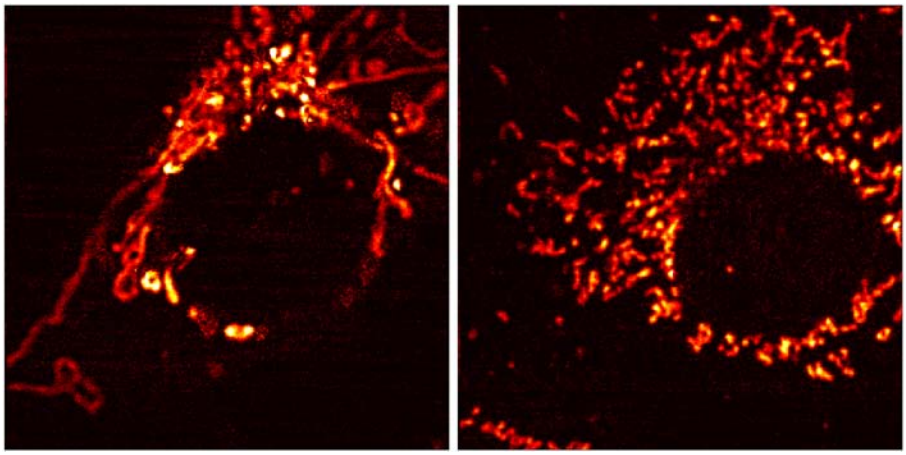

Fig. IV.1 : Deux images de portions de cellules COS-7 (40×40 µm chacune) prises en LISNA.

Compte tenu du rôle fondamental des mitochondries dans le fonctionnement cellulaire, que nous allons présenter brièvement, une méthode d'imagerie précise et ne nécessitant aucun marquage pourrait s'avérer très utile dans de nombreuses applications. C'est pourquoi nous avons cherché à prouver que ce signal était spécifique aux mitochondries, puis à le caractériser

afin de mieux comprendre son origine.

IV.1 Détection spécifique des mitochondries

IV.1.1 Description et rôle des mitochondries

IV.1.1.a Structure

Les mitochondries sont des organelles intra-cellulaires d'une taille de 1 à 10 µm de long et de 0.5 à 1 µm de diamètre, observées dès le XIXe siècle. Le mot mitochondrie dérive du grec *mitos*, « filament », et *chondros*, « graine », en raison de l'aspect de cet organite au microscope optique (et électronique). Par exemple dans certaines cellules (comme les COS-7) les mitochondries sont filamenteuses, alors que dans d'autres, elles sont granulaires. Les mitochondries ne sont pas des organites statiques : elles se divisent ou au contraire fusionnent couramment, ce qui explique leur polymorphisme au sein d'une même cellule [Collins, 2002].

Elles se composent de deux bicouches phospholipidiques, une externe et une interne, qui délimitent trois milieux : le milieu extra-mitochondrial (cytoplasme de la cellule), l'espace intermembranaire et la matrice (FIG. IV.2).

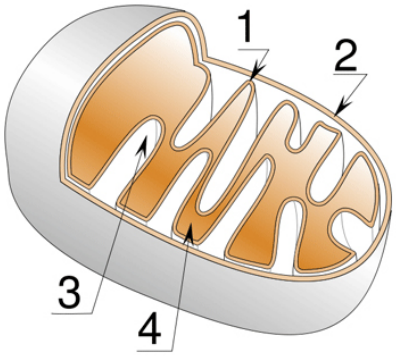

FIG. IV.2 : Schéma descriptif de la structure mitochondriale : (1) membrane interne (2) membrane externe (3) espace inter-membranaire (4) matrice.

Les mitochondries sont particulièrement connues pour leur rôle dans la production d'ATP. Mais elles jouent également un rôle important dans beaucoup de fonctions cellulaires, comme la prolifération, la synthèse des hèmes (molécules contenant un atome de fer et jouant un rôle essentiel dans le stockage et le transport de l'oxygène) ou la régulation de l'état rédox des cellules. De plus, elles ont aussi une fonction de concentration et de stockage des ions calcium, sodium et potassium.

IV.1.1.b La mitochondrie, « poumon » de la cellule

Le rôle physiologique de la mitochondrie est primordial puisqu'elle est considérée comme le « poumon » de la cellule. C'est en effet là que se déroulent les deux dernières étapes du

cycle respiratoire (*aérobie*, i.e. en présence d'oxygène) qui convertit l'énergie des molécules organiques issues de la digestion (glucose) en énergie directement utilisable par la cellule (Adénosine triphosphate, ATP). En cas d'absence d'oxygène, la cellule utilise la fermentation dans le cytoplasme pour produire l'énergie nécessaire à son fonctionnement, mais c'est un système beaucoup moins efficace, qui dégrade de façon incomplète le substrat. L'ATP ainsi produite pourra être dégradée sous forme d'ADP ; c'est cette dégradation qui libère l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule.

La respiration cellulaire aérobie se fait selon trois étapes :

1. la glycolyse, dégradation du glucose en pyruvate, qui se déroule dans le cytoplasme cellulaire ;
2. le cycle de Krebs [Krebs and Johnson, 1937], par lequel le pyruvate est dégradé en CO_2 et en H_2O ; l'énergie libérée est stockée sous forme d'ATP, de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduite) et de $FADH_2$ (FAD réduite) ;
3. la chaîne de transport des électrons : les molécules de $FADH_2$ et de NADH réagissent et cèdent leurs électrons (oxydation) à d'autres molécules.

Au cours de cette troisième étape, la succession de réactions d'oxydoréduction à travers les quatre complexes de protéines (Fig. IV.3) génère un flux de proton de la matrice vers l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. Il en découle un potentiel de membrane $\Delta\Psi_m$ de l'ordre de -180 mV et un différentiel de pH ΔpH_m de l'ordre de 1 entre le cytosol et la matrice [Duchen et al., 2003]. C'est ce gradient de protons qui sert de force motrice à l'ATP synthase, le moteur moléculaire qui produit l'ATP, aujourd'hui bien connu [Stock et al., 1999].

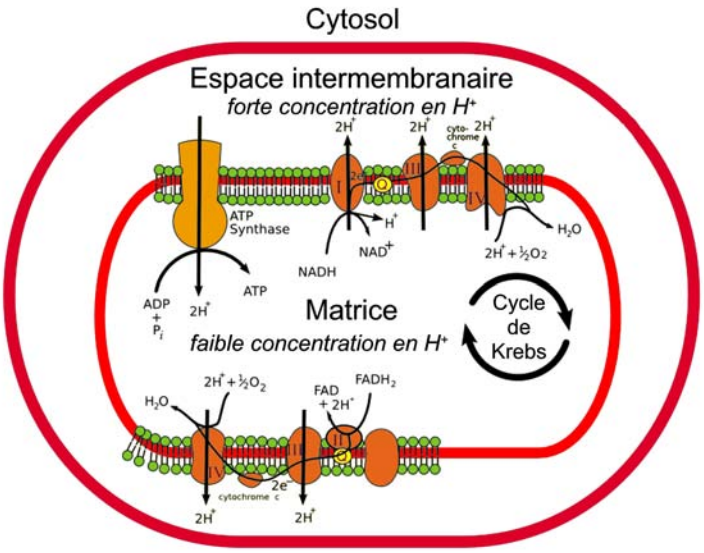

Fig. IV.3 : Chaîne respiratoire et synthèse de l'ATP dans une mitochondrie.

IV.1.1.c Mitochondries et apoptose

Les mitochondries jouent enfin un rôle essentiel dans l'*apoptose*, la mort cellulaire programmée [Zamzami et al., 1996]. Il s'agit du processus par lequels des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation : les membranes plasmiques ne sont pas détruites, et la cellule émet des signaux qui permettront sa phagocytose par les globules blancs.

Les mécanismes de l'apoptose sont encore mal connus et font l'objet de nombreuses recherches, notamment parce que les cellules cancéreuses sont généralement des cellules dans lesquels ce mécanisme ne fonctionne plus. Elles survivent et se multiplient en dépit d'anomalies génétiques survenues au cours de la vie de la cellule, alors que normalement elles auraient dû être détruites par apoptose.

L'apoptose présente plusieurs phases. La première est celle de décision où la cellule décide ou reçoit un ordre de mort cellulaire. Cet événement est étroitement contrôlé par de nombreuses voies de signalisation, intracellulaires ou extracellulaires. Les signaux extracellulaires peuvent être des hormones, des facteurs de croissance, etc... et doivent traverser la membrane plasmique ou se fixer à des récepteurs, appelés *récepteurs de mort*, pour induire une réponse. Ces signaux peuvent tendre à provoquer ou à inhiber l'apoptose. La signalisation apoptotique intracellulaire est une réponse lancée par la cellule elle-même en réaction à un stress, et qui peut avoir comme conséquence le suicide de la cellule. La chaleur, le rayonnement, une infection virale et le manque de nourriture ou d'oxygène font partie des facteurs qui peuvent mener à l'émission de signaux apoptotiques intracellulaires par une cellule endommagée. Par exemple, la protéine p53 contrôle l'état de l'ADN de la cellule et peut, si celui-ci est endommagé, induire l'apoptose [Lowe et al., 1993].

La deuxième phase correspond à une phase d'exécution où la cellule dégrade son matériel génétique et ses protéines. Parmi les nombreuses voies apoptotiques possibles, beaucoup convergent vers un point de non-retour qui a lieu au niveau de la mitochondrie, qui joue à la fois le rôle d'intégrateur et d'exécuteur de l'apoptose [Kroemer, 1998] ; à partir d'un certain point, cette décision est irréversible. La membrane externe de cette organite devient alors perméable et le potentiel de membrane $\Delta\Psi_m$ s'écroule [Zamzami, 1995]. Des pores s'ouvrent et libèrent dans le cytoplasme cellulaire des composés normalement situés entre les deux couches membranaires [Martinou and Green, 2001]. En particulier, le cytochrome c est relargué [Liu et al., 1996] et active les caspases, des enzymes capables de cliver d'autres protéines. Cette étape s'accompagne généralement d'un changement de morphologie des mitochondries [Gao et al., 2001].

La troisième phase de l'apoptose correspond à l'élimination de la cellule via la phagocytose par des leucocytes (globules blancs). Cette élimination est primordiale car elle permet de ne laisser aucune trace dans le tissu où survient l'apoptose, en particulier, elle prévient toute

nécrose secondaire qui aurait pour conséquence la libération aléatoire du contenu cellulaire : elle permet ainsi de limiter l'établissement d'une réaction inflammatoire.

IV.1.1.d Méthodes usuelles de visualisation des mitochondries

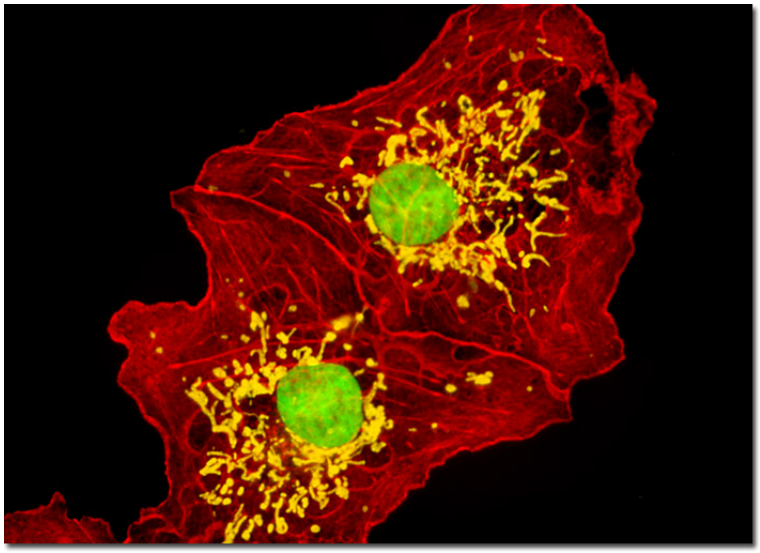

Fig. IV.4 : Cellules COS-7 en culture marquées avec Alexa Fluor 546 (couplé à la toxine phalloïdine) pour les filaments d'actine du cytosquelette (rouge), avec MitoTracker Deep Red 633 pour les mitochondries (jaune) et SYTOX Green pour le noyau (vert). Source : `http ://www.microscopyu.com/galleries/fluorescence/cells/cos7/`.

Il est difficile de distinguer les mitochondries en lumière blanche, même au moyen d'un dispositif de contraste de phase ou de DIC [Stephens and Allan, 2003]. L'utilisation de marqueurs fluorescents est donc particulièrement répandue [Jakobs, 2006] et ce d'autant plus que certaines molécules fluorescentes permettent de sonder l'activité mitochondriale [Foster et al., 2006]. Ainsi, l'affinité du MitoTracker Red (Chloromethyl-X-Rosamine) pour les mitochondries, de nature essentiellement électrostatique, diminue lors de la dépolarisation de la membrane, laquelle est généralement associée à l'apoptose [Macho et al., 1996, Krohn et al., 1999].

Cependant, ces marqueurs fluorescents peuvent interférer avec l'activité cellulaire. Il a par exemple été montré que la Rhodamine6G ou le MitoTracker Orange pouvaient perturber la respiration cellulaire [Scorrano et al., 1999, Gledhill and Walker, 2005] et que le Mitotracker Red pouvait même induire l'apoptose [Minamikawa et al., 1999a]. De plus, la spécificité et l'efficacité du marquage au moyen de ces fluorophores peuvent éventuellement varier en fonction des conditions expérimentales [Buckman et al., 2001]. C'est pourquoi une méthode d'imagerie sans marquage pourrait se révéler très utile.

IV.1.2 Comparaison entre épifluorescence (MitoTracker) et LISNA

Nous avons tout d'abord voulu montrer que le signal LISNA intrinsèque aux cellules provenait spécifiquement des mitochondries. Pour cela, nous avons comparé ce signal à la fluorescence issue d'un marqueur spécifique des mitochondries, le MitoTracker Deep Red.

Nous avons réalisé cette expérience sur des cellules COS-7 et des neurones. Les conditions de cultures et de préparation des échantillons sont les mêmes que celles décrites précédemment (cf. respectivement III.3.1, page 90 et III.4.2, page 98). Seul le marquage est différent. Il consiste dans les deux cas en une incubation pendant 1 minute à température ambiante avec du MitoTracker Deep Red 633 (Molecular Probes) à 3 µM. Après trois rinçages dans du milieu de culture, les lamelles sont montées sur le microscope.

Celui-ci est utilisé pour réaliser des images LISNA dans les mêmes conditions que précédemment, à savoir une excitation de 200 kW/cm^2 à 532 nm et 5 ms d'intégration par point. De plus, il a été légèrement modifié afin de réaliser un montage de microscopie de fluorescence confocal. Le laser HeNe sert alors pour l'excitation du Mitotracker Deep Red 633. Il est focalisé au niveau de l'échantillon avec une puissance de 100 W/cm^2. La fluorescence est collectée vers l'arrière via un filtre (HQ 700/100) et focalisée sur un diaphragme de 100 µm de diamètre, puis focalisée à nouveau sur une photodiode à avalanche (cf. I.2.2, page 20). Dans ces conditions, l'échantillon est balayé avec un temps d'intégration d'1 ms par point.

Les figures IV.5 et IV.6 montrent des images de cellules COS-7 et de neurones prises successivement en fluorescence puis en LISNA. Les structures repérables en fluorescence et en imagerie photothermique sont très similaires. On distingue parfaitement la forme caractéristique des mitochondries, en particulier dans les COS-7.

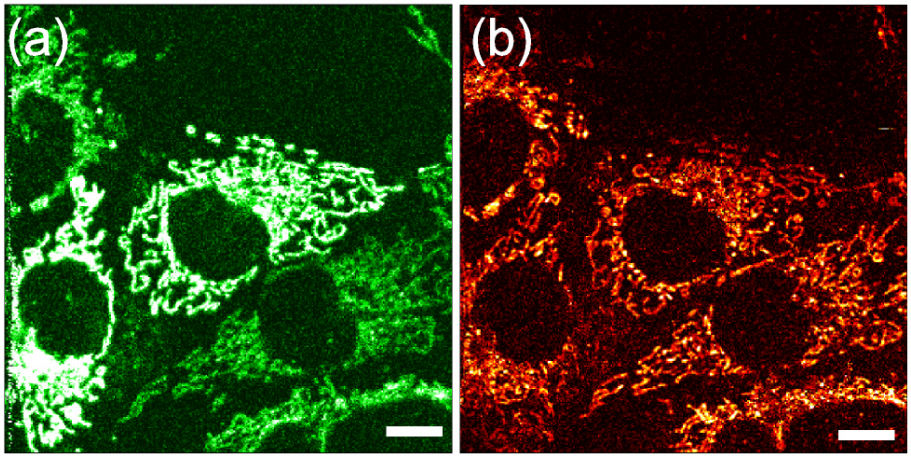

FIG. IV.5 : Images de cellules COS-7 en fluorescence avec MitoTracker Deep Red 633 (a) et en LISNA (b). Les barres représentent 10 µm.

Outre la colocalisation générale, on remarque cependant quelques légères différences. Tout d'abord, on sait que les mitochondries peuvent être mobiles dans les cellules vivantes [Ligon and Steward, 2000], ce qui fait que les structures changent légèrement : dans les COS-

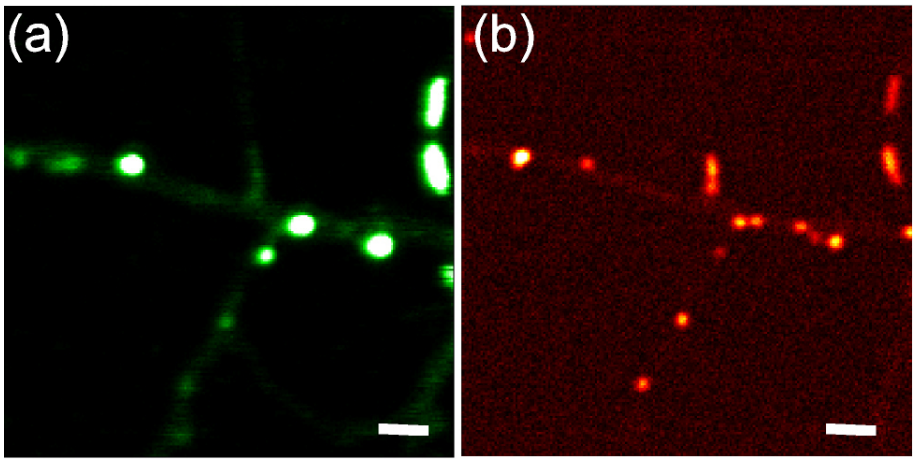

Fig. IV.6 : Images de neurones en fluorescence avec MitoTracker Deep Red 633 (a) et en LISNA (b). Les barres représentent 2 µm.

7, on retrouve parfois une même mitochondrie ayant visiblement changé de forme. Dans le cas de l'image de neurones, le grossissement étant plus important, cette mobilité est plus visible. De plus, on remarque que les structures en LISNA sont plus nettes et plus fines, ce qui peut s'expliquer par une meilleure sélection spatiale du dispositif LISNA, dont la résolution a été discutée précédemment (cf. II.3.3.c, page 53), par rapport au dispositif de fluorescence réalisé ici. De plus, il semble que le marquage des mitochondries ne soit pas homogène, ce qui donne des structures très brillantes et d'autres difficilement visibles avec une même échelle de couleurs. Ceci peut s'expliquer par les propriétés du Mitotracker discutées plus haut (cf. IV.1.1.d).

Malgré ces légères variations, l'origine mitochondriale du signal LISNA observé dans les cellules semble claire. Ce signal est par ailleurs relativement stable. Il tend cependant à décroître sur des temps caractéristiques de quelques dizaines de secondes si l'on se focalise continuellement au même point (mais pour l'imagerie, on ne reste que quelques millisecondes par point). Nous avons donc cherché à mieux comprendre l'origine de signal : à quoi est-il sensible ? Quelle molécule ou ensemble de molécules en est responsable ?

IV.2 Recherches sur l'origine du signal

Le signal LISNA obtenu au niveau des mitochondries n'est pas le fait de molécules individuelles, comme pour la détection de nanoparticules d'or. Il s'agit plus vraisemblablement de molécules absorbantes présentes en grand nombre dans l'ensemble du volume de détection.

Ayant montré que ce signal était spécifique aux mitochondries, nous avons essayé de déterminer plus précisément quel type de molécule était à l'origine du signal. Pour ce faire, nous avons collaboré avec le groupe de Francesca De Giorgi et François Ichas, de l'Institut Bergonié de Recherche sur le Cancer, qui s'intéressent au rôle des mitochondries dans le

phénomène d'apoptose (cf. IV.1.1.c, page 118), et ses implications dans le développement ou la thérapie du cancer. Nous avons ainsi réalisé une série d'expériences pouvant révéler la source du signal.

IV.2.1 Dépendance spectrale du signal

La première expérience a consisté à étudier la dépendance du signal provenant des mitochondries avec la longueur d'onde d'excitation. En effet, de nombreuses protéines présentes dans les mitochondries, telles que les cytochromes, ont été isolées et étudiées, et leur réponse optique est bien connue [Agalidis et al., 1999]. La plupart ont des bandes d'absorption très nettes dans le visible qui peuvent d'ailleurs varier selon les conditions expérimentales [Sick and Perez-Pinzon, 1999]. Nous avons donc remplacé le laser Nd :Yag par un laser Argon pour l'excitation. Ce dernier peut en effet être utilisé sur différentes lignes : 458 nm, 488 nm et 514 nm. Dans les trois cas, l'intensité au niveau de foyer de l'objectif est ajustée à une valeur constante pour effectuer des images successives de cultures cellulaires (COS-7). Seule une diminution d'un facteur deux entre le signal à 458 nm et aux autres longueurs d'onde a été observée (FIG. IV.7). D'autres expériences réalisées en utilisant un laser à 560 nm ont donné des résultats similaires, à savoir une faible sensibilité du signal LISNA des mitochondries en fonction de la longueur d'onde.

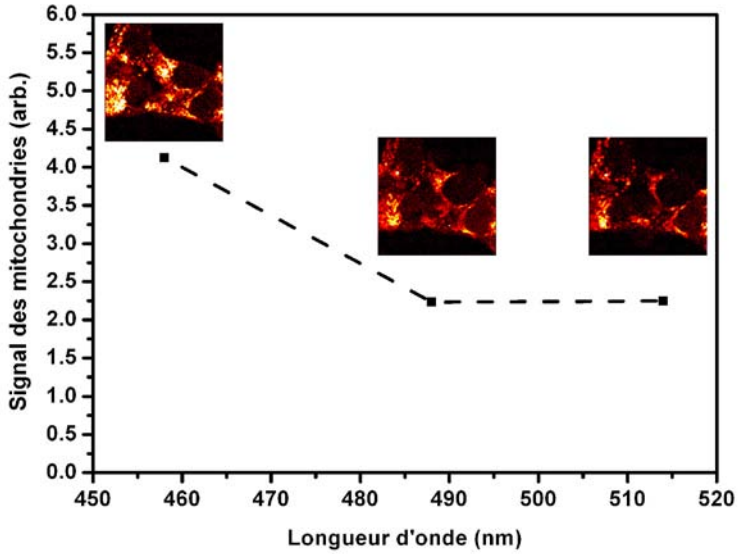

FIG. IV.7 : Comparaison du signal (intégré) à 458nm, 488nm et 514 nm. Inserts : exemples d'images correspondantes.

IV.2.2 Réponse à une dépolarisation de la membrane induite par application de Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)

Le Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) est un ionophore, plus exactement un protonophore : il permet le passage des ions H^+ à travers les deux membranes des mitochondries. Il induit évidemment de fortes perturbations sur le fonctionnement de celles-ci et en particulier sur la chaîne respiratoire [Heytler, 1963, Goldsby and Heytler, 1963, Cavari and Avi-Dor, 1967]. En effet, il impose $\Delta\Psi_m = 0$ et annule également la différence de pH entre l'intérieur et l'extérieur de la mitochondrie. Ceci provoque une augmentation de la respiration afin d'essayer de rétablir le gradient de protons, ainsi que l'inversion du fonctionnement de l'ATP synthase (qui consomme alors de l'ATP pour rétablir le gradient de protons). Tout ceci se traduit entre autres par un changement de morphologie des mitochondries [Gao et al., 2001]. Dans le cas de l'utilisation du CCCP, cette dépolarisation n'est pas fatale ; elle est même réversible [Minamikawa et al., 1999b].

Nous avons donc testé l'effet du CCCP sur le signal LISNA provenant des mitochondries afin de déterminer le rôle de $\Delta\Psi_m$: le signal LISNA dépend-il de $\Delta\Psi_m$?

Pour ce faire, nous avons imagé des cellules COS-7. Les conditions de cultures et de préparation des échantillons sont les mêmes que celles décrites précédemment (cf. III.3.1, page 90). Après une image, le milieu de culture est enlevé et remplacé par du milieu contenant 1 µM de CCCP. Les résultats sont présentés sur la figure IV.8.

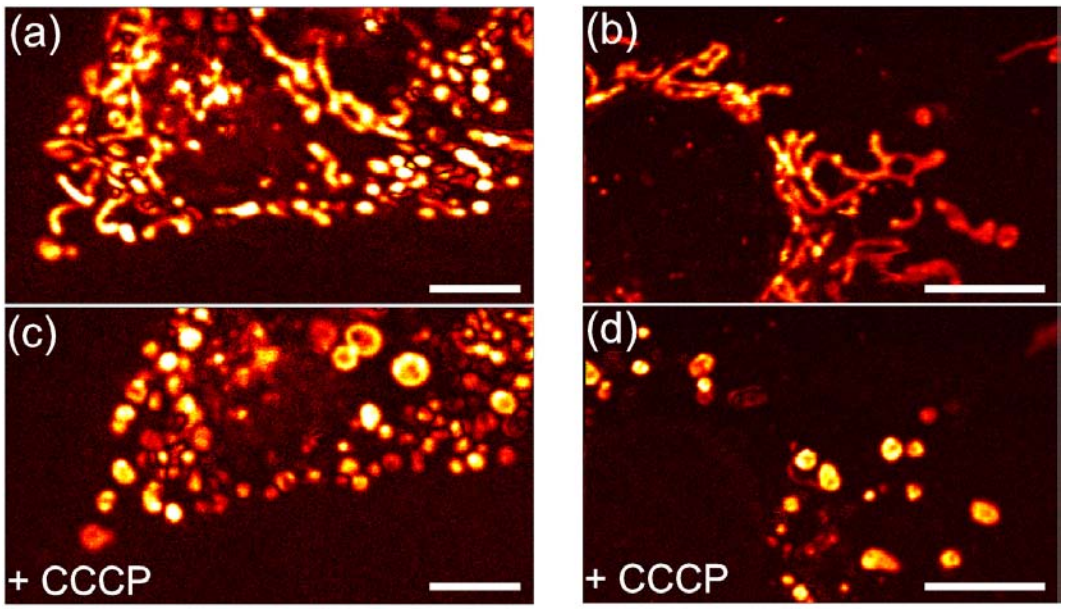

Fig. IV.8 : Images de portions de cellules COS-7 avant (a,b) et après (c,d) application de CCCP à 1 µM (la barre représente 10 µm). L'action du CCCP est immédiate.

Tout d'abord, le signal ne varie pas en termes d'amplitude. Ceci signifie que le signal LISNA des mitochondries ne dépend pas du potentiel membranaire $\Delta\Psi_m$. Par contre, on

distingue très clairement et instantanément le gonflement des mitochondries, ainsi qu'il a déjà été observé dans la littérature [Gao et al., 2001]. Rappelons cependant que dans notre cas, aucun marquage n'a été employé pour réaliser de telles images.

IV.2.3 Réponse à une perméabilisation de la membrane externe par application de digitonine

La digitonine provoque une lyse des cellules par la formation de précipités de complexes digitonine-cholestérol qui rendent plus perméables les membranes cellulaires. C'est un détergent qui solubilise également les protéines membranaires.

Au niveau des mitochondries, on s'attend à ce qu'elle perméabilise la membrane externe [Hoppel and Cooper, 1968, Vercesi et al., 1991], ce qui se traduit par un changement de morphologie des mitochondries. A très forte concentration, elle peut atteindre également la membrane interne et perturber le fonctionnement de la chaîne respiratoire [Clarkson et al., 1989].

Nous avons donc testé l'effet de la digitonine sur le signal LISNA provenant des mitochondries afin de déterminer s'il était d'origine membranaire, intermembranaire ou matricielle.

Pour ce faire, nous avons imagé des cellules COS-7 préparées comme précédemment (cf. III.3.1, page 90). Après une image, le milieu de culture est enlevé et remplacé par du milieu *intracellulaire* contenant 100 µM de digitonine. Il est en effet important de tenir compte du fait que les membranes externes de la cellules vont être affectées : du milieu de culture standard ne convient donc pas, il provoquerait un choc osmotique.

Les résultats sont présentés sur la figure IV.9. La digitonine provoque une rapide diminution du signal des mitochondries, en quelques minutes. On note également un gonflement très net des mitochondries qui prennent une forme caractéristique en anneau. Ceci semble indiquer que le signal provient vraisemblablement d'un composé intermembranaire ou lié à la membrane externe des mitochondries.

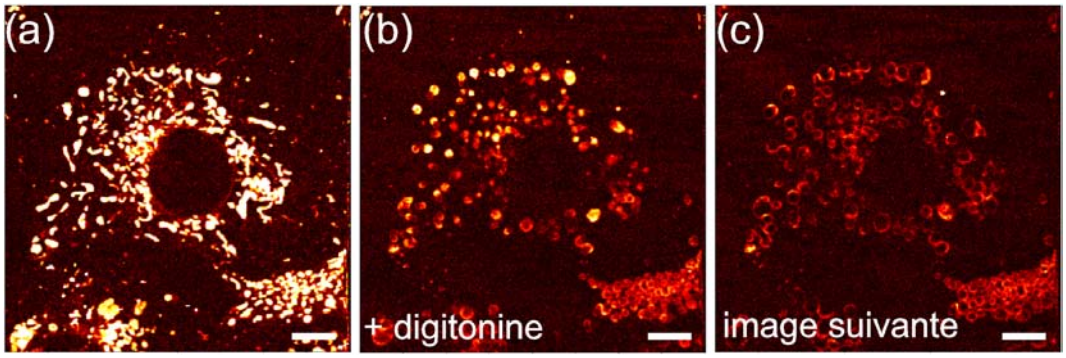

FIG. IV.9 : Image de cellules COS-7 avant (a) et après (b,c) application de digitonine à 100 µM (la barre représente 10 µm). L'action de la digitonine est quasi-immédiate (l'acquisition d'une image dure environ 5 minutes).

Nous avons par ailleurs vérifié que ce protocole ne provoquait pas une perméabilisation

de la membrane interne des mitochondries en utilisant des cellules HeLa[1] transfectées avec mtGFP [Rizzuto et al., 1995]. Il s'agit d'une GFP fusionnée avec la préséquence N-terminale de la sous unité VIII de la cytochrome c oxidase qui correspond au complexe IV (en haut à droite sur la figure IV.3). Ceci lui confère une localisation dans la matrice mitochondriale. Après traitement à la digitonine (100µM), l'évolution de la distribution du signal de fluorescence est suivi pendant plusieurs minutes (Fig. IV.10). On constate à nouveau un gonflement des mitochondries, qui prennent une forme circulaire, mais le signal reste localisé : la protéine fluorescente n'est pas relarguée, ce qui signifie que l'intégrité de la membrane interne des mitochondries a été conservée.

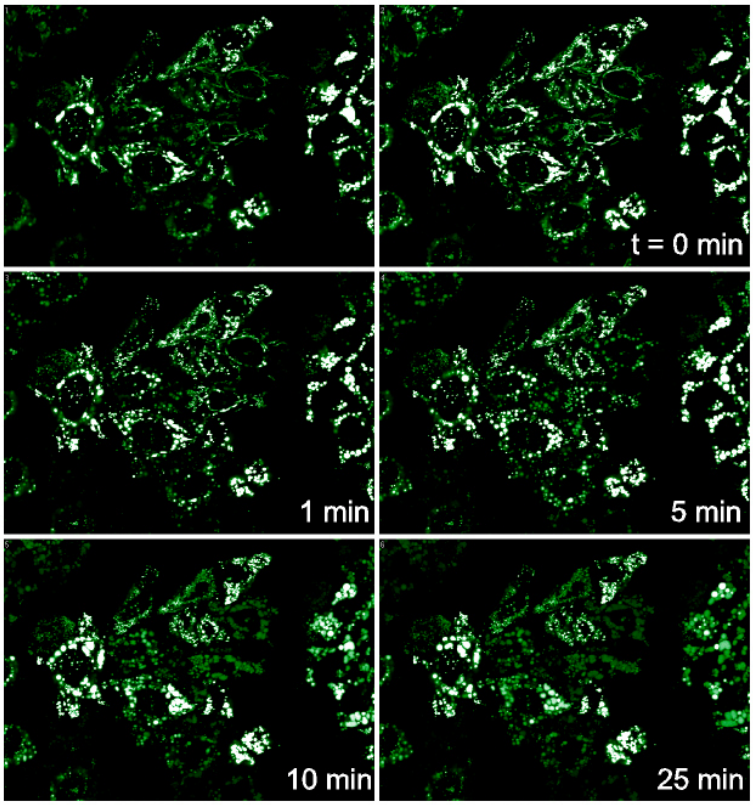

Fig. IV.10 : Image de cellules HeLa marquées au moyen d'une protéine matricielle-GFP avant puis à différents instants après application de digitonine à 100 µM.

IV.2.4 Influence de différents protocoles de fixation cellulaire

Nous avons étudié l'influence de trois protocoles de fixation des cellules COS-7 sur le signal provenant des mitochondries : fixation au paraformaldéhyde, au méthanol et à l'acétone.

[1]Il s'agit d'une lignée cellulaire cancéreuse également largement utilisée en recherche médicale. Ces cellules proviennent d'un prélèvement effectué sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus et décédée en 1951, **He**nrietta **La**cks.

Fixation au paraformaldéhyde

Les cellules sont retirées du milieu de culture et rincées à deux reprises dans du PBS avant d'être incubées pendant 15 minutes dans du paraformaldéhyde à 3% (dans du PBS), à température ambiante. Elles sont ensuite à nouveau rincées trois fois dans du PBS avant d'être montées entre lame et lamelle avec une goutte de Mowiol (un poly-vynyl-alcool).

Fixation au méthanol ou à l'acétone

Le méthanol est maintenu -18°C avant utilisation. Les cellules sont retirées du milieu de culture et rincées à deux reprises dans du PBS. Elles sont ensuite incubées pendant 10 minutes dans du méthanol froid, sur de la glace. Elles sont ensuite rincées trois fois dans du PBS avant d'être observées (toujours dans du PBS). Le protocole est exactement le même pour la fixation à l'acétone.

Aucun des trois protocoles n'a fait disparaître le signal LISNA provenant des mitochondries. Seule une diminution de 30 à 50% a pu être noté pour les fixations à l'acétone et au méthanol dans certains cas. Cependant, dans ces expériences, il n'est pas possible d'effectuer des images avant et après traitement sur les mêmes cellules, et que le signal est relativement variable d'une cellule à l'autre, ce qui rend difficile l'évaluation de cette diminution.

Les protocoles de fixation au méthanol et à l'acétone étant connus pour éliminer la plupart (80 à 90%) des phospholipides [DiDonato and Brasaemle, 2003], nous en avons conclu que ceux-ci n'étaient pas à l'origine du signal observé. De plus, le fait que le signal demeure *post mortem* prouve qu'il n'est pas lié au fonctionnement de la cellule (il n'est notamment pas ATP-dépendant). Ceci confirme les résultats obtenus par exemple lors de l'application de CCCP. C'est un signal d'origine purement structurale.

IV.2.5 Un candidat potentiel : le cytochrome c

Parmi les nombreuses protéines intermembranaires, le cytochrome c est connu pour son rôle dans la chaîne respiratoire et dans le phénomène d'apoptose. Cette petite protéine hème (qui contient un atome de fer) présente également des propriétés optiques caractéristiques. En particulier, elle présente plusieurs bandes d'absorption relativement importantes dans le spectre visible, dont une vers 530 nm et une vers 550 nm [Agalidis et al., 1999]. Nous avons donc vu dans cette molécule une source potentielle de signal LISNA. De plus, certains auteurs ont attribué à cette molécule le signal détecté dans des expériences de lentille thermique sur des cellules [Tamaki et al., 2002].

Afin de valider ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience dans laquelle l'apoptose de cellules est provoquée artificiellement tandis que le cytochrome c est marqué en immunofluorescence. L'apoptose est induite sur des cellules HeLa au moyen de staurosporine [Bertrand et al., 1994] à 1 µM. Lors de l'apoptose, nous avons vu que le cytochrome c est relargué dans le cytosol. L'expérience est réalisée en présence de zVAD (50 µM),

un inhibiteur de caspases. Ce dernier a pour but de conserver la morphologie des cellules après le relargage du cytochrome c qui active normalement les caspases.

Après quelques heures (6 à 8) nécessaires au déclenchement de l'apoptose dans un nombre raisonnable de cellules (ce processus est variable d'une cellule à l'autre), l'échantillon est fixé comme précédemment au formaldéhyde (10 minutes à 4%), les cellules sont perméabilisées lors d'une incubation de 5 minutes dans une solution de triton à 0.5%. Après une incubation de 30 minutes en gélatine 0.2% - PBS 1X afin de saturer les sites aspécifiques, les lamelles sont mises en contact avec les anticorps primaires spécifiques du cytochrome c (Anti-cytochrome c mouse mAb, 1/200 ; BDbiosciences) pendant 12 à 15 heures à 4°C. Puis les lamelles, rincées une fois 5 minutes en gélatine 0.2% - PBS 1X et trois fois 5 minutes en PBS 1X sont incubées avec un anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente (Alexa Fluor 488 goat anti souris IgG, Molecular Probes) pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de lumière. Après un dernier rinçage, les lamelles sont montées à l'envers sur des lames de microscope dans du glycérol à 90%. Nous avons ensuite réalisé des images en fluorescence confocale (en utilisant un laser Argon à 488 nm focalisa sur l'échantillon, la fluorescence étant collectée sur une photodiode à avalanche à travers un filtre HQ 525/50) ainsi que des images en LISNA superposables, sur différentes zones de l'échantillon.

Les images de fluorescence montrent clairement deux types de cellules (Fig. IV.11(a,c,e)). Certaines présentent un signal très structuré qui correspond au cytochrome c encore concentré dans les mitochondries : ces cellules ne sont pas encore entrées en phase d'apoptose. D'autres au contraire présentent un signal très diffus correspondant au cytochrome c relargué.

Les images obtenues en LISNA par contre montrent systématiquement un signal relativement structuré, y compris dans les cellules où le cytochrome c a été relargué (même si l'on remarque qu'il est légèrement moins intense dans certains cas, Fig. IV.11(b,d,f)). Ces résultats montrent que le cytochrome c n'est pas la principale source sur signal photothermique, contrairement à ce qui est généralement admis dans la littérature [Tamaki et al., 2002]. S'il participe au signal, il n'est certainement que l'une des sources. De plus, le cytochrome c n'est pas la seule protéine relarguée lors de cette phase de l'apoptose : c'est donc tout un ensemble de protéines qui semble exclu au vu de ces résultats.

IV.3 Conclusion du Chapitre IV

Nous avons vu dans ce Chapitre que la technique LISNA pouvait être utilisée pour détecter sans marquage les mitochondries sur des cellules (COS-7, HeLa, neurones) vivantes ou fixées. Nous avons exploré plusieurs pistes afin de déterminer plus précisément l'origine de ce signal. Nous avons montré que les phospholipides ne constituaient pas une source de signal, que si la digitonine permettaient de réduire le signal, elle ne perméabilisait pas la membrane interne, ce qui montre que les protéines matricielles sont vraisemblablement hors de cause. Enfin, lors de l'apoptose déclenchée par la staurosporine, le relargage du cytochrome c n'a que peu d'influence sur la localisation mitochondriale du signal LISNA. Nous sommes donc amenés à

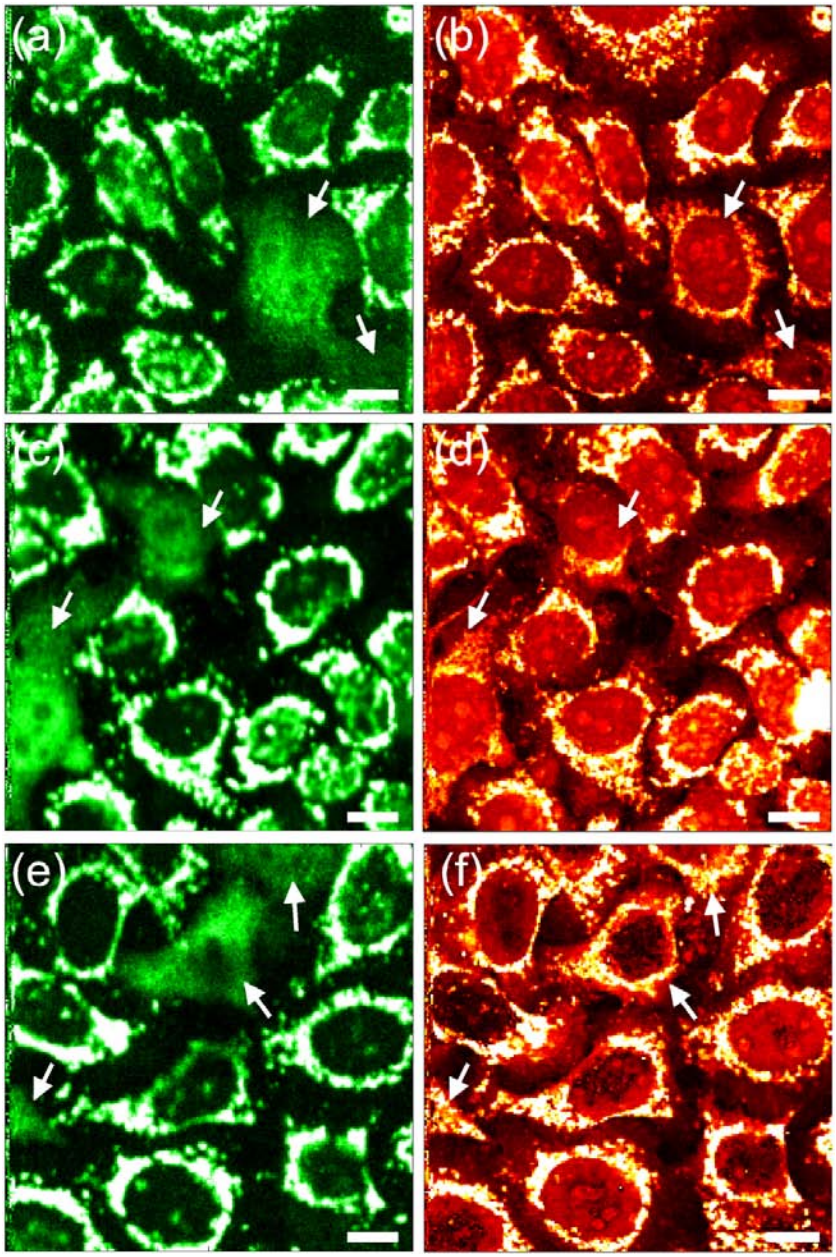

FIG. IV.11 : Image de cellules HeLa fixées après induction de l'apoptose par traitement à la staurosporine (la barre représente 10 µm). Le cytochrome c, marqué en fluorescence (a,c,e), est encore localisé dans les mitochondries pour la plupart des cellules, mais parfois diffus dans le cytosol dans le cas des cellules pour lesquelles l'apoptose s'est enclenchée. Le signal LISNA (b,d,f) reste quand à lui très structuré au niveau des mitochondries.

penser que ce signal est en réalité dû, de manière peu spécifique, à un ensemble de protéines présents au voisinage des membranes mitochondriales.

Cette étude a également permis de mieux caractériser cette source de fond présente dans les cellules afin de pouvoir la distinguer aisément des nanoparticules d'or utilisées pour les

suivis de protéines membranaires (en termes de localisation, d'intensité, de stabilité et de morphologie). Afin de limiter ce signal dans ce cas, il serait intéressant d'étudier plus largement la dépendance spectrale de ce signal. Il serait par exemple intéressant d'utiliser une excitation dans le proche infrarouge : si le signal des nanoparticules d'or décroît fortement, celui des mitochondries pourrait décroître plus rapidement, et il serait alors possible d'utiliser de forte intensités laser.

Compte tenu de sa très bonne résolution (de type confocal, plus précisément liée au recouvrement des deux faisceaux utilisés), cette technique permet par contre de localiser les mitochondries et d'observer les changements de morphologie de ces dernières lors de traitement pharmacologiques tels que l'application de CCCP. Il serait intéressant d'étendre cette étude au cas de tissus cellulaires épais. En effet, plusieurs maladies telles que certaines myopathies sont d'origine mitochondriale et se caractérisent parfois par une morphologie ou une concentration anormale des mitochondries. Une technique de diagnostic ne nécessitant pas de marquage pourrait donc s'avérer utile à plus long terme.

Chapitre V

Spectroscopie de Corrélation d'Absorption

Nous avons vu au Chapitre III que la méthode SNaPT permettait de suivre des nanoparticules d'or de 5 nm et d'en déduire les caractéristiques de leur diffusion propre ou de celle des protéines membranaires auxquelles elles sont couplées, et ce jusqu'à des constantes de diffusion de l'ordre de 0.2 $\mu m^2/s$.

Afin d'obtenir des informations sur des objets plus rapides, nous avons développé une méthode alternative que nous allons décrire dans ce Chapitre. Toujours basée sur la détection LISNA, elle s'appuie sur l'étude des fluctuations de signal photothermique lorsque des objets absorbants, tels que des nanoparticules d'or, traversent le volume de détection. Cette technique, que nous avons appelée Spectroscopie de Corrélation d'Absorption (ACS, pour *Absorption Correlation Spectroscopy*), est l'analogue de la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS, pour *Fluorescence Correlation Spectroscopy*), dans laquelle on analyse les fluctuations de signal de fluorescence issues d'un volume de détection confocal.

V.1 Principe et théorie de la Spectroscopie de Corrélation d'Absorption

V.1.1 Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS)

La FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscpy*) a été inventée au début des années 70 [Elson and Magde, 1974, Magde et al., 1972, Magde et al., 1974]. Elle repose sur l'analyse des fluctuations de signal de fluorescence en provenance d'un volume de détection bien défini lorsque les fluorophores (libres ou couplés à des protéines) diffusent au travers de ce volume de détection.

Cette technique a été tout d'abord utilisée pour étudier la diffusion de molécules et des cinétiques de réaction ou d'agrégation [Schwille et al., 1996]. Depuis les années 90, cette méthode a été largement utilisée pour des applications en biologie pour observer des dynamiques

moléculaires sur des cellules vivantes [Bacia et al., 2006, Schwille et al., 1999] [Schwille and Haustein, 2004]. A titre d'exemples, la FCS a permis d'observer des lois de diffusion anormales dans le mouvement de lipides et de protéines membranaires dues à la structure en microdomaines de la membrane cellulaire [Wawrezinieck et al., 2005], ou bien la dynamique et l'agrégation de complexes de protéines durant les différentes phases de la mitose [Wang et al., 2006]. De nombreuses alternatives ont été développées, comme l'utilisation de deux couleurs de fluorophores : des mesures de corrélations croisées permettent alors de quantifier des dynamiques moléculaires [Li et al., 2004].

L'ACS, que nous allons décrire dans la suite est tout à fait analogue à la FCS, mais en étant basée sur l'absorption des nanoparticules d'or. La théorie de la FCS, largement décrite dans la littérature, va donc servir de base pour décrire celle de l'ACS.

V.1.2 Volume de détection

Le volume de détection de la technique LISNA est de type confocal. Il peut être représenté par un ellipsoïde de révolution avec un profil d'intensité gaussien à 3D :

$$W(\mathbf{r}) = W_0 \exp\left\{ -\frac{2\left((x-x_0)^2 + (y-y_0)^2\right)}{w_{xy}^2} - \frac{2\,(z-z_0)^2}{w_z^2} \right\} \tag{V.1}$$

Il correspond au profil de signal mesuré pour des nanoparticules immobiles, lequel a été mesuré en imageant en 3D des nanoparticules piégées dans un gel d'agarose (cf. II.3.3.c, page 53). On en a déduit la résolution transverse $w_{xy} = 310 \pm 3$ nm, et le rapport d'aspect $\zeta = w_z/w_{xy} = 8.4 \pm 1.0$.

V.1.3 Fluctuations de signal et fonction d'autocorrélation

Lorsque l'on observe une solution contenant des nanoparticules en solution avec le microscope LISNA, on détecte des fluctuations très nettes de signal dues au passage de nanoparticules diffusant librement dans la solution et traversant le volume de détection.

On peut analyser ces données en déterminant le temps caractéristique de ces fluctuations. Pour ce faire, on utilise la *fonction d'autocorrélation* du signal qui mesure les similitudes entre le signal S à un instant donné et ce même signal décalé dans le temps d'un délai τ :

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta S(t) \delta S(t+\tau) \rangle}{\langle S(t) \rangle^2} = \frac{\langle S(t) S(t+\tau) \rangle}{\langle S(t) \rangle^2} - 1 \tag{V.2}$$

où $\langle\ \rangle$ correspond à la moyenne temporelle sur l'ensemble de l'acquisition :

$$\langle S(t) \rangle = \lim_{T \to \infty} \frac{1}{T} \int_0^T S(t) dt \tag{V.3}$$

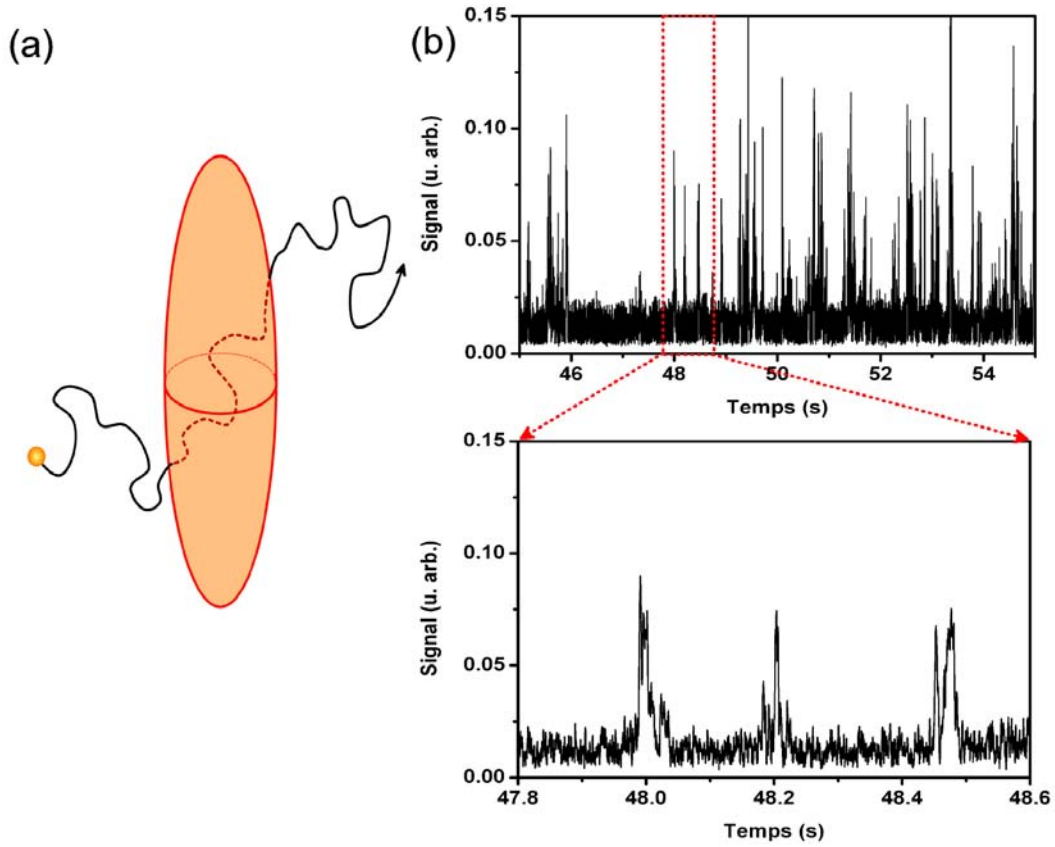

Fig. V.1 : (a) Schéma de principe de l'ACS : le passage d'une nanoparticule provoque un pic de signal dont la durée est caractéristique du mouvement de la nanoparticule . (b) Exemple de traces temporelles obtenues (nanoparticules de 10 nm dans glycérol à 80%). Les événements individuels sont clairement identifiables.

et $\delta S(t)$ aux fluctuations de signal par rapport à la moyenne :

$$\delta S(t) = S(t) - \langle S(t) \rangle \tag{V.4}$$

Aux temps courts, cette fonction tend vers une valeur non nulle pour $\tau \to 0$. Reste alors un facteur $\left\langle \delta S(t)^2 \right\rangle / \langle S(t) \rangle^2$ auquel on peut donner une interprétation physique dans certains cas, comme nous le verrons dans la suite. Lorsque τ augmente et atteint le temps caractéristique du système, elle décroît rapidement : à ces échelles de temps, le signal commence à perdre sa corrélation. Aux temps longs, elle tend théoriquement vers 0 [1]. La figure V.2 donne un exemple de courbe expérimentale obtenue après soustraction du bruit et normalisation de l'amplitude à 1.

[1]En pratique, du fait de la durée finie de l'acquisition, elle vaut strictement 0 pour τ plus grand que la durée d'acquisition, mais peut présenter un palier aux temps longs qui n'est qu'un artefact lié au bruit. En effet, si le bruit de fond n'est pas de moyenne nulle, il existe une corrélation dans le signal à toutes les échelles de temps, du moins pendant la durée de l'acquisition. On veillera donc dans la mesure du possible à soustraire la moyenne du bruit de fond avant de calculer la fonction d'autocorrélation d'un signal.

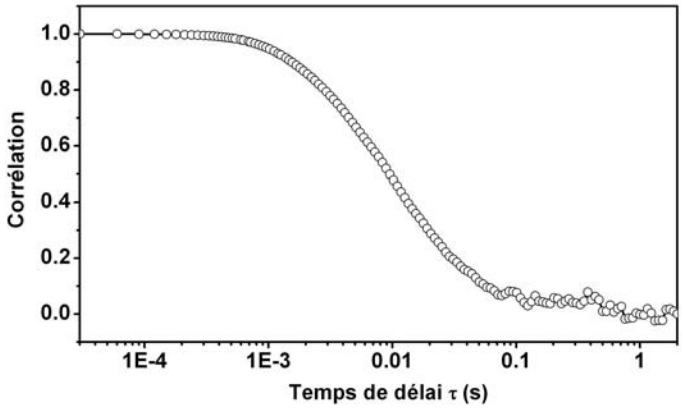

FIG. V.2 : Exemple de courbe d'autocorrélation expérimentale obtenue par ACS (nanoparticules de 10 nm dans glycérol à 80%) après soustraction du bruit et normalisation de l'amplitude à 1.

V.1.4 Fonction d'autocorrélation théorique dans le cas d'un mouvement brownien

V.1.4.a Rappels sur le mouvement brownien

Une particule en suspension dans un fluide est soumise à un mouvement aléatoire appelé mouvement brownien, qui peut être décrit par l'équation de LANGEVIN qui fait intervenir les deux types d'interactions de la particule avec le fluide :

- un frottement hydrodynamique (pour une particule sphérique de rayon a et de vitesse $\mathbf{v}$ dans un solvant de viscosité η, à faible nombre de REYNOLDS, celle-ci s'écrit $-6\pi\eta a\mathbf{v}$)
- une force aléatoire qui décrit les "chocs" des molécules du solvant avec la particule.

La première de ces forces est bien connue. Notons simplement que pour un objet non sphérique, on utilisera à la place du rayon a le *rayon hydrodynamique* a_H[2]. La seconde en revanche est assez délicate à modéliser. On considère généralement que c'est une force totalement aléatoire, non corrélée. Si la particule est à l'équilibre thermique avec le solvant à la température T, on peut montrer que cette force aléatoire est liée à la température. Le mouvement brownien étant intrinsèquement lié à l'agitation thermique, il est donc caractérisé par des énergies de l'ordre de k_BT.

[2]Celui-ci correspond évidemment au rayon lui-même dans le cas d'un objet sphérique, sinon c'est une grandeur caractéristique définie justement à partir de la force de frottement, de manière à pouvoir toujours écrire celle-ci sous la forme $-6\pi\eta a_H\mathbf{v}$. A titre d'exemple, pour un dimère constitué de 2 particules de rayon a accolées, on a $a_H \approx 1.38a$ [Bloomfield, 2002]

On peut montrer que le mouvement d'une particule brownienne est un mouvement de diffusion, caractérisé par une constante de diffusion D qui s'écrit selon l'expression d'EINSTEIN :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \tag{V.5}$$

Cette équation traduit bien le fait que le mouvement brownien résulte d'une compétition entre l'agitation thermique, moteur de la diffusion, et les frottements, qui tendent à réduire la constante de diffusion.

V.1.4.b Calcul de la fonction d'autocorrélation

Le calcul de la fonction d'autocorrélation dans le cas d'un mouvement brownien et d'un volume de détection comme celui décrit ici a été largement détaillé dans le cadre de la FCS [Aragon and Pecora, 1976, Schwille and Haustein, 2004].

Les fluctuations de signal photothermique sont dues aux fluctuations $\delta C(\mathbf{r}, t)$ de la concentration en nanoparticules $C(\mathbf{r}, t)$, et l'on peut alors écrire :

$$\delta S(t) = K \int_V W(\mathbf{r}) \delta C(\mathbf{r}, t) d^3\mathbf{r} \tag{V.6}$$

K regroupe tous les facteurs d'intensité et d'efficacité d'excitation, d'efficacité de collection, d'amplification du signal et de section efficace d'absorption des objets étudiés. Tous ces paramètres, qui ont été envisagés dans le calcul du signal photothermique (cf. II.3.4, page 53), sont considérés comme constants. Seule la variation *spatiale* du signal nous intéresse ici. Elle est contenue dans la fonction $W(\mathbf{r})$ qui correspond au profil du volume de détection. La fonction d'autocorrélation $G(\tau)$ s'écrit alors :

$$G(\tau) = \frac{\int\int W(\mathbf{r}) W(\mathbf{r}') \left\langle \delta C(\mathbf{r}, t) \delta C(\mathbf{r}', t+\tau) \right\rangle d^3\mathbf{r} d^3\mathbf{r}'}{\left(\int W(\mathbf{r}) \left\langle C(\mathbf{r}, t) \right\rangle d^3\mathbf{r} \right)^2} \tag{V.7}$$

où $\langle\ \rangle$ correspond à la moyenne temporelle. L'origine des temps n'ayant pas de rôle ici, on peut réécrire cette équation sous la forme :

$$G(\tau) = \frac{\int\int W(\mathbf{r}) W(\mathbf{r}') \left\langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', \tau) \right\rangle d^3\mathbf{r} d^3\mathbf{r}'}{\left(\langle C \rangle \int W(\mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \right)^2} \tag{V.8}$$

De plus, pour des objets qui diffusent selon un mouvement brownien à 3D, on peut montrer que l'autocorrélation des fluctuations de concentration s'écrit :

$$\left\langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', \tau) \right\rangle = \langle C \rangle \frac{1}{(4\pi D\tau)^{3/2}} \exp\left(-\frac{(\mathbf{r}' - \mathbf{r})^2}{4D\tau} \right) \tag{V.9}$$

Elle correspond, à un facteur multiplicatif près, à la probabilité de trouver une particule en $\mathbf{r}'$ à l'instant $t = \tau$ sachant qu'elle était en $\mathbf{r}$ à $t = 0$. C'est la fonction de GREEN de l'équation

de diffusion, c'est-à-dire sa réponse impulsionnelle. On pose alors :

$$\tau_D = \frac{w_{xy}^2}{4D} \tag{V.10}$$

$$V_{eff} = \frac{\left(\int W(\mathbf{r}) d^3\mathbf{r}\right)^2}{\int W(\mathbf{r})^2 d^3\mathbf{r}} = \pi^{3/2} w_{xy}^2 w_z \tag{V.11}$$

qui représentent respectivement le temps caractéristique de diffusion d'un objet de constante D pour explorer une surface de taille w_{xy} et le volume effectif de détection.

Le calcul de la fonction d'autocorrélation donne alors :

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle C \rangle V_{eff}} \frac{1}{(1 + \tau/\tau_D)} \frac{1}{\sqrt{1 + \tau/(\zeta^2 \tau_D)}} \tag{V.12}$$

On note tout d'abord que la valeur de la fonction de corrélation à 0 correspond à l'inverse du nombre moyen $\langle N \rangle$ de particules détectées dans le volume effectif. Par ailleurs, on constate que cette fonction contient deux contributions : la première a pour temps caractéristique τ_D et correspond à la diffusion 2D dans le plan horizontal. La seconde a pour temps caractéristique $\zeta^2 \tau_D$, où $\zeta = w_z/w_{xy}$ est le rapport d'aspect du volume de détection. Elle peut être négligée dans le cas où $\zeta^2 \gg 1$, lorsque les fluctuations du signal sont principalement dues au passage transverse des nanoparticules dans le volume de détection [Rigler et al., 1993]. La fonction $G(\tau)$ s'écrit alors simplement :

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \tag{V.13}$$

V.2 Mesures du mouvement brownien de nanoparticules d'or dans des mélanges eau/glycérol

V.2.1 Systèmes étudiés

Nous avons réalisé une série d'expériences sur des systèmes modèles constitués de nanoparticules d'or de différentes tailles dans des mélanges eau/glycérol de viscosités variables. Dans ce cas, la constante de diffusion étant directement donnée par la relation d'EINSTEIN (Eqn (V.5)) et les dimensions du volume de détection ayant été mesurées, le temps caractéristique attendu est théoriquement connu.

Les nanoparticules employées sont des produits commerciaux distribués par Sigma-Aldrich (nanoparticules de 5, 10 et 20 nm de diamètre nominal d_n moyen) et sont issues de réactions de réduction d'or IV ($HAuCl_4$) par une solution de citrate ou de borohydrure de sodium. Ces solutions ont été calibrées en microscopie électronique en transmission afin de déterminer les tailles moyennes et polydispersités réelles des nanoparticules utilisées (TAB. V.1).

Quatre mélanges eau/glycérol ont été utilisés comme solvants de viscosités différentes : eau pure, 60%, 80% et 95% de glycérol (en masse). Les viscosités des solutions II à IV ont été mesurées sur un viscosimètre de COUETTE à 22°C.

Solution #	d_n (nm)	$\langle d \rangle_{TEM}$ (nm)
1	5	4.8 ± 1.0
2	10	9.2 ± 1.0
3	20	20.2 ± 1.2

Tab. V.1 : Moyenne et distribution en taille des nanoparticules d'or utilisées, mesurées par TEM.

Solvant #	% glycérol (w/w)	η (mPa.s)
I	0%	1.0 ± 0.2
II	60%	11.5 ± 2.3
III	80%	37.1 ± 7.4
IV	95%	530 ± 106

Tab. V.2 : Viscosité des solvants utilisés, mesurées au rhéomètre (II à IV uniquement).

V.2.2 Dispositif expérimental et analyse des données

Pour chaque solution, un échantillon de 70 µL est déposé entre deux lamelles de microscope. Le porte-échantillon est placé sur le microscope LISNA utilisé en configuration transmission, les lasers étant focalisés quelques microns au-dessus de la lamelle du bas. On observe alors des fluctuations de signal. Dix mesures en moyenne de 10^6 points sont effectuées successivement. Le temps d'intégration (de l'ordre de la centaine de μs) et la puissance d'excitation (quelques centaines de kW/cm^2) sont adaptés de manière à conserver un rapport signal à bruit équivalent (typiquement 30) malgré les différentes tailles de nanoparticules employées. Le temps d'intégration (5 µs à 1 ms) de la détection synchrone est choisi systématiquement supérieur d'un ordre de grandeur au temps caractéristique attendu (autrement ce temps de moyennage apparaît dans la fonction de corrélation). Là encore, la perte de signal à bruit dans le cas des objets les plus rapides, donc avec les temps d'intégration les plus courts, est compensée en jouant sur la puissance d'excitation. Enfin, la fréquence d'acquisition (100 kHz à 1 kHz) est choisie de manière à ce que le temps entre deux points de mesure soit au moins égal au temps d'intégration de la détection synchrone et un ordre de grandeur au moins plus court que le temps caractéristique attendu. La température de la pièce est maintenue à 22°C afin d'éviter les variations de viscosité.

Pour chaque acquisition, la fonction d'autocorrélation est calculée et ajustée avec la fonction de l'équation (V.13) (on néglige la contribution en de la diffusion selon l'axe vertical car $\zeta^2 \gg 1$), avec 2 paramètres variables : le temps caractéristique et l'amplitude. Le temps retenu est la moyenne des temps obtenus sur les différentes acquisitions.

La figure V.3 montre 3 exemples de fonctions d'autocorrélation obtenues pour des tailles

de nanoparticules et des viscosités différentes.

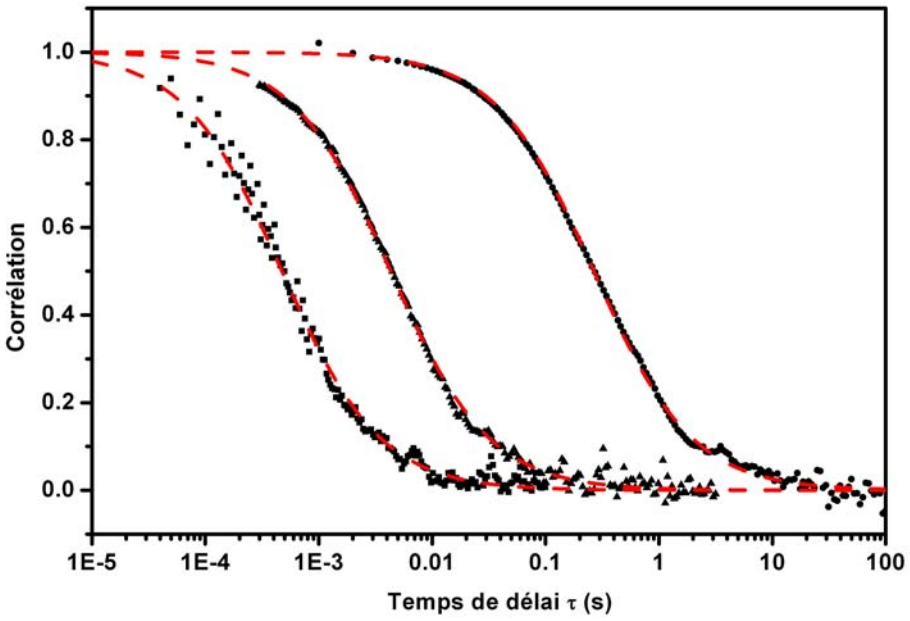

FIG. V.3 : Exemples de fonctions d'autocorrélation (normalisées à 1) pour des tailles de nanoparticules et des solvants différents : (■) 5 nm dans eau pure ; (▲) 5 nm dans 60% glycérol ; (•) 20 nm dans 95% glycérol. (- -) Interpolations par la fonction de l'équation (V.13).

V.2.3 Temps caractéristiques mesurés pour les différentes solutions

D'après l'expression vue précédemment (cf. V.1, page 131), le temps caractéristique de la fonction d'autocorrélation doit être proportionnel à ηa, où η est la viscosité du solvant et a le rayon de la nanoparticule :

$$\tau_D = \gamma \eta a \text{ avec } \gamma = \frac{6\pi w_{xy}^2}{4k_B T} \tag{V.14}$$

La figure V.4 montre l'ensemble des points expérimentaux, pour toutes les viscosités et tous les diamètres. Le temps caractéristique mesuré est tracé en fonction du produit ηa. L'ensemble des points est interpolé par une fonction linéaire qui donne $\gamma_{exp} = 0.97 \pm 0.01 \times 10^8$ $m^2.J^{-1}$. On note un très bon accord entre les données expérimentales et la droite calculée pour $\gamma_{th} = 1.13 \times 10^8$ $m^2.J^{-1}$, sans le moindre paramètre ajustable, et ce sur une très large gamme d'échelles de temps (0.3 à 800 ms), et donc de constantes de diffusion (100 à 0.03 $\mu m^2/s$).

Ces bornes ne sont cependant pas absolues. La limite aux temps courts est simplement liée au temps d'intégration du signal qui fixe le rapport signal à bruit. Elle pourrait être

repoussée en utilisant des nanoparticules plus grosses, le signal étant proportionnel à a^3. Pour les petites nanoparticules, il faudrait utiliser des puissances d'excitation plus importantes. Aux temps longs, c'est la durée de l'acquisition (qui doit être de 2 à 3 ordres de grandeur plus longue que le temps caractéristique) qui constitue la seule limite car aucun phénomène du type photoblanchiment n'empêche l'observation de dynamiques très lentes (cf. V.1.1, page 131).

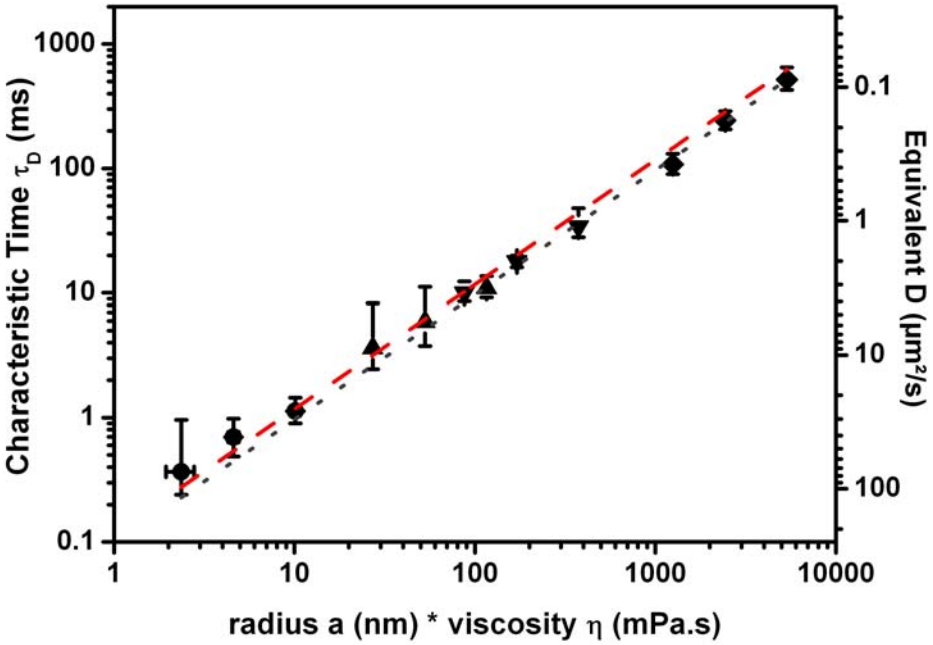

Fig. V.4 : Temps caractéristique de la fonction d'autocorrélation obtenue pour des nanoparticules de 5 nm, 10 nm et 20 nm dans des mélanges eau-glycérol à (•) 0%, (▲) 60%, (▼) 80% et (♦) 95%. (· · ·) Ajustement linéaire : $\gamma_{exp} = 0.97 \pm 0.01 \times 10^8$ m^2.J^{-1}. (- -) Valeurs théoriques pour $\gamma_{th} = 1.13 \times 10^8$ m^2.J^{-1} (sans paramètre ajustable).

V.2.4 Simulations sur l'effet de la polydispersité

Nous avons voulu tester par une simulation numérique l'influence de la distribution en taille des nanoparticules sur le temps caractéristique mesuré. En effet, comme dans le cadre de la FCS, si plusieurs espèces $\{i\}_{1..n}$ sont présentes en solution, avec des concentrations $\langle C_i \rangle$, des temps caractéristiques de diffusion $\tau_{D,i}$ et des sections efficaces d'absorption σ_i différentes, on peut montrer, par analogie avec le cas de la FCS, que la fonction d'autocorrélation qui en résulte s'écrit [Schwille and Haustein, 2004] :

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff}} \frac{\sum_{i=1}^{n} \sigma_i \langle C_i \rangle M_i(\tau)}{\left(\sum_{i=1}^{N} \sigma_i \langle C_i \rangle\right)^2} \tag{V.15}$$

avec $M_i(\tau) = \frac{1}{1+\tau/\tau_{D,i}}$.

Dans le cas des nanoparticules d'or en solution de rayon le temps caractéristique est proportionnel au rayon ($\tau_{D,i} \propto a_i$) et la section efficace au cube du rayon ($\sigma_i \propto a_i^3$).

Nous avons donc simulé une série de mesures dans lesquelles $N = 1000$ valeurs sont tirées au sort dans la distribution de taille des nanoparticules, laquelle est gaussienne, de moyenne $\langle a \rangle$ et de largeur $\delta a / \langle a \rangle \approx 10\%$. La fonction d'autocorrélation globale est calculée par l'équation (V.15) (avec toutes les $\langle C_i \rangle$ égales à 1). C'est donc la somme pondérées de plusieurs fonctions de corrélations avec des temps caractéristiques différents. Après avoir ajouté un bruit blanc d'amplitude variable, la fonction globale est ajustée avec la fonction utilisée pour analyser les résultats, c'est-à-dire avec un seul temps caractéristique (Eqn (V.13)).

		Largeur distribution rayon						
		0%	1%	2%	5%	10%	20%	30%
Bruit (u. arb.)	10^{-4}	1.00	1.00	1.00	1.01	1.05	1.20	13.6
	10^{-3}	1.00	1.00	1.00	1.01	1.06	1.19	13.8
	0.01	1.00	1.00	1.00	1.01	1.05	1.19	14.0
	0.1	1.00	1.00	1.00	1.01	1.06	1.19	14.0
	0.5	1.00	1.00	1.01	1.01	1.06	1.18	14.0

TAB. V.3 : Temps caractéristique obtenu (pour un temps correspondant à $\langle a \rangle$ égal à 1) en fonction du bruit (dans les expériences réalisées, il correspond typiquement à 0.01) et de la distribution en taille des nanoparticules (typiquement 10% dans nos expériences).

Les résultats (TAB. V.3) montrent que quel que soit le bruit, le temps caractéristique global était légèrement surestimé par rapport au temps moyen (correspondant à la taille moyenne des particules) lorsque la largeur de la distribution dépasse 5%. Cet effet systématique est cohérent avec le fait que les particules les plus grosses donnent un temps plus long tout en contribuant de manière significativement plus importante à la fonction résultante. Dans les conditions d'expérience usuelles, on surestime donc systématiquement le temps caractéristique d'environ 5%. Ceci reste inférieur aux incertitudes expérimentales (typiquement 10 à 20%, dues essentiellement à la mesure de la viscosité). De plus, dans toute la suite, nous verrons des mesures relatives de taille, pour lesquelles ces effets se compensent. Nous avons donc jugé que cet effet pouvait être négligé dans nos résultats.

V.3 Application à la mesure de taille de nanoparticules fonctionnalisées

La technique ACS mesure un temps caractéristique qui dans le cas d'une diffusion brownienne est proportionnel au diamètre moyen des nanoparticules en solution (Eqn (V.14)). Si

tous les autres paramètres sont connus, on peut donc utiliser cette méthode pour mesurer le rayon hydrodynamique de différentes nanoparticules, par exemple couplées à des anticorps. Ce type de mesure revêt une grande importance afin de connaître l'encombrement potentiel dû au marqueur dans le cas d'expériences en milieu confiné (cf. III.1, page 81).

Le plus simple pour effectuer ce genre de mesure avec le moins d'incertitudes possible est d'effectuer une expérience de référence avec des nanoparticules de diamètre connu (mesuré par exemple en microscopie électronique) et d'utiliser ensuite exactement les mêmes conditions (solvant, température,...) pour déduire la taille d'autres nanoparticules à partir du rapport des temps mesurés.

V.3.1 Mesures par ACS

Nous avons utilisé comme références des nanoparticules commerciales distribuées par Sigma-Aldrich (cf. V.2.1, page 136). Puis des mesures ont été faites pour d'autres nanoparticules commerciales, couplées ou non :

- nanoparticules de 5 nm et 10 nm de diamètre couplées à des anticorps de chèvre anti-souris (IgG, BBInternational)
- nanoparticules de 5 nm et 10 nm de diamètre couplées à des fragments Fab'2 d'anticorps de chèvre anti-souris (Fab'2, BBInternational)
- nanoparticules de 7.5 nm de diamètre non couplées (BBInternational)[3]
- ces mêmes nanoparticules de 7.5 nm (BBInternational) recouvertes d'une courte séquence peptidique (CALNN, préparées par L. Duchesne selon [Lévy et al., 2004], cf. II.5.2, page 76)
- nanoparticules de 5 nm (BBInternational) recouvertes de la même séquence peptidique (CALNN)

Toutes les expériences ont été réalisées dans une solution de glycérol à 80% (en masse), afin simplement de ralentir la dynamique des nanoparticules et de pouvoir utiliser des temps d'intégration plus longs.

Le tableau V.4 récapitule les tailles moyennes mesurées en microscopie électronique pour des nanoparticules de 5 nm et 10 nm distribuées par Sigma-Aldrich, qui servent ici de référence, et les tailles mesurées par ACS pour les autres nanoparticules étudiées.

Avec les anticorps complets (IgG), des variations de taille de 5.2 nm et 7.5 nm ont été mesurées respectivement pour des nanoparticules de 5 nm et 10 nm de diamètre, tandis que que couplées à des fragments Fab'2, les deux types de nanoparticules voient leur diamètre augmenter de manière similaire (4.3 nm et 4.8 nm respectivement). Ces mesures sont systématiquement significativement plus importantes que les incertitudes. De plus, ces augmentations de diamètre sont compatibles avec les tailles attendues pour les protéines couplées correspondantes. On note cependant qu'en considérant des tailles respectives d'environ $14 \times 14 \times 5$ nm

[3]Ces nanoparticules sont des nanoparticules de 10 nm selon le fournisseur mais les mesures en ACS ont donné un diamètre moyen de 7.5 nm. Cette valeur a été confirmé *a posteriori* par des mesures de distribution de signal LISNA comme expliqué au II.3.4.d, page 59

Echantillon de référence	Diamètre moyen en ME (nm)	Échantillon testé	Diamètre hydrodynamique $d_H = 2a$ (nm)
5 nm (Sigma-Aldrich)	4.8 (ME)	5 nm IgG	10.0 ± 2.4
		5 nm Fab'2	9.1 ± 1.9
		5 nm CALNN	6.3 ± 1.5
10 nm (Sigma-Aldrich)	9.2 (ME)	10 nm IgG	16.7 ± 2.7
		10 nm Fab'2	13.0 ± 3.4
		7.5 nm (BBI)	7.5 ± 0.8
		7.5 nm CALNN	8.8 ± 0.9

TAB. V.4 : Diamètre hydrodynamique de quelques nanoparticules couplées, mesuré par microscopie électronique (ME pour les deux références, et par ACS pour les autres)

et $14 \times 7 \times 5$ nm pour celles-ci (d'après leur structure cristallographique, [Harris et al., 1997]), il semble que les nanoparticules ne sont certainement pas complètement recouvertes de protéines mais plus vraisemblablement couplées à quelques anticorps ou fragments. De plus, on n'oubliera pas que l'on a mesuré ici des *rayons hydrodynamiques* qui, pour des objets non sphériques, correspondent simplement à une taille caractéristique et pas forcément à l'une des dimensions réelles de l'objet. Enfin, on constate ici que pour des applications où l'encombrement stérique (et donc le rayon hydrodynamique) est un facteur déterminant, comme dans la problématique évoquée au Chapitre III, il n'est pas nécessairement intéressant de chercher à réduire systématiquement la taille de la nanoparticule car la contribution de la protéine finit par dominer tandis que le signal LISNA décroît assez rapidement.

En ce qui concerne les nanoparticules recouvertes de CALNN, nous avons mesuré une augmentation du diamètre hydrodynamique de ≈ 1.5 nm pour des nanoparticules de 5 nm et de ≈ 1.3 nm pour celles de 7.5 nm. Ces mesures sont également significativement plus importantes que les incertitudes. La figure V.5 montre les courbes d'autocorrélation obtenues pour des nanoparticules de 7.5 nm de diamètre et les mêmes nanoparticules après les avoir recouvertes du peptide CALNN. Cette augmentation du diamètre est parfaitement compatible avec la taille que l'on peut estimer pour un tel peptide (~ 0.15 nm par acide aminé, soit au total 1.5 nm de plus sur le diamètre).

V.3.2 Comparaison avec la diffusion de la lumière (DLS)

V.3.2.a Principe et applications de la DLS

La DLS (*Dynamic Light Scattering*) est une méthode optique couramment utilisée pour des mesures de taille à l'échelle nanométrique (nanoparticules, microémulsions, protéines...). Elle s'appuie sur le fait que le temps caractéristique de corrélation τ_{DLS} de l'intensité lumineuse diffusée par l'échantillon est lié au coefficient de diffusion (spatiale) D des particules

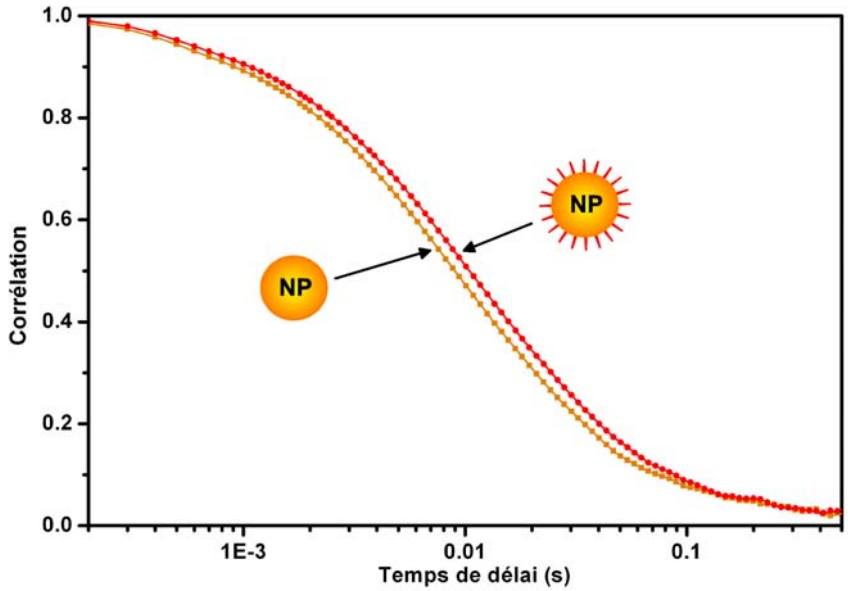

Fig. V.5 : Fonctions de corrélation expérimentales : (■-■) nanoparticules non couplées ($d = 7.5 \pm 0.8$ nm) ; (●-●) les mêmes nanoparticules recouvertes du peptide CALNN ($d = 8.8 \pm 0.9$ nm).

en suspension, lequel est lié, via la relation d'Einstein (cf. Eqn (V.5)) que nous avons vue, au rayon a de ces particules. On parle de diffusion simple (par opposition à la technique de diffusion multiple, employée pour étudier des systèmes plus denses) lorsque la suspension est suffisamment diluée pour considérer que, statistiquement, la lumière n'est diffusée que par une seule particule avant de sortir.

Un faisceau laser est utilisé pour éclairer l'échantillon, à intensité constante. Celui-ci diffuse la lumière qui est collectée sous un angle θ par rapport au faisceau incident au moyen d'un photomultiplicateur ou d'une photodiode à avalanche. Le signal est traité par ordinateur pour déterminer la fonction d'autocorrélation des fluctuations de l'intensité qui s'écrit [Berne and Pecora, 1976, Weitz and Pine, 1993] :

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(\tau)I(0)\rangle}{\langle I\rangle^2} = 1 + \beta\,|g_1(\tau)|^2 \tag{V.16}$$

où β est un coefficient dépendant du système optique et $g_1(\tau)$ la fonction d'autocorrélation du champ électrique :

$$g_1(\tau) = \frac{\langle E(\tau)E(0)\rangle}{\langle E\rangle^2} \tag{V.17}$$

On peut alors, dans le cadre de la diffusion simple, écrire $g_1(\tau)$ sous la forme :

$$g_1(\tau) = \left\langle \exp\left[-\imath\vec{q}\cdot\vec{\Delta r}(\tau)\right]\right\rangle \approx \exp\left[-q^2\left\langle \Delta r^2(\tau)\right\rangle/6\right] \tag{V.18}$$

Dans cette expression, $\vec{\Delta r} = \vec{r(\tau)} - \vec{r(0)}$ est le déplacement d'une particule, $\vec{q} = \vec{k_d} - \vec{k_i}$ est la différence des vecteurs d'onde diffusé et incident ($q = \|\vec{q}\| = \frac{4\pi n}{\lambda}\sin(\theta/2)$), et l'approximation revient à considérer que $\vec{\Delta r}$ est une variable gaussienne.

Si les particules sont animées d'un mouvement brownien à 3D de constante D, on peut écrire que $\left\langle \Delta r^2(\tau) \right\rangle = 6D\tau$ et donc :

$$g_1(\tau) = \exp(-q^2 D\tau) \tag{V.19}$$

De plus, la relation d'EINSTEIN permet de déterminer D :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \tag{V.20}$$

où η est la viscosité du milieu et $k_B T$ l'énergie thermique.

On en déduit enfin le rayon hydrodynamique des particules qui s'écrit, en fonction du temps caractéristique de décroissance τ_{DLS} de $g_2(\tau)$:

$$a = 2\tau_{DLS}\frac{k_B T\left[\frac{4\pi n}{\lambda}\sin(\theta/2)\right]^2}{6\pi\eta} \tag{V.21}$$

Notons que si l'analyse des données en DLS s'appuie sur l'étude de la fonction d'autocorrélation d'intensité, la forme de cette dernière est différente de la FCS ou de l'ACS. Le type de mesure est en effet très différent : en DLS, la mesure n'est pas locale, on sonde les fluctuations d'intensité en provenance d'une large zone de l'échantillon, et donc un vaste ensemble de diffuseurs.

V.3.2.b DLS et ACS en milieu fortement diffusant

Cette technique est largement répandue pour des mesures de tailles à des échelles submicrométriques. Elle est en effet sensible et relativement simple à mettre en œuvre. Elle présente cependant quelques difficultés : l'échantillon doit diffuser suffisamment pour que le signal soit mesurable. Pour de petites nanoparticules, cela signifie qu'il faut souvent faire des mesures longues afin de moyenner suffisamment longtemps. On ne peut pas en effet augmenter la concentration à volonté sous peine de voir apparaître des artefacts (diffusion multiple, interactions entre particules).

De plus, il faut impérativement travailler avec des échantillons très propres. En effet, toute impureté ou poussière va jouer le rôle d'un diffuseur important qui va contribuer à modifier la fonction d'autocorrélation aux temps longs. La section efficace de diffusion variant comme la puissance 6 de la taille, cette contribution a toutes les chances de masquer le signal recherché, comme nous allons le voir dans l'exemple qui suit.

Nous avons étudié un mélange de nanoparticules d'or de 10 nm (solution 2, TAB. V.1, page 137) et de billes de latex de 330 nm de diamètre. Pour les expériences de DLS, nous avons utilisé la solution mère de nanoparticules d'or (fraction volumique $\phi_{10nm} \approx 10^{-5}$, *ie*

$\approx 10^{13}$ particules/mL) seule, puis avec un faible pourcentage de billes de latex ($\phi_{330nm} = 10^{-5}$ *ie* $\approx 10^{9}$ particules/mL). A titre de contrôle, une solution contenant simplement les billes de latex à $\phi_{330nm} = 10^{-5}$ a été testée. Un laser à Krypton à 647 nm a été utilisé pour l'excitation avec une puissance de 400 mW. La détection est faite au moyen d'un photomultiplicateur placé à 90° par rapport au faisceau incident.

Les expériences d'ACS ont été réalisées en utilisant une solution de glycérol à 80% contenant beaucoup moins de nanoparticules de 10 nm (fraction volumique $\phi_{10nm} \approx 10^{-7}$, *ie* $\approx 10^{11}$ particles/mL) seule, puis avec un pourcentage de billes de latex légèrement plus important ($\phi_{330nm} = 10^{-4}$ *ie* $\approx 10^{8}$ particles/mL). A cette concentration, l'échantillon est visiblement trouble.

Comme attendu, les expériences de DLS ont permis de détecter les nanoparticules de 10 nm lorsqu'elles sont seules en solution. Cependant, dès que les billes de latex sont ajoutées, la courbe se décale vers les temps longs, comme le montre la figure V.6. Ceci simule assez bien l'effet d'un fond diffusant. Malgré la faible concentration des billes de latex, leur contribution

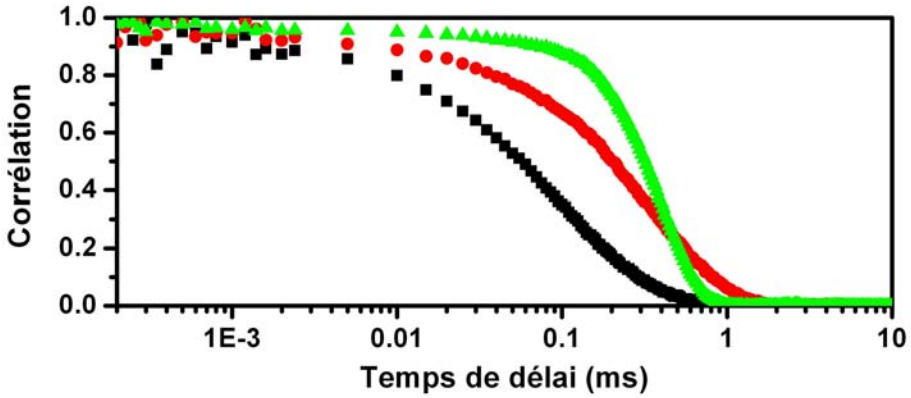

Fig. V.6 : Courbes d'autocorrélation en DLS : (■) nanoparticules de 10 nm seules ; (▲) particules de latex de 330 nm seules ; (●) solution mélangeant les deux types de particules.

est très importante : leur section efficace de diffusion est en ordre de grandeur $(330/10)^6 \approx 10^9$ fois supérieure à celle des nanoparticules d'or.

Lors des mesures d'ACS par contre, aucune différence n'a été notée entre les deux solutions testées, comme le montre la figure V.7. Les deux courbes sont identiques ; après analyse, elles donnent le même temps de corrélation : $\tau_{sans\ latex} = \tau_{avec\ latex} = 11 \pm 1$ ms.

Cet effet s'explique simplement par le fait que la technique ACS, comme toutes les techniques photothermiques, n'est sensible qu'à l'absorption [Boyer et al., 2002]. Contrairement aux techniques basées sur la diffusion, elle n'impose donc pas de travailler en milieu non diffusant. Elle peut donc constituer une alternative très intéressante à la DLS pour mesurer des tailles de nano-objets absorbants avec moins de contraintes sur la propreté de l'échantillon.

Notons également que la méthode LISNA peut détecter également d'autres types de nano-objets absorbants tels que les nanoparticules d'argent, les nanocristaux semiconducteurs

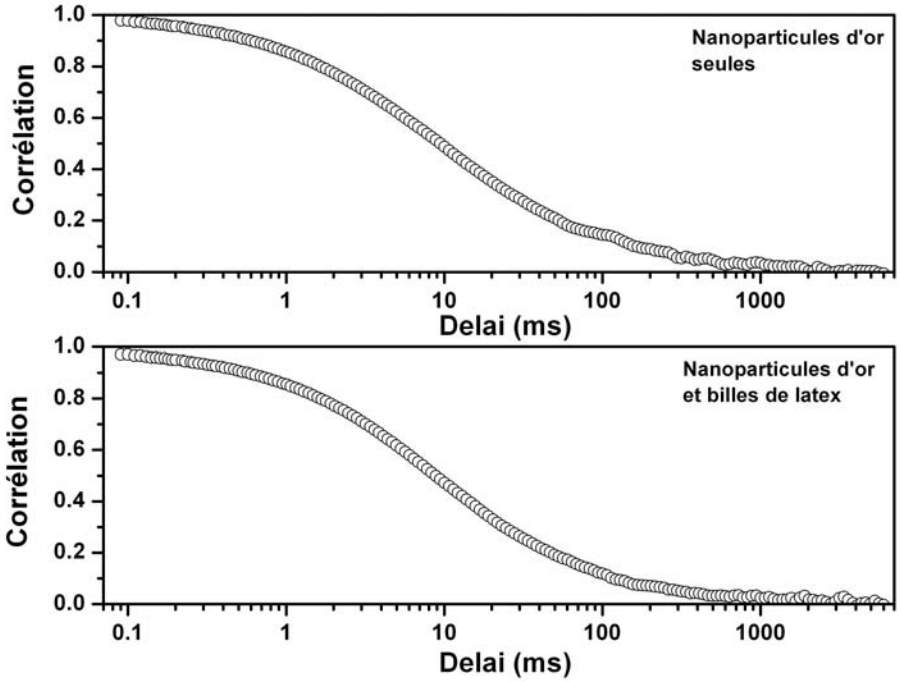

FIG. V.7 : Courbes d'autocorrélation en ACS : en haut, nanoparticules d'or de 10 nm dans du glycérol à 80% ; en bas, les mêmes en présence de billes de latex de 330 nm. Les deux courbes sont quasi superposables, d'où les graphes séparés. Les temps de corrélation mesurés sont les mêmes : $\tau_{sans\ latex} = \tau_{avec\ latex} = 11 \pm 1$.

[Berciaud et al., 2005a] et les nanotubes de carbone [Berciaud et al., 2007]. L'ACS pourrait donc être utilisée pour la détection et des mesures de taille sur de tels objets. De plus, en utilisant une excitation polarisée, nous pourrions détecter la diffusion rotationnelle et ainsi avoir accès au rapport d'aspect d'objets allongés comme cela a été proposé dans le cadre de la FCS [Tsay et al., 2006].

V.4 Limitations de la FCS et intérêt de l'ACS

La FCS est une technique très largement répandue avec de nombreuse applications, comme nous l'avons évoqué plus haut. Elle souffre cependant de quelques limitations liées principalement à la photophysique des fluorophores employés et auxquelles l'ACS sera susceptible de répondre.

Tout d'abord, aux temps courts, des phénomènes photophysiques, liés à la structure électronique des fluorophores, peuvent introduire des artefacts. La FCS peut alors être utilisée comme un outil performant pour étudier ces phénomènes, comme ceux liés aux états triplets [Widengren et al., 1995]. En contrepartie, ces processus introduisent de nouveaux temps caractéristiques dans les fonctions d'autocorrélation du signal (typiquement à l'échelle submilliseconde) qui empêchent d'observer des dynamiques à ces échelles de temps. Ces phéno-

mènes photophysiques sont absents dans le cas de l'ACS. Autrement dit, la fonction d'autocorrélation obtenue traduit exclusivement les propriétés de diffusion des nanoparticules. Les études aux temps courts ne sont en fait limitées que par le temps d'intégration de la détection synchrone qui doit être suffisamment long pour que le rapport signal à bruit soit raisonnable. Des temps caractéristiques de l'ordre de 0.3 ms ont ainsi pu être mesurés. Pour des dynamiques plus rapides, il suffit d'augmenter le signal, par exemple en augmentant la puissance d'excitation.

Aux temps longs, la FCS est limitée par le photoblanchiment des fluorophores employés (cf. I.2.3.d, page 27). Celui-ci induit des artefacts [Dittrich and Schwille, 2001, Dix et al., 2006], dont une diminution du temps caractéristique apparent si le temps de résidence des fluorophores dans le volume de détection est supérieur à la durée de vie du fluorophore. Cet effet peut être atténué en diminuant l'intensité d'excitation mais au prix d'un rapport signal à bruit plus faible. Même si des développements récents, employant par exemple des techniques de balayage [Digman et al., 2005, Ries and Schwille, 2006], ont montré que cette limite pouvait être légèrement repoussée, la FCS est généralement limitée à des dynamiques aux temps courts, typiquement inférieurs à la centaine de millisecondes. En revanche, l'ACS ne présente *aucune* limitation aux temps longs car le signal LISNA d'une nanoparticule est stable pendant des temps arbitrairement longs. Des dynamiques à des échelles de temps proches de la seconde ont par exemple été observées précédemment (cf. V.2.3, page 138).

Enfin, le signal LISNA, basé sur l'absorption, ne sature pas aux puissances d'excitation utilisées, comme nous l'avons précédemment évoqué (cf. II.1, page 39). Il n'est donc pas nécessaire de prendre en compte des artefacts liés à la saturation comme en FCS où il est en effet préférable de réaliser les expériences dans la limite des intensités d'excitation nulles si l'on veut éviter que la saturation des fluorophores ne perturbe la mesure [Davis and Shen, 2006, Enderlein et al., 2005].

Tout ceci montre que l'ACS peut être une alternative très intéressante à la FCS dans de nombreux cas. Ajoutons à cela qu'elle bénéficierait des nombreuses études théoriques et expérimentales réalisées dans le cadre de la FCS (évaluation des artefacts liés à la forme des faisceaux, analyse des données expérimentales dans le cadre de mouvements particuliers ou de dynamiques d'agrégation, etc...) dans la mesure où le formalisme est exactement le même.

V.5 Quelques perspectives

V.5.1 Diffusion d'une nanoparticule fortement chauffée par laser

Le mouvement brownien est un mouvement qui résulte d'un équilibre entre l'agitation thermique et les frottements visqueux. Or ces deux paramètres varient lorsque la température locale change. Nous avons donc voulu tester l'effet d'une forte excitation photothermique sur le mouvement de nanoparticules dans une solution à forte teneur en glycérol. En effet, dans ce cas, la viscosité varie plus rapidement avec la température. Le but est de sonder

l'échauffement local dû à l'absorption du laser d'excitation et de regarder son effet éventuel sur le mouvement de nanoparticules browniennes.

Pour cela, nous avons utilisé deux lasers pour l'excitation. D'une part, le laser Nd :Yag à 532 nm est modulé et sert à la détection, avec une faible intensité ($\sim$ 10 kW/cm^2). D'autre part, le laser Argon (utilisé à 488 nm : cette longueur d'onde est en dehors de la résonance plasmon mais est néanmoins fortement absorbée via des transitions interbandes) est utilisé sans modulation pour échauffer les nanoparticules en solution. Il est défocalisé afin que les nanoparticules soient déjà chauffées dans une large zone au voisinage du volume de détection (correspondant aux lasers HeNe et Nd :Yag) ; l'intensité varie ainsi de 0 à 2 MW/cm^2 (ce qui est notablement plus important que les puissances utilisées pour les applications à la biologie). L'élévation de température pourrait atteindre dans ce cas quelques dizaines de degrés (cf. II.4, page 64). En utilisant un échantillon de nanoparticules d'or de 20 nm dans du glycérol à 95%, les premiers résultats indiquent que le temps caractéristique de diffusion mesuré par ACS décroît de manière significative lorsque la puissance du laser de chauffage augmente.

Cet effet peut être attribué à une diminution de la viscosité du milieu. Cependant, le phénomène observé ne peut pas être décrit simplement par la théorie du mouvement brownien. En effet, celle-ci suppose un équilibre thermique entre l'objet diffusant et le solvant thermostaté. Dans le cas présent, l'objet diffusant est un point source de chaleur. Nous avons donc à faire à un système hors d'équilibre. C'est dans cette perspective que nous souhaitons étudier plus en détails l'effet d'un chauffage important sur la diffusion des nanoparticules. C'est pourquoi la prochaine étape consisterait à utiliser la méthode de suivi de nanoparticules SNaPT pour suivre des nanoparticules dans une solution de glycérol en l'absence puis en présence de chauffage induit par le laser Argon, comme décrit précédemment. Ceci devrait permettre d'accéder à la statistique des pas du mouvement aléatoire observé et de déterminer s'il s'agit ou non d'une diffusion anormale.

Une autre application assez voisine consisterait à incorporer et à suivre des nanoparticules dans un alcane solide à température ambiante mais dont la température de transition solide-liquide soit proche de la température ambiante, tels que l'hexadécane ($T^{fus}_{\mathrm{C}_{16}} = 18°\mathrm{C}$), l'octadécane ($T^{fus}_{\mathrm{C}_{18}} = 28°\mathrm{C}$) ou l'eïcosane ($T^{fus}_{\mathrm{C}_{20}} = 38°\mathrm{C}$). Ainsi, en se plaçant dans des conditions expérimentales telles que la température ambiante soit légèrement inférieure à ce seuil, nous devrions pouvoir observer le passage entre une situation dans laquelle les nanoparticules sont immobiles et un régime de diffusion, lorsque l'échauffement sera suffisant pour induire une transition de phase (ou plus exactement une nucléation) très locale.

V.5.2 Étude par ACS de l'agrégation de protéines

V.5.2.a Système étudié : (strept)avidine et biotine

La biotine et la (strept)avidine sont deux molécules couramment utilisées en biophysique du fait de leur grande affinité (liaison quasi covalente). Nous avons déjà eu l'occasion d'en évoquer quelques utilisations jusqu'à présent, avec quelques variantes (cf. II.5.1.a, page 73 et

II.5.2, page 76).

L'avidine est une glycoprotéine tétramérique, chaque monomère étant capable de fixer une molécule de biotine. Ce tétramère est organisé en dimère de dimères. La forme générale des monomères est celle d'un tonneau dont la cavité est hydrophobe [Livnah et al., 1993].

La streptavidine est également une protéine tétramérique, l'équivalent bactérien de l'avidine, produite naturellement par une bactérie, *Streptomyces avidinii*. Elle est également capable de fixer 4 molécules de biotine. Sa structure est dans l'ensemble semblable à celle de l'avidine.

La biotine enfin, appelée aussi vitamine H ou B8, est une petite molécule hydrosoluble. La forte affinité de la biotine pour l'avidine et la streptavidine a été exploitée durant ces dernières années dans différentes applications biomédicales, biochimique, immunologiques, nanotechnologiques et chimiques [Wilchek and Bayer, 1990, Bratthauer, 1999]. Avec des constantes d'affinité de l'ordre de 10^{15} M^{-1} pour le système biotine-avidine, et de 10^{13} M^{-1} pour le système biotine-streptavidine [Green, 1990], ces interactions non-covalentes sont parmi les plus fortes connues entre un ligand et une protéine.

Ce couple (strept)avidine-biotine constitue pour nous un système modèle. Nous pourrions en effet l'utiliser pour mettre en évidence la possibilité d'étudier par ACS des phénomènes d'interaction et d'agrégation.

V.5.2.b Méthode expérimentale et résultats attendus

Nous utilisons ici des nanoparticules d'or de 10 nm recouvertes d'une séquence peptidique CALNN et portant une et une seule biotine chacune. Ces nanoparticules sont préparées par Laurence Duchesne selon la technique développée par nos collaborateurs de Liverpool et que nous avons déjà évoquée (cf. II.5.2, page 76). Après avoir mesuré leur temps caractéristique de diffusion dans un mélange eau/glycérol, nous ajoutons de l'avidine à différentes concentrations de manière à obtenir différents ratios avidine/biotine. Nous mesurons alors le nouveau temps caractéristique.

On s'attend globalement à une augmentation de ce temps du fait de la formation de structures plus grosses. Cependant, si l'avidine comporte 4 sites de liaison, il n'est pas certain qu'il soit possible de fixer 4 nanoparticules biotinylées par molécule d'avidine pour des raisons d'encombrement stérique (la molécule d'avidine mesure environ 5 nm dans sa plus grande dimension). Deux configurations sont donc vraisemblables : la formation de tétramères ou de dimères (une nanoparticule de chaque « côté » de l'avidine). Le premier cas devrait conduire à une augmentation du temps caractéristique d'un facteur 1.77 et la seconde 1.38 [Bloomfield, 2002], sans tenir compte de la taille de la streptavidine.

De plus, si le ratio avidine/biotine n'est pas optimal par rapport à la configuration la plus stable (si l'on a en moyenne par exemple 3 biotines pour une avidine), le temps caractéristique mesuré par ACS fera apparaître une moyenne entre celui des oligomères et des nanoparticules libres. On devrait obtenir un temps maximum pour le ratio optimal. Par exemple, en considérant qu'il n'est possible de former que des dimères, nous devrions obtenir un temps

maximal pour un ratio de 2 biotines pour une avidine (FIG. V.8).

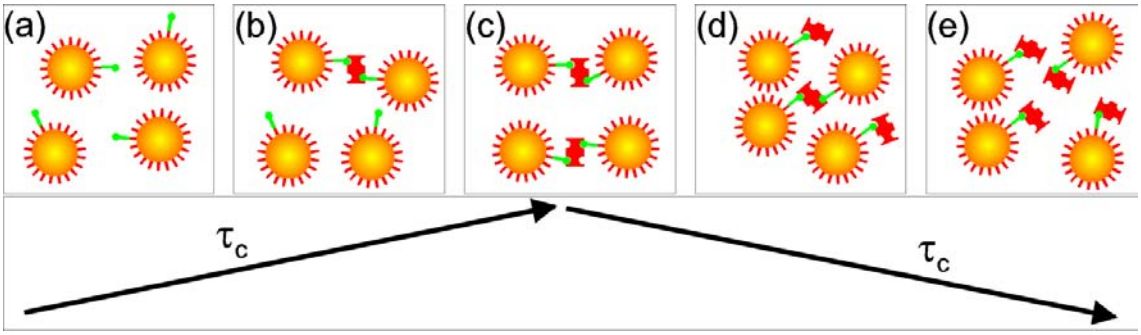

FIG. V.8 : Évolution théorique du temps caractéristique mesuré en supposant une configuration optimale correspondant à $R = 2/1$ (biotine/avidine) : (a) sans avidine ($R \to \infty$), (b) $R = 4/1$, (c) $R = 2/1$, (d) $R = 4/3$, (e) $R = 1/1$.

V.5.2.c Résultats préliminaires

Comme le montre la figure V.9, nous avons d'ores et déjà observé une augmentation significative du temps caractéristique lors de l'ajout d'avidine. Cette expérience a été réalisée pour une concentration en nanoparticules biotinyliées de 4 nM et une concentration en avidine tétramérique de 2 nM dans du PBS 1x (soit un ratio de 2 biotines par avidine). Les mélanges sont ensuite dilués à 10% dans du glycérol à 80%.

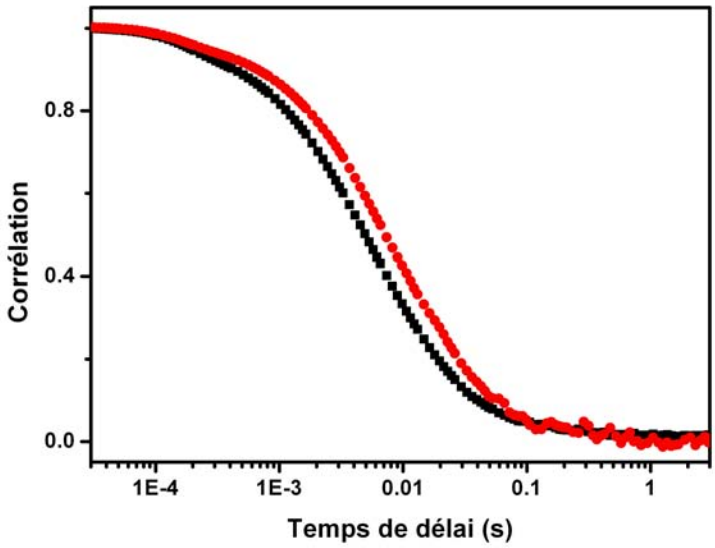

FIG. V.9 : Exemples de courbes d'autocorrélation expérimentales obtenues pour des nanoparticules CALNN biotinylées seules (■-■) et en présence d'avidine (●-●).

La reproductibilité de la série d'expériences ne permet pas encore de conclure avec certitude sur le ratio optimal, cette augmentation restant variable d'une expérience à l'autre pour un même ratio. De plus, les conditions de préparation de l'échantillon (temps d'incubation dans le PBS, puis dans le glycérol...) semblent avoir une importance non négligeable et la variation de temps caractéristique reste assez proche de la limite de résolution de l'expérience. Il faudrait donc améliorer et contrôler un peu mieux le protocole expérimental afin d'apporter une réponse claire quant à la stœchiométrie du complexe créé et l'influence ou non de l'encombrement stérique.

V.5.3 Application à la biologie : ACS sur neurones

Comme nous l'avons expliqué au début de ce Chapitre, l'ACS a été développée dans le but d'obtenir des informations sur la diffusion des récepteurs postsynaptiques. Nous avons pour cela réalisé des expériences préliminaires en utilisant des neurones marqués au moyen de nanoparticules d'or de 5 nm de diamètre, la protéine cible étant le récepteur GluR2 (voir le Chapitre III pour plus de détails sur le système biologique étudié). Nous avons pour cela utilisé un marquage relativement important (comme on peut le constater sur l'image LISNA présentée sur la figure V.10 (a)). En mesurant le signal en un point fixe, nous avons pu observer des fluctuations lorsque les nanoparticules traversent le volume de détection (Fig. V.10 (b-c)).

Dans cette expérience préliminaire, la durée d'observation est trop courte pour étudier la fonction d'autocorrélation du signal de manière significative. Cependant, on peut remarquer que la durée des événements (de 0.2 à 2 secondes environ) nous permet d'obtenir un ordre de grandeur des constantes de diffusion (à 2D ici) compte tenu de la taille du volume de détection (300 nm) : en considérant qu'une protéine explore cette zone en 0.2 à 2 secondes, on peut estimer que les constantes de diffusion sont de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-2} µm^2/s, ce qui est en bon accord avec d'autres expériences réalisées sur ce type de récepteurs [Tardin et al., 2003, Groc et al., 2004].

Ces premiers résultats étant encourageants, nous projetons de poursuivre cette étude en marquant des synapses en fluorescence au moyen de protéines fluorescentes spécifiques (Homer1c-GFP). Une image confocale de la fluorescence nous donnera avec une grande précision la position de ces synapses et nous permettra d'effectuer une analyse différentielle entre les temps caractéristiques de fluctuation du signal LISNA à l'intérieur et à l'extérieur des synapses. On devrait également accéder ainsi à une mesure du temps de résidence des récepteurs dans la zone synaptique.

V.6 Conclusion du Chapitre V

Nous avons vu dans ce Chapitre une nouvelle technique dérivée de la méthode LISNA fondée sur l'étude des corrélations de signal photothermique lors du passage de nanoparticules d'or à travers le volume de détection. Cette méthode analogue à la FCS permet de

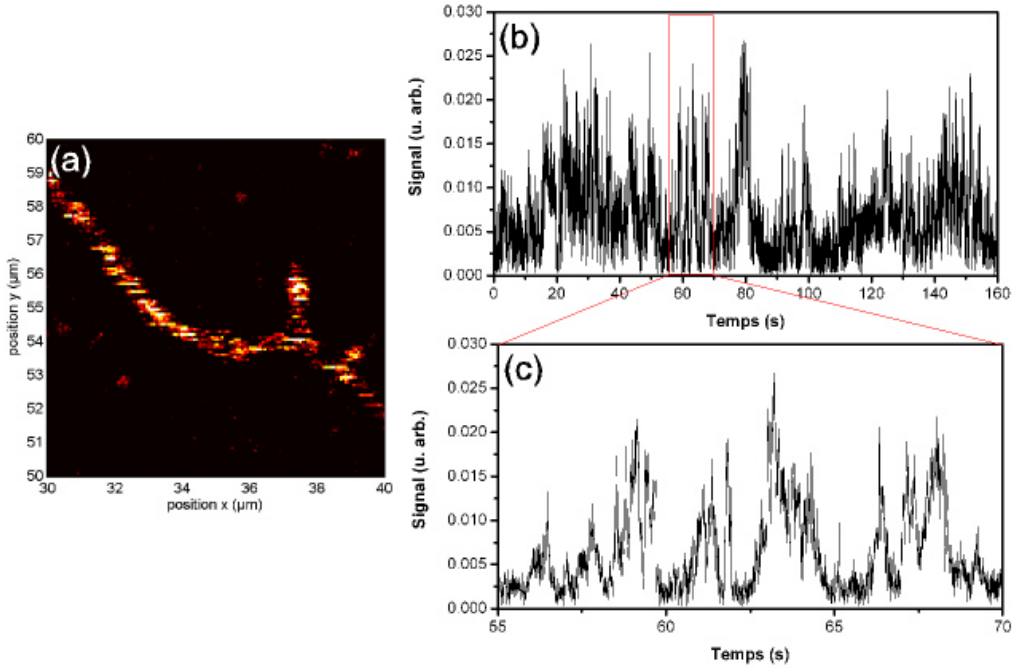

FIG. V.10 : (a) Image LISNA d'une portion de neurone dont les récepteurs GluR2 sont marqués au moyen de fragments Fab'2 d'anticorps couplés à des nanoparticules d'or de 5 nm. (b-c) Fluctuations de signal mesurées en un point du neurone.

mesurer des temps caractéristiques de diffusion sur une large gamme et en particulier aux temps longs car elle ne souffre pas de phénomènes de photoblanchiment. Nous avons montré également qu'elle pouvait servir à mesurer le rayon hydrodynamique de nanoparticules couplées à des protéines avec une grande précision, y compris en milieu fortement diffusant. Nous avons enfin vu plusieurs applications à court terme, que ce soit pour l'étude de dynamiques d'agrégation en biochimie ou des mesures de constantes de diffusion membranaire de récepteurs postsynaptiques sur des neurones vivants.

Conclusion et perspectives

Bilan des travaux présentés

Les travaux présentés dans cette thèse démontrent l'intérêt des méthodes optiques de détection de nano-objets individuels fluorescents ou absorbants. Appliquées à de nombreux domaines de la biologie *in vitro* mais aussi *in vivo*, elles devraient permettent de répondre à des questions fondamentales à l'échelle d'une molécule.

Après avoir passé en revue différentes techniques de microscopie aujourd'hui largement répandues, et en particulier les méthodes de détection de fluorophores individuels, nous avons présenté une nouvelle technique d'imagerie optique en champ lointain : l'imagerie photothermique, appelée ici LISNA. Cette méthode très prometteuse permet une détection sur fond noir de l'absorption d'un nano-objet. Son principe repose sur la détection hétérodyne du champ diffusé par le gradient d'indice au voisinage d'un nano-objet individuel absorbant. Le montage expérimental utilise la combinaison d'un faisceau excitateur modulé, fortement absorbé, et d'un faisceau sonde peu absorbé. Le signal photothermique détecté correspond à la composante, détectée à la fréquence de modulation, du battement entre le champ diffusé par le gradient d'indice photo-induit et le champ sonde. Nous avons montré que cette technique permettait d'imager des nanoparticules d'or de quelques nanomètres de diamètre. Nous avons également calculé le signal photothermique à partir de l'expression du champ diffusé par le gradient d'indice et vérifié expérimentalement sa dépendance vis-à-vis de différents paramètres. Nous avons par ailleurs évalué le profil d'élévation de température autour d'une nanoparticule absorbante. Enfin, nous avons vu plusieurs applications de cette technique pour des études de biochimie *in vitro* telles que la lecture de puces à ADN.

Pour suivre des nanoparticules d'or individuelles couplées à des protéines membranaires sur des cellules *vivantes*, nous avons développé et caractérisé une technique de triangulation à l'échelle nanométrique, basée sur la détection photothermique. Elle a ensuite été testée sur un système biologique modèle constitué de cellules COS-7 transfectées afin de présenter sur leur membrane des récepteurs postsynaptiques. La comparaison entre les résultats obtenus par cette méthode et le suivi de fluorophores individuels ont permis de valider la technique SNaPT. Nous nous sommes également assuré qu'elle était bien non invasive pour les échantillons cellulaires observés. Enfin, nous avons montré qu'il était possible de suivre des récepteurs postsynaptiques natifs sur des neurones vivants pendant plusieurs minutes au moyen de très petits marqueurs (nanoparticules d'or de 5 nm de diamètre), ouvrant ainsi la voie à des études

plus détaillées des caractéristiques de diffusion membranaire de ces protéines telles que leur temps de résidence dans la fente synaptique .

Parallèlement aux études de détection de molécule unique, nous avons étudié le signal spécifique LISNA issu des mitochondries dans les cellules. Nous avons montré en particulier qu'il permet d'imager avec une grande résolution les mitochondries et d'observer par exemple leur changement de morphologie sous l'effet de drogues comme le CCCP. Enfin, nous avons montré que lors du relargage du cytochrome c pendant l'apoptose, le signal LISNA des mitochondries demeure très net. Ceci nous a conduit à penser que contrairement à ce qui est généralement admis dans la littérature, l'absorption dans le visible au niveau de ces organelles n'était pas due en majorité à la présence de cytochrome c.

Enfin, nous avons présenté dans cette thèse une autre application de la technique LISNA. La Spectroscopie de Corrélation d'Absorption est l'analogue des méthodes utilisant la fluorescence (FCS) dans lesquelles les fluctuations du signal issu du petit volume de détection sont analysées de manière à en déduire les caractéristiques de diffusion des objets étudiés. Nous avons tout d'abord validé cette méthode en étudiant un système modèle constitué de nanoparticules d'or de diamètres différents diffusant librement dans des solutions visqueuses et montré que les données expérimentales s'accordaient parfaitement avec un modèle adapté de la théorie de la FCS. Nous avons ensuite montré qu'elle permettait de mesurer le rayon hydrodynamique de nanoparticules couplées à des protéines avec une précision nanométrique, y compris en milieu fortement diffusant.

Quelques perspectives

Nous avons tout au long de ce manuscrit proposé de nombreuses perspectives concernant les différentes techniques développées.

La première concerne l'utilisation de le microscopie de fluorescence afin de sonder un écoulement au voisinage d'une paroi. En excitant des molécules individuelles sous onde évanescente, nous devrions pouvoir mesurer le profil de vitesse à des distances à la paroi inférieures à 100 nm. Nous aurons ainsi accès à des informations très précises sur les conditions aux limites de l'écoulement et en particulier sur l'existence ou non d'un glissement. Nous projetons d'ailleurs de réaliser cette expérience pour différents fluides, simples ou complexes, et des parois aux propriétés de surface différentes (hydrophiles ou hydrophobes par exemple).

Nous avons ensuite envisagé l'utilisation de l'imagerie photothermique pour des études de biochimie *in vitro*. Le principal travail en cours concerne une collaboration avec plusieurs équipes de biologistes et de chimistes afin d'étudier la stœchiométrie du complexe FGFR :FGF :HS à l'échelle de la molécule individuelle. Il s'agit alors d'étudier la dimérisation des récepteurs de facteurs de croissance fibroblastiques (FGFRs) couplés à des nanoparticules d'or individuelles en présence de ce facteur de croissance (FGF) et de sucres (HS).

Concernant la technique SNaPT, plusieurs améliorations possibles ont été proposées afin de gagner en rapidité d'acquisition. L'autre principal enjeu est de réduire la taille du ligand

entre la nanoparticule d'or et la protéine d'intérêt en utilisant une stratégie de couplage mieux contrôlée au moyen de petits peptides dont une faible proportion est fonctionnalisée. Ceci devrait permettre d'envisager à court terme l'utilisation de cette technique pour mesurer le temps de résidence et les propriétés de diffusion des récepteurs du glutamate dans la fente synaptique.

L'ACS quant à elle devrait elle aussi être appliquée très rapidement à l'étude de la dynamique des récepteurs postsynaptiques. Elle servira également à évaluer systématiquement le rayon hydrodynamique des nanoparticules fonctionnalisées que nous préparerons. Dans un tout autre domaine, elle pourrait en outre être employée pour suivre la formation de complexes de molécules, le couple avidine-biotine constituant en cela un système modèle.

Enfin, rappelons que nous nous sommes attachés au travers de ce travail à développer de nouveaux outils et à en démontrer les capacités. Les applications potentielles de la détection optique de nanoparticules d'or individuelles devraient être très nombreuses et ne sont évidemment pas limitées aux problématiques auxquelles nous nous intéressons. La possibilité de suivre d'aussi petits marqueurs avec une très bonne précision de pointé pendant des temps arbitrairement longs en fait une technique de choix pour des études à l'échelle de la molécule individuelle de la dynamique de moteurs moléculaires ou de protéines, comme le suivi de la progression d'une enzyme sur un brin d'ADN. De même, les possibilité offertes par l'ACS sont vastes. On peut imaginer qu'un grand nombre d'expériences réalisées en FCS pourraient être réalisées avec cette nouvelle technique fondée sur les même principes, avec l'intérêt non négligeable de ne pas être perturbé par les problèmes usuels liés à la fluorescence tels que le photoblanchiment. Elle constitue une alternative potentiellement très intéressante pour étudier des dynamiques lentes.

Annexe A

Profils d'écoulement hydrodynamique entre deux plaques

A.1 Écoulement sans glissement

Considérons dans un premier temps que la condition de non glissement est respectée et calculons le profil de vitesse entre deux plaques infinies et parallèles qui se rapprochent l'une de l'autre, la plaque inférieure étant immobile, placée dans le plan $z = 0$. On se place en symétrie axiale. Notons leur distance relative $h(t) = h_0 + \varepsilon \cos(\omega t)$, leur vitesse relative $V(t)$. Soit η la viscosité du liquide et ρ sa masse volumique, supposées constantes (on envisage ici un fluide newtonien). On note $p(r, z, t)$ la pression hydrostatique (on néglige l'effet de la gravité) et $\mathbf{v}(r, z, t)$ le champ de vitesse. L'étude qui suit est en grande partie issue de [Guyon et al., 1991].

Partant de l'équation de Navier-Stokes :

$$\rho \frac{\partial \mathbf{v}(r,z,t)}{\partial t} + \rho \left(\mathbf{v}(r,z,t) \cdot \nabla\right) \mathbf{v}(r,z,t) = -\nabla p(r,z,t) + \eta \Delta \mathbf{v}(r,z,t) \tag{A.1}$$

où ∇ désigne le gradient et $\Delta = \nabla^2$ le Laplacien. On peut se placer en régime quasi-stationnaire et négliger le premier terme si :

$$\rho \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} \ll \eta \Delta \mathbf{v} \tag{A.2}$$

ce qui, en ordre de grandeur, revient à :

$$N = \frac{\rho e_0^2 f_0}{\eta} \ll 1 \tag{A.3}$$

où $e_0 \approx h_0$ est la distance typique entre les plaques et $f_0 \approx \omega$ est la pulsation caractéristique de variation de l'écoulement. Dans nos expériences, $h_0 \approx 5 \times 10^{-5}$ m, $f_0 \approx 100$ Hz, $\eta \approx 10^{-3}$ Pa.s et $\rho \approx 10^3$ kg/m^3, d'où $N \approx 2.5 \times 10^{-2}$, ce qui nous permet de négliger le terme

instationnaire.

De même, on peut négliger le second terme si le nombre de REYNOLDS $Re = \frac{\rho e_0 v_0}{\eta}$ est faible, ce qui sera le cas dans nos expériences ($v_0 \lesssim 10^{-2}$ m/s). L'équation (A.1) se réduit alors à l'équation dite de STOKES :

$$\nabla p(r,z,t) = \eta \Delta \mathbf{v}(r,z,t) \tag{A.4}$$

Enfin, les plaques étant parallèles entre elles, la vitesse est en première approximation toujours radiale (dans l'approximation quasi-stationnaire) et la pression ne dépend donc pas de z [Guyon et al., 1991].

La conservation de la masse donne :

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = \frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}\left(r\frac{\partial v_r}{\partial r}\right) = 0 \tag{A.5}$$

L'équation (A.4) s'écrit alors simplement :

$$\frac{\partial p}{\partial r} = \eta \frac{\partial^2 v_r}{\partial z^2} \tag{A.6}$$

Par simple intégration sur z, en tenant compte de la vitesse nulle aux parois, on trouve bien un profil de vitesse de type POISEUILLE :

$$v_r(r,z,t) = -\frac{1}{2\eta}\frac{\partial p(r,t)}{\partial r} z\left[(h(t) - z\right] \tag{A.7}$$

Le débit à travers la couronne de rayon r et de hauteur h s'écrit :

$$Q(r,t) = 2\pi r \int_0^{h(t)} v_r(r,z,t)dz \tag{A.8}$$

$$= -\frac{2\pi r}{\eta}\frac{\partial p(r,t)}{\partial r}\frac{h(t)^3}{12} \tag{A.9}$$

La conservation de la masse dans la couronne comprise entre les rayons r et $r + dr$ lorsque $h(t)$ varie donne alors :

$$2\pi r \frac{dh}{dt} = -\frac{dQ}{dr} \tag{A.10}$$

On en déduit :

$$\Delta p = \frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}\left(r\frac{\partial p}{\partial r}\right) = \frac{12\eta}{h^3}\frac{dh}{dt} \tag{A.11}$$

ce qui, après intégration, donne :

$$\frac{\partial p(r,t)}{\partial r} = \frac{6\eta}{h^3}\frac{dh}{dt} r \tag{A.12}$$

Le profil de vitesse s'écrit finalement, en fonction du déplacement de la plaque supérieure :

$$v_r(r,z,t) = -\frac{3}{h^3}\frac{dh}{dt} rz\left[h(t) - z\right] \tag{A.13}$$

A.2 Cas du glissement partiel

Dans le cas d'un glissement partiel aux parois, le profil est légèrement modifié. En notant b longueur de glissement, l'intégration de l'équation (A.6) doit tenir compte de nouvelles conditions aux limites :

$$v_r(r, z=0, t) = b\left.\frac{\partial v_r}{\partial z}\right|_{z=0} \tag{A.14}$$

$$v_r(r, z=h(t), t) = -b\left.\frac{\partial v_r}{\partial z}\right|_{z=h(t)} \tag{A.15}$$

Le profil de vitesse est donc légèrement différent de celui décrit par l'équation (A.7) :

$$v_r(r,z,t) = -\frac{1}{2\eta}\frac{\partial p(r,t)}{\partial r}\left[h(z+b) - z^2\right] \tag{A.16}$$

Le même raisonnement que précédemment conduit alors au profil de vitesse qui s'écrit en fonction du déplacement de la plaque supérieure :

$$v_r(r,z,t) = -\frac{1}{4}\frac{dh}{dt} r\frac{h(z+b) - z^2}{\frac{h^3}{12} + \frac{bh^2}{2}} \tag{A.17}$$

Les deux profils sont généralement très similaires car $b \ll h$. La figure A.1 représente les deux cas pour $b = 0.05h$ (l'effet est donc « exagéré »). Outre le décalage aux parois, la conservation du débit impose une vitesse légèrement plus faible au centre de la cellule dans le cas du glissement.

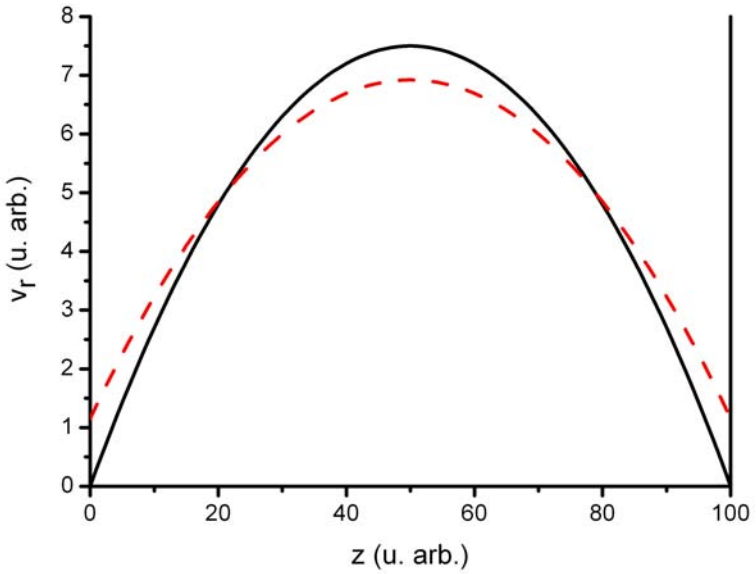

FIG. A.1 : Comparaison des profils de vitesse dans l'hypothèse de non glissement (—) et de glissement partiel aux parois (- -) pour $b = 0.05h$.

Annexe B

Protocoles de biologie et biochimie

B.1 Culture cellulaire : étalement des cellules (2 fois par semaine)

Matériel

- Flacon cellules P_N
- Flacon de culture
- Tube 15 mL
- Trypsine
- Milieu de culture (DMEM)
- Plaque de 12 puits de culture
- Lamelles de microscope
- Micropipette 1 mL
- Pipetboy + pipettes
- Bec-benzen allumé
- Poubelle

Protocole

1. Prélever les ≈ 5 mL de milieu du flacon et les jeter.
2. Rincer le flacon avec 1 mL de Trypsine et vider aussitôt.
3. Remettre 1 mL de Trypsine et laisser agir quelques minutes à 37°C.
4. Pendant ce temps, passer 12 lamelles dans la flamme et les disposer dans les puits.
5. Mettre 10 mL de milieu dans le tube de 15 mL.
6. Vérifier que les cellules se sont bien décrochées du flacon (milieu trouble). Au besoin, tapoter une ou deux fois pour les décrocher.
7. Mettre 5 mL de milieu dans le flacon, mélanger à la pipette.

8. Prélever 1 mL de cette suspension de cellules et l'ajouter aux 10 mL de milieu précédemment préparés.
9. Remettre le flacon P_N dans l'incubateur en notant la modification.
10. Mélanger les 11 mL de suspension. En prélever 5 mL et les mettre dans le flacon, que l'on étiquettera P_{N+1}.
11. Prélever les 6 mL restants et les répartir dans les 12 puits, au besoin en variant les densités.
12. Ajouter environ 0,5 mL de milieu de culture dans chaque puits. Etiqueter la plaque P_{N+1} et la placer dans l'incubateur.

B.2 Transfection de cellules

Matériel

- Plaque de puits de cellules COS (12 h à 24 h depuis étalement)
- 2 Ependorfs 1 mL
- ADN congelé
- FUGENE
- PBS (microfiltré pour éviter des désagréments du type invasion bactérienne)
- Micropipettes 1 µL, 100 µL et 200 µL
- Bec-benzen allumé
- Poubelle

Protocole

1. Pour $2 \times X$ puits, prélever X µg d'ADN (3 µg/µL) et le placer au fond d'un Ependorf. Ajouter $5 \times X$ µL de PBS.
2. Dans le second Ependorf, placer d'abord $50 \times X$ µL de PBS et ajouter $2 \times X$ µL de FUGENE, sans toucher les bords avec la micropipette (le FUGENE non dilué ne doit pas être en contact avec le plastique).
3. Agiter légèrement les 2 tubes et laisser 5 minutes à température ambiante.
4. Verser le contenu du tube 2 FUGENE dans le tube 1 (ADN). Agiter légèrement, faire descendre le liquide en tapotant légèrement. Laisser 15 minutes à température ambiante.
5. Injecter la solution obtenue dans les puits de cellules, si possible de manière à la "déposer" sur les cellules.
6. Attendre 15 à 20 h avant d'incuber.

Pour 6 puits il faut donc :

- 1 µL d'ADN dans 15 µL de PBS ;
- 6 µL de FUGENE dans 150 µL de PBS.

B.3 Couplage des anticorps avec des fluorophores

Les kits de marquages Cy3 ou Cy5 employés (Cy3/Cy5 labelling kit, Amersham Bioscience) sont constitués de fluorophores modifiés pour porter un (et un seul) site NHS-ester (Fig. B.1). Ce site en particulièrement réactif avec le groupement amine NH_2 des protéines. Les anticorps sont donc mis en solution avec les fluorophores, en présence de solutions tampon. Après réaction (environ 30 minutes à température ambiante, sous agitation), on sépare les protéines couplées des fluorophores libres. Pour cela, on dépose la solution au sommet d'une colonne d'exclusion, composée d'un gel qui piège les petites molécules, alors que les grosses descendent rapidement. On voit alors apparaître deux bandes colorés (bleues dans le cas de Cy5), la première étant celle correspondant aux anticorps couplés, la deuxième aux fluorophores libres, qui atteignent successivement le bas de la colonne où l'on peut les récupérer. On évalue enfin le nombre moyen de fluorophores par anticorps (qui peut potentiellement dépasser 1) en étudiant le spectre d'absorption des anticorps couplés (les intensités des pics à des longueurs d'onde bien déterminées donnent les concentrations respectives des protéines et des fluorophores).

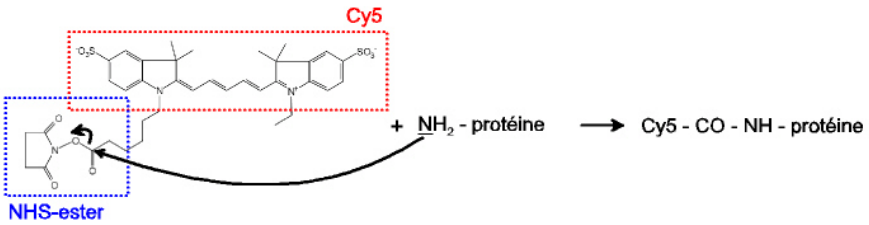

Fig. B.1 : Réaction de couplage d'une protéine avec Cy5 monofonctionnel.

Annexe C

Schéma complet du montage optique

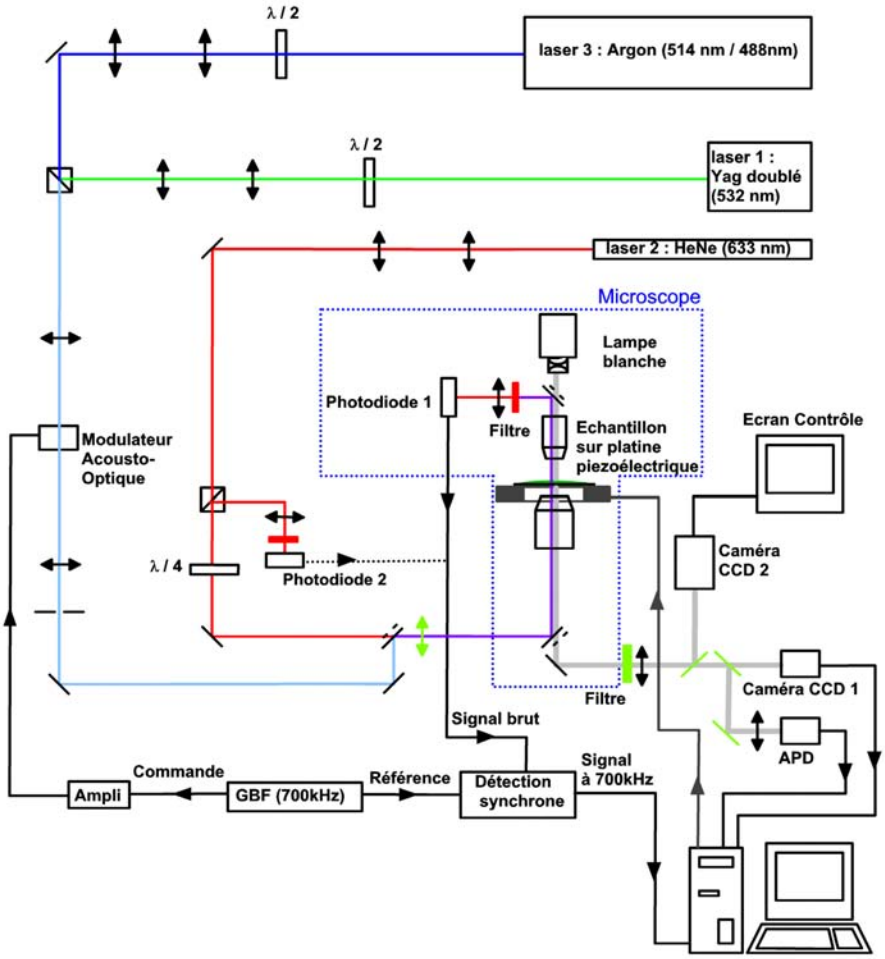

Fig. C.1 : Schéma complet du montage optique . (- -) Éléments montés sur le microscope. En vert clair, les éléments variables ou amovibles (filtres, lentille de défocalisation, déviations du chemin optique). Le montage a été décrit dans le chapitre consacré à la détection photothermique (cf. II.3.2).

Bibliographie

[Agalidis et al., 1999] Agalidis, I., Othman, S., Boussac, A., Reiss-Husson, F., and Desbois, A. (1999). Purification, redox and spectroscopic properties of the tetraheme cytochrome c isolated from rubrivivax gelatinosus. *Eur. J. Biochem.*, 261(1) :325.

[Alexandre et al., 2001] Alexandre, I., Hamels, S., Dufour, S., Collet, J., Zammatteo, N., De Longueville, F., Gala, J. L., and Remacle, J. (2001). Colorimetric silver detection of dna microarrays. *Anal. Biochem.*, 295(1) :1–8.

[Aragon and Pecora, 1976] Aragon, S. R. and Pecora, R. (1976). Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J. Chem. Phys.*, 64(4) :1791–1803.

[Arbouet et al., 2004] Arbouet, A., Christofilos, D., Del Fatti, N., Vallee, F., Huntzinger, J. R., Arnaud, L., Billaud, P., and Broyer, M. (2004). Direct measurement of the single-metal-cluster optical absorption. *Phys. Rev. Lett.*, 93(12) :127401.

[Ausserre and Valignat, 2006] Ausserre, D. and Valignat, M. P. (2006). Wide-field optical imaging of surface nanostructures. *Nano Lett.*, 6(7) :1384–1388.

[Bacia et al., 2006] Bacia, K., Kim, S. A., and Schwille, P. (2006). Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat. Methods*, 3(2) :83.

[Berciaud, 2006] Berciaud, S. (2006). *Détection photothermique et spectroscopie d'absorption de nano-objets individuels : nanoparticules métalliques, nanocristaux semiconducteurs, et nanotubes de carbone.* PhD thesis, Université Bordeaux 1.

[Berciaud et al., 2004] Berciaud, S., Cognet, L., Blab, G., and Lounis, B. (2004). Photothermal heterodyne imaging of individual nonfluorescent nanoclusters and nanocrystals. *Phys. Rev. Lett.*, 93(25) :257402.

[Berciaud et al., 2005a] Berciaud, S., Cognet, L., and Lounis, B. (2005a). Photothermal absorption spectroscopy of individual semiconductor nanocrystals. *Nano Lett.*, 5(11) :2160–3.

[Berciaud et al., 2007] Berciaud, S., Cognet, L., Poulin, P., Weisman, R. B., and Lounis, B. (2007). Absorption spectroscopy of individual single-walled carbon nanotubes. *Nano Lett.*

[Berciaud et al., 2005b] Berciaud, S., Cognet, L., Tamarat, P., and Lounis, B. (2005b). Observation of intinsic size effects in the optical response of individual gold nanoparticles. *Nano Lett.*, 5(3) :515–518.

[Berciaud et al., 2006] Berciaud, S., Lasne, D., Blab, G. A., Cognet, L., and Lounis, B. (2006). Photothermal heterodyne imaging of individual metallic nanoparticles : Theory versus experiment. *Phys. Rev. B*, 73(4) :045424.

[Berne and Pecora, 1976] Berne, B. and Pecora, R. (1976). *Dynamic Light Scattering With Application to Chemistry, Biology, and Physics.* John Wiley & Sons.

[Bernoulli, 1738] Bernoulli, D. (1738). Hydrodynamica, sive de viribus et motibus fluidorum commentarii. *Strasbourg : Joh. Reinholdi Dulseckeri, Argentorati.*

[Bertrand et al., 1994] Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., and Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp. Cell Res.*, 211(2) :314–21.

[Bigot et al., 2000] Bigot, J. Y., Halte, V., Merle, J. C., and Daunois, A. (2000). Electron dynamics in metallic nanoparticles. *Chem. Phys.*, 251(1) :181–203.

[Blab et al., 2006] Blab, G. A., Cognet, L., Berciaud, S., Alexandre, I., Husar, D., Remacle, J., and Lounis, B. (2006). Optical readout of gold nanoparticle-based dna microarrays without silver enhancement. *Biophys. J.*, 90(1) :L13–5.

[Blanpied et al., 2002] Blanpied, T. A., Scott, D. B., and Ehlers, M. D. (2002). Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron*, 36(3) :435–49.

[Bliss and Lomo, 1973] Bliss, T. V. and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, 232(2) :331–56.

[Bloomfield, 2002] Bloomfield, V. (2002). Survey of biomolecular hydrodynamics. *Biophysical Society, Bethesda, MD. http ://www. biophysics. org/btol/separat. html.*

[Bohren and Huffman, 1983] Bohren, C. F. and Huffman, D. R. (1983). Absorption and scattering of light by small particles. *J. Wiley (New York).*

[Borgdorff and Choquet, 2002] Borgdorff, A. J. and Choquet, D. (2002). Regulation of ampa receptor lateral movements. *Nature*, 417(6889) :649–53.

[Born and Wolf, 1959] Born, M. and Wolf, E. (1959). *Principles of Optics.* Pergamon Press, London.

[Boyer et al., 2002] Boyer, D., Tamarat, P., Maali, A., Lounis, B., and Orrit, M. (2002). Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers. *Science*, 297(5584) :1160–1163.

[Bratthauer, 1999] Bratthauer, G. L. (1999). The avidin-biotin complex (abc) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 115 :203.

[Brokmann et al., 2004] Brokmann, X., Coolen, L., Dahan, M., and Hermier, J. P. (2004). Measurement of the radiative and nonradiative decay rates of single cdse nanocrystals through a controlled modification of their spontaneous emission. *Phys. Rev. Lett.*, 93(10) :107403.

[Bruchez et al., 1998] Bruchez, M., J., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., and Alivisatos, A. P. (1998). Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 281(5385) :2013–6.

[Buckman et al., 2001] Buckman, J. F., Hernandez, H., Kress, G. J., Votyakova, T. V., Pal, S., and Reynolds, I. J. (2001). Mitotracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures : influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *J. Neurosci. Method.*, 104(2) :165.

[Burnashev et al., 1995] Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E., and Sakmann, B. (1995). Fractional calcium currents through recombinant glur channels of the nmda, ampa and kainate receptor subtypes. *J. Physiol.*, 485 (Pt 2) :403–18.

[Campbell et al., 2002] Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(12) :7877–82.

[Carroll et al., 2001] Carroll, R. C., Beattie, E. C., von Zastrow, M., and Malenka, R. C. (2001). Role of ampa receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2(5) :315–24.

[Carslaw and Jaeger, 1959] Carslaw, H. and Jaeger, J. (1959). *Conduction of heat in solids.* Oxford University Press, Oxford, 2nd edition.

[Castillo et al., 1997] Castillo, P. E., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. (1997). Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal ca3 neurons. *Nature*, 388(6638) :182–6.

[Cavari and Avi-Dor, 1967] Cavari, B. Z. and Avi-Dor, Y. (1967). Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on respiration and respiration-dependent phosphorylation in escherichia coli. *Biochem. J.*, 103 :601–608.

[Chalfie et al., 1994] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148) :802–5.

[Chan, 1975] Chan, C. H. (1975). Effective absorption for thermal blooming due to aerosols. *Appl. Phys. Lett.*, 26(11) :628–630.

[Chang et al., 2006] Chang, E., Thekkek, N., Yu, W. W., Colvin, V. L., and Drezek, R. (2006). Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake. *Small*, 2(12) :1412–7.

[Charpak et al., 1990] Charpak, S., Gahwiler, B. H., Do, K. Q., and Knopfel, T. (1990). Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters. *Nature*, 347(6295) :765–7.

[Cheezum et al., 2001] Cheezum, M. K., Walker, W. F., and Guilford, W. H. (2001). Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys. J.*, 81(4) :2378–88.

[Choquet and Triller, 2003] Choquet, D. and Triller, A. (2003). The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4(4) :251–65.

[Chu, 1974] Chu, B. (1974). *Laser Light Scattering.* Quantum Electronics. Academic Press, New York.

[Clarkson et al., 1989] Clarkson, A. B., J., Bienen, E. J., Pollakis, G., and Grady, R. W. (1989). Respiration of bloodstream forms of the parasite trypanosoma brucei brucei is dependent on a plant-like alternative oxidase. *J. Biol. Chem.*, 264(30) :17770–17776.

[Cody et al., 1993] Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., and Ward, W. W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry*, 32(5) :1212–8.

[Cognet et al., 2003] Cognet, L., Tardin, C., Boyer, D., Choquet, D., Tamarat, P., and Lounis, B. (2003). Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(20) :11350–11355.

[Collins, 2002] Collins, T. J. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.*, 21(7) :1616–1627.

[Connor et al., 2005] Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., and Wyatt, M. D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1(3) :325–7.

[Coulomb, 1801] Coulomb, C. A. (1801). Mémoires de lŠinstitut national des sciences et des arts : Sciences mathématiques et physiques. volume 3.

[Courty et al., 2006] Courty, S., Luccardini, C., Bellaiche, Y., Cappello, G., and Dahan, M. (2006). Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. *Nano Lett.*, 6(7) :1491–5.

[Coutinho and Knopfel, 2002] Coutinho, V. and Knopfel, T. (2002). Metabotropic glutamate receptors : electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist*, 8(6) :551–61.

[Cull-Candy et al., 2001] Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001). Nmda receptor subunits : diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11(3) :327–35.

[Curtis et al., 1959] Curtis, D. R., Phillis, J. W., and Watkins, J. C. (1959). Chemical excitation of spinal neurones. *Nature*, 183(4661) :611–2.

[Dahan et al., 2003] Dahan, M., Levi, S., Luccardini, C., Rostaing, P., Riveau, B., and Triller, A. (2003). Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science*, 302(5644) :442–445.

[Davis and Shen, 2006] Davis, L. M. and Shen, G. (2006). Accounting for triplet and saturation effects in fcs measurements. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 7(4) :287–301.

[Deschenes and Vanden Bout, 2001] Deschenes, L. A. and Vanden Bout, D. A. (2001). Single-molecule studies of heterogeneous dynamics in polymer melts near the glass transition. *Science*, 292(5515) :255–8.

[Dickson et al., 1996] Dickson, R. M., Norris, D. J., Tzeng, Y. L., and Moerner, W. E. (1996). Three-dimensional imaging of single molecules solvated in pores of poly(acrylamide) gels. *Science*, 274(5289) :966.

[DiDonato and Brasaemle, 2003] DiDonato, D. and Brasaemle, D. L. (2003). Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 51(6) :773–780.

[Digman et al., 2005] Digman, M. A., Sengupta, P., Wiseman, P. W., Brown, C. M., Horwitz, A. R., and Gratton, E. (2005). Fluctuation correlation spectroscopy with a laser-scanning microscope : exploiting the hidden time structure. *Biophys. J.*, 88(5) :L33–6.

[Dingledine et al., 1999] Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.*, 51(1) :7–61.

[Dittrich and Schwille, 2001] Dittrich, P. S. and Schwille, P. (2001). Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation. *Appl. Phys. B*, 73(8) :829.

[Dix et al., 2006] Dix, J. A., Hom, E. F., and Verkman, A. S. (2006). Fluorescence correlation spectroscopy simulations of photophysical phenomena and molecular interactions : a molecular dynamics/monte carlo approach. *J. Phys. Chem. B*, 110(4) :1896–906.

[Dubertret et al., 2002] Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D. J., Noireaux, V., Brivanlou, A. H., and Libchaber, A. (2002). In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, 298(5599) :1759–62.

[Duchen et al., 2003] Duchen, M. R., Surin, A., and Jacobson, J. (2003). Imaging mitochondrial function in intact cells. *Method. Enzymol.*, 361 :353.

[Duchesne et al., 2006] Duchesne, L., Tissot, B., Rudd, T. R., Dell, A., and Fernig, D. G. (2006). N-glycosylation of fibroblast growth factor receptor 1 regulates ligand and heparan sulfate co-receptor binding. *J. Biol. Chem.*, 281(37) :27178–89.

[Efros et al., 1996] Efros, A. L., Rosen, M., Kuno, M., Nirmal, M., Norris, D. J., and Bawendi, M. (1996). Band-edge exciton in quantum dots of semiconductors with a degenerate valence band : Dark and bright exciton states. *Phys. Rev. B*, 54(7) :4843–4856.

[Elson and Magde, 1974] Elson, E. L. and Magde, D. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. i. conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13(1) :1.

[Enderlein, 2000] Enderlein, J. (2000). Tracking of fluorescent molecules diffusing within membranes. *Appl. Phys. B*, 71(5) :773–777.

[Enderlein et al., 2005] Enderlein, J., Gregor, I., Patra, D., Dertinger, T., and Kaupp, U. B. (2005). Performance of fluorescence correlation spectroscopy for measuring diffusion and concentration. *ChemPhysChem*, 6(11) :2324–36.

[Feynman, 1960] Feynman, R. P. (1960). ThereŠs plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, 23(5) :22–36.

[Fluckiger et al., 1985] Fluckiger, D. U., Lin, H. B., and Marlow, W. H. (1985). Composition measurement of aerosols of submicrometer particles by phase fluctuation absorption spectroscopy. *Appl. Opt.*, 24(11) :1668–1681.

[Foster et al., 2006] Foster, K. A., Galeffi, F., Gerich, F. J., Turner, D. A., and Muller, M. (2006). Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.*, 79(3) :136.

[Fritzsche and Taton, 2003] Fritzsche, W. and Taton, T. A. (2003). Metal nanoparticles as labels for heterogeneous, chip-based dna detection. *Nanotechnology*, 14(12) :R63–R73.

[Gao et al., 2001] Gao, W., Pu, Y., Luo, K. Q., and Chang, D. C. (2001). Temporal relationship between cytochrome c release and mitochondrial swelling during uv-induced apoptosis in living hela cells. *J. Cell Sci.*, 114(15) :2855–2862.

[Gelles et al., 1988] Gelles, J., Schnapp, B. J., and Sheetz, M. P. (1988). Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature*, 331(6155) :450.

[Girard, 1815] Girard, P. S. (1815). Mémoires de la classe des sciences mathématiques et physiques de lŠinstitut de france. volume 14, page 329.

[Gledhill and Walker, 2005] Gledhill, J. R. and Walker, J. E. (2005). Inhibition in f1-atpase from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.*, 386(3) :591.

[Goldsby and Heytler, 1963] Goldsby, R. A. and Heytler, P. G. (1963). Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones. ii. effects of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on mitochondrial respiration. *Biochemistry*, 2 :1142–7.

[Gordon et al., 1965] Gordon, J. P., Leite, R. C. C., Moore, R. S., Porto, S. P. S., and Whinnery, J. R. (1965). Long-transient effects in lasers with inserted liquid samples. *J. Appl. Phys.*, 36(1) :3–8.

[Green, 1990] Green, N. M. (1990). Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol*, 184 :51–67.

[Groc et al., 2004] Groc, L., Heine, M., Cognet, L., Brickley, K., Stephenson, F. A., Lounis, B., and Choquet, D. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of ampa and nmda receptors. *Nat. Neurosci.*, 7(7) :695–696.

[Guyon et al., 1991] Guyon, E., Hulin, J. P., and Petit, L. (1991). *Hydrodynamique physique*. InterEditions ; Editions du CNRS.

[Harada et al., 1999] Harada, Y., Funatsu, T., Murakami, K., Nonoyama, Y., Ishihama, A., and Yanagida, T. (1999). Single-molecule imaging of rna polymerase-dna interactions in real time. *Biophys. J.*, 76(2) :709.

[Harada et al., 1990] Harada, Y., Sakurada, K., Aoki, T., Thomas, D. D., and Yanagida, T. (1990). Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay. *J. Mol. Biol.*, 216(1) :49.

[Harms et al., 2001] Harms, G., Cognet, L., Lommerse, P., Blab, G., Kahr, H., Gamsjager, R., Spaink, H., Soldatov, N., Romanin, C., and Schmidt, T. (2001). Single-molecule imaging of l-type ca2+ channels in live cells. *Biophys. J.*, 81(5) :2639–46.

[Harris, 1999] Harris, K. M. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9(3) :343–8.

[Harris et al., 1997] Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., and McPherson, A. (1997). Refined structure of an intact igg2a monoclonal antibody. *Biochemistry*, 36(7) :1581–97.

[Hebb, 1949] Hebb, D. O. (1949). *The Organization of Behavior : A Neuropsychological Theory.* Wiley, New York.

[Hellriegel et al., 2004] Hellriegel, C., Kirstein, J., Bra ?uchle, C., Latour, V., Pigot, T., Olivier, R., Lacombe, S., Brown, R., Guieu, V., Payrastre, C., Izquierdo, A., and Mocho, P. (2004). Diffusion of single streptocyanine molecules in the nanoporous network of sol-gel glasses. *J. Phys. Chem. B*, 108(38) :14699.

[Heytler, 1963] Heytler, P. G. (1963). Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones. i. some characteristics of m-ci-ccp action on mitochondria and chloroplasts. *Biochemistry*, 2(2) :357–361.

[Hopfield, 1982] Hopfield, J. J. (1982). Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79(8) :2554–8.

[Hoppel and Cooper, 1968] Hoppel, C. and Cooper, C. (1968). The action of digitonin on rat liver mitochondria. the effects on enzyme content. *Biochem. J.*, 107(3) :367–75.

[Huang et al., 2006] Huang, P., Guasto, J. S., and Breuer, K. S. (2006). Direct measurement of slip velocities using three-dimensional total internal reflection velocimetry. *J. Fluid Mech.*, 566 :447–464.

[Hussain et al., 2005] Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., and Schlager, J. J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in brl 3a rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*, 19(7) :975–83.

[Ignatovich and Novotny, 2006] Ignatovich, F. V. and Novotny, L. (2006). Real-time and background-free detection of nanoscale particles. *Phys. Rev. Lett.*, 96(1).

[Inouye and Tsuji, 1994] Inouye, S. and Tsuji, F. I. (1994). Aequorea green fluorescent protein. expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.*, 341(2-3) :277–80.

[Jackson, 1998] Jackson, J. (1998). *Classical Electrodynamics.* Wiley, New-York, 3rd edition.

[Jacobsen et al., 2006] Jacobsen, V., Stoller, P., Brunner, C., Vogel, V., and Sandoghdar, V. (2006). Interferometric optical detection and tracking of very small gold nanoparticles at a water-glass interface. *Opt. Express*, 14(1) :405.

[Jakobs, 2006] Jakobs, S. (2006). High resolution imaging of live mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(5-6) :561.

[Jin et al., 2004] Jin, S., Huang, P., Park, J., Yoo, J. Y., and Breuer, K. S. (2004). Near-surface velocimetry using evanescent wave illumination. *Exp. Fluid.*, 37(6) :825–833.

[Kabata et al., 2000] Kabata, H., Okada, W., and Washizu, M. (2000). Single-molecule dynamics of the eco ri enzyme using stretched dna : Its application to in situ sliding assay and optical dna mapping. *Jap. J. Appl. Phys.*, 39(12 B) :7164.

[Klimov et al., 2000] Klimov, V., Mikhailovsky, A. A., McBranch, D. W., Leatherdale, C. A., and Bawendi, M. G. (2000). Quantization of multiparticle auger rates in semiconductor quantum dots. *Science*, 287(5455) :1011–3.

[Krebs and Johnson, 1937] Krebs, H. A. and Johnson, W. A. (1937). Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochem. J.*, 31(4) :645–60.

[Kroemer, 1998] Kroemer, G. (1998). The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.*, 5(6) :547.

[Krohn et al., 1999] Krohn, A. J., Wahlbrink, T., and Prehn, J. H. M. (1999). Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. *J. Neurosci.*, 19(17) :7394.

[Kuno et al., 2000] Kuno, M., Fromm, D., Hamann, H., Gallagher, A., and Nesbitt, D. (2000). Nonexponential "blinking" kinetics of single cdse quantum dots : A universal power law behavior. *J. Chem. Phys.*, 112(7) :3117–3120.

[Kusumi and Sako, 1996] Kusumi, A. and Sako, Y. (1996). Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8(4) :566–574.

[Lapotko et al., 2002] Lapotko, D. O., Romanovskaya, T. R., Shnip, A., and Zharov, V. P. (2002). Photothermal time-resolved imaging of living cells. *Lasers Surg. Med.*, 31(1) :53–63.

[Lastovka, 1967] Lastovka, J. (1967). *Light mixing spectroscopy and the spectrum of light scattered by thermal fluctuations in liquids.* PhD thesis, MIT.

[Lata et al., 2005] Lata, S., Reichel, A., Brock, R., Tampe, R., and Piehler, J. (2005). High-affinity adaptors for switchable recognition of histidine-tagged proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(29) :10205–10215.

[Lauga et al., 2005] Lauga, E., Brenner, M. P., and Stone, H. A. (2005). Microfluidics : The no-slip boundary condition. *Arxiv preprint cond-mat/0501557*.

[Le Gac et al., 2006] Le Gac, S., Vermes, I., and Van Den Berg, A. (2006). Quantum dots based probes conjugated to annexin v for photostable apoptosis detection and imaging. *Nano Lett.*, 6(9) :1863.

[Leite et al., 1964] Leite, R. C. C., Moore, R. S., and Whinnery, J. R. (1964). Low absorption measurements by means of the thermal lens effect using an he [single bond] ne laser. *Appl. Phys. Lett.*, 5(7) :141–143.

[Li et al., 2004] Li, H., Ren, X., Ying, L., Balasubramanian, S., and Klenerman, D. (2004). Measuring single-molecule nucleic acid dynamics in solution by two-color filtered ratiometric fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(40) :14425–30.

[Ligon and Steward, 2000] Ligon, L. A. and Steward, O. (2000). Movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J. Comp. Neurol.*, 427(3) :340–50.

[Lindfors et al., 2004] Lindfors, K., Kalkbrenner, T., Stoller, P., and Sandoghdar, V. (2004). Detection and spectroscopy of gold nanoparticles using supercontinuum white light confocal microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 93(3) :037401.

[Link and El Sayed, 1999] Link, S. and El Sayed, M. (1999). Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *J. Phys. Chem. B*, 103 :8410.

[Link and El-Sayed, 2003] Link, S. and El-Sayed, M. A. (2003). Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 54 :331–66.

[Liu, 2003] Liu, G. (2003). Presynaptic control of quantal size : kinetic mechanisms and implications for synaptic transmission and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 13(3) :324–31.

[Liu et al., 1996] Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts : Requirement for datp and cytochrome c. *Cell*, 86(1) :147.

[Livnah et al., 1993] Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M., and Sussman, J. L. (1993). Three-dimensional structures of avidin and the avidinbiotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(11) :5076–5080.

[Lounis et al., 2000] Lounis, B., Bechtel, H., Gerion, D., Alivisatos, A. P., and Moerner, W. E. (2000). Photon antibunching in single cdse/zns quantum dot fluorescence. *Chem. Phys. Lett.*, 329 :399.

[Lounis et al., 2001] Lounis, B., Deich, J., Rosell, F., S.G., B., and Moerner, W. (2001). Photophysics of dsred, a red fluorescent protein, from the ensemble to the single-molecule level. *J. Phys. Chem. B*, 105(21) :5048 –5054.

[Lowe et al., 1993] Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., and Jacks, T. (1993). p 53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362(6423) :847–849.

[Lévy et al., 2004] Lévy, R., Thanh, N. T., Doty, R. C., Hussain, I., Nichols, R. J., Schiffrin, D. J., Brust, M., and Fernig, D. G. (2004). Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(32) :10076–84.

[Lévy et al., 2006] Lévy, R., Wang, Z., Duchesne, L., Doty, R. C., Cooper, A. I., Brust, M., and Fernig, D. G. (2006). A generic approach to monofunctionalized protein-like gold nanoparticles based on immobilized metal ion affinity chromatography. *ChemBioChem*, 7(4) :592–594.

[Macho et al., 1996] Macho, A., Decaudin, D., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1996). Chloromethyl-x-rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. *Cytometry*, 25(4) :333.

[Magde et al., 1972] Magde, D., Elson, E., and Webb, W. W. (1972). Thermodynamic fluctuations in a reacting systemŮmeasurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29(11) :705–708.

[Magde et al., 1974] Magde, D., Elson, E. L., and Webb, W. W. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. ii. an experimental realization. *Biopolymers*, 13(1) :29.

[Mann and Whitney, 1947] Mann, H. B. and Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Stat.*, 18(1) :50–60.

[Martinou and Green, 2001] Martinou, J. C. and Green, D. R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2(1) :63–7.

[Matz et al., 1999] Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoa species. *Nat. Biotechnol.*, 17 :969–973.

[McBride et al., 2004] McBride, J. R., Kippeny, T. C., Pennycook, S. J., and Rosenthal, S. J. (2004). Aberration-corrected z-contrast scanning transmission electron microscopy of cdse nanocrystals. *Nano Lett.*, 4(7) :1279.

[McCulloch and Pitts, 1943] McCulloch, W. S. and Pitts, W. (1943). A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bull. Math. Biol.*, 5(4) :115–133.

[McGee and Bredt, 2003] McGee, A. W. and Bredt, D. S. (2003). Assembly and plasticity of the glutamatergic postsynaptic specialization. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 13(1) :111–8.

[Meier et al., 2001] Meier, J., Vannier, C., Serge, A., Triller, A., and Choquet, D. (2001). Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat. Neurosci.*, 4(3) :253–60.

[Michalet et al., 2005] Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., and Weiss, S. (2005). Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 307(5709) :538–544.

[Michler et al., 2000] Michler, P., Imamoglu, A., Mason, M. D., Carson, P. J., Strouse, G. F., and Buratto, S. K. (2000). Quantum correlation among photons from a single quantum dot at room temperature. *Nature*, 406(6799) :968–70.

[Mie, 1908] Mie, G. (1908). Considerations on the optic of turbid media, especially colloidal metal sols. *Ann. Phys.*, 25 :377Ű442.

[Minamikawa et al., 1999a] Minamikawa, T., Sriratana, A., Williams, D. A., Bowser, D. N., Hill, J. S., and Nagley, P. (1999a). Chloromethyl-x-rosamine (mitotracker red) photosensitises mitochondria and induces apoptosis in intact human cells. *J. Cell Sci.*, 112(14) :2419–2430.

[Minamikawa et al., 1999b] Minamikawa, T., Williams, D. A., Bowser, D. N., and Nagley, P. (1999b). Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells. *Exp. Cell Res.*, 246(1) :26–37.

[Nakanishi, 1994] Nakanishi, S. (1994). Metabotropic glutamate receptors : synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron*, 13(5) :1031–7.

[Navier, 1823] Navier, C. L. M. (1823). Sur les lois du mouvement des fluides. *Mem. Acad. R. Sci. France*, 6 :389Ű440.

[Neto et al., 2005] Neto, C., Evans, D. R., Bonaccurso, E., Butt, H. J., and Craig, V. S. J. (2005). Boundary slip in newtonian liquids : A review of experimental studies. *Rep. Prog. Phys.*, 68(12) :2859.

[Nirmal et al., 1996] Nirmal, M., Dabbousi, B., Bawendi, M., Macklin, J., Trautman, J., Harris, T., and Brus, L. (1996). Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. *Nature*, 383 :802–804.

[Orrit and Bernard, 1990] Orrit, M. and Bernard, J. (1990). Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal. *Phys. Rev. Lett.*, 65(21) :2716–2719.

[Passafaro et al., 2001] Passafaro, M., Piech, V., and Sheng, M. (2001). Subunit-specific temporal and spatial patterns of ampa receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.*, 4(9) :917–26.

[Perkins et al., 1994] Perkins, T. T., Quake, S. R., Smith, D. E., and Chu, S. (1994). Relaxation of a single dna molecule observed by optical microscopy. *Science*, 264(5160) :822–6.

[Pfrieger, 2002] Pfrieger, F. W. (2002). Role of glia in synapse development. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12 :486–490.

[Pluen et al., 1999] Pluen, A., Netti, P. A., Jain, R. K., and Berk, D. A. (1999). Diffusion of macromolecules in agarose gels : comparison of linear and globular configurations. *Biophys. J.*, 77(1) :542–52.

[Prasher et al., 1992] Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2) :229–33.

[Racz et al., 2004] Racz, B., Blanpied, T. A., Ehlers, M. D., and Weinberg, R. J. (2004). Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. *Nat. Neurosci.*, 7(9) :917–8.

[Raghavachari et al., 2003] Raghavachari, N., Bao, Y. P., Li, G., Xie, X., and Muller, U. R. (2003). Reduction of autofluorescence on dna microarrays and slide surfaces by treatment with sodium borohydride. *Anal. Biochem.*, 312(2) :101.

[Represa et al., 1987] Represa, A., Tremblay, E., and Ben-Ari, Y. (1987). Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers : localization and plasticity. *Neuroscience*, 20(3) :739–48.

[Ries and Schwille, 2006] Ries, J. and Schwille, P. (2006). Studying slow membrane dynamics with continuous wave scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 91(5) :1915.

[Rigler et al., 1993] Rigler, R., Mets, ., Widengren, J., and Kask, P. (1993). Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background : analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.*, 22(3) :169–175.

[Ritchie et al., 2005] Ritchie, K., Shan, X. Y., Kondo, J., Iwasawa, K., Fujiwara, T., and Kusumi, A. (2005). Detection of non-brownian diffusion in the cell membrane in single molecule tracking. *Biophys. J.*, 88(3) :2266–77.

[Rizzuto et al., 1995] Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M., and Pozzan, T. (1995). Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr. Biol.*, 5(6) :635.

[Rosenblatt, 1958] Rosenblatt, F. (1958). The perceptron : a probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychol. Rev.*, 65(6) :386–408.

[Rosenmund et al., 1998] Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., and Stevens, C. F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science*, 280(5369) :1596–9.

[Saxton and Jacobson, 1997] Saxton, M. and Jacobson, K. (1997). Single-particle tracking : applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26 :373–399.

[Schena et al., 1995] Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray. *Science*, 270(5235) :467.

[Schmidt et al., 1995] Schmidt, T., Schuetz, G., Baumgartner, W., Gruber, H., and Schindler, H. (1995). Characterization of photophysics and mobility of single molecules in a fluid lipid membrane. *J. Phys. Chem.*, 99 :17662–17668.

[Schmidt et al., 1996] Schmidt, T., Schuetz, G., Baumgartner, W., Gruber, H., and Schindler, H. (1996). Imaging of single molecule diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(7)(7) :2926–2929.

[Schuetz et al., 1997] Schuetz, G., Schindler, H., and Schmidt, T. (1997). Imaging single-molecule dichroism. *Opt. Lett.*, 22(9) :651–653.

[Schultz et al., 2000] Schultz, S., Smith, D., Mock, J., and Schultz, D. (2000). Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(3) :996–1001.

[Schutz et al., 2000] Schutz, G., Kada, G., Pastushenko, V., and Schindler, H. (2000). Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J*, 19(5) :892–901.

[Schwille et al., 1999] Schwille, P., Haupts, U., Maiti, S., and Webb, W. (1999). Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys. J.*, 77(4) :2251–2265.

[Schwille and Haustein, 2004] Schwille, P. and Haustein, H. (2004). Fluorescence correlation spectroscopy - an introduction to its concepts and applications. *Biophysics Textbook Online.*

[Schwille et al., 1996] Schwille, P., Oehlenschlager, F., and Walter, N. G. (1996). Quantitative hybridization kinetics of dna probes to rna in solution followed by diffusional fluorescence correlation analysis. *Biochemistry*, 35(31) :10182–10193.

[Scorrano et al., 1999] Scorrano, L., Petronilli, V., Colonna, R., Di Lisa, F., and Bernardi, P. (1999). Chloromethyltetramethylrosamine (mitotracker orange ?) induces the mitochondrial permeability transition and inhibits respiratory complex i : Implications for the mechanism of cytochrome c release. *J. Biol. Chem.*, 274(35) :24657.

[Sekine-Aizawa and Huganir, 2004] Sekine-Aizawa, Y. and Huganir, R. L. (2004). Imaging of receptor trafficking by using alpha-bungarotoxin-binding-site-tagged receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(49) :17114–9.

[Sergé et al., 2002] Sergé, A., Fourgeaud, L., Hémar, A., and Choquet, D. (2002). Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J. Neurosci.*, 22(10) :3910–20.

[Sheetz et al., 1989] Sheetz, M. P., Turney, S., Qian, H., and Elson, E. L. (1989). Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not drive membrane glycoprotein movements. *Nature*, 340(6231) :284–8.

[Shimomura et al., 1962] Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *J. Cell Comp. Physiol.*, 59 :223–39.

[Sick and Perez-Pinzon, 1999] Sick, T. J. and Perez-Pinzon, M. A. (1999). Optical methods for probing mitochondrial function in brain slices. *Methods*, 18(2) :104.

[Singer and Nicolson, 1972] Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(23) :720–31.

[Sonnichsen, 2001] Sonnichsen, C. (2001). *Plasmons in metal nanostructures.* PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universtat Munchen.

[Sonnichsen et al., 2005] Sonnichsen, C., Reinhard, B. M., Liphardt, J., and Alivisatos, A. P. (2005). A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nat. Biotechnol.*, 23(6) :741–5.

[Stephens and Allan, 2003] Stephens, D. J. and Allan, V. J. (2003). Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science*, 300(5616) :82–86.

[Stock et al., 1999] Stock, D., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in atp synthase. *Science*, 286(5445) :1700–5.

[Stone, 1972] Stone, J. (1972). Measurements of the absorption of light in low-loss liquids. *J. Opt. Soc. Am.*, 62(3) :327Ũ333.

[Storhoff et al., 2004] Storhoff, J. J., Marla, S. S., Bao, P., Hagenow, S., Mehta, H., Lucas, A., Garimella, V., Patno, T., Buckingham, W., Cork, W., and Muller, U. R. (2004). Gold nanoparticle-based detection of genomic dna targets on microarrays using a novel optical detection system. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(8) :875.

[Tamaki et al., 2002] Tamaki, E., Sato, K., Tokeshi, M., Sato, K., Aihara, M., and Kitamori, T. (2002). Single-cell analysis by a scanning thermal lens microscope with a microchip : direct monitoring of cytochrome c distribution during apoptosis process. *Anal. Chem.*, 74(7) :1560–4.

[Tardin et al., 2003] Tardin, C., Cognet, L., Bats, C., Lounis, B., and Choquet, D. (2003). Direct imaging of lateral movements of ampa receptors inside synapses. *EMBO J.*, 22(18) :4656–4665.

[Taton et al., 2000] Taton, T. A., Mirkin, C. A., and Letsinger, R. L. (2000). Scanometric dna array detection with nanoparticle probes. *Science*, 289(5485) :1757–60.

[Thompson et al., 2002] Thompson, R. E., Larson, D. R., and Webb, W. W. (2002). Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.*, 82 http ://www.biophysj.org/cgi/content/abstract/82/5/2775(5) :2775–2783.

[Tsay et al., 2006] Tsay, J. M., Doose, S., and Weiss, S. (2006). Rotational and translational diffusion of peptide-coated cdse/cds/zns nanorods studied by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc*, 128(5) :1639–1647.

[Tsien, 1998] Tsien, R. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67 :509–544.

[Ueda et al., 2001] Ueda, M., Sako, Y., Tanaka, T., Devreotes, P., and Yanagida, T. (2001). Single-molecule analysis of chemotactic signaling in dictyostelium cells. *Science*, 294(5543) :864–7.

[Van Dijk et al., 2006] Van Dijk, M. A., Tchebotareva, A. L., Orrit, M., Lippitz, M., Berciaud, S., Lasne, D., Cognet, L., and Lounis, B. (2006). Absorption and scattering microscopy of single metal nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8(30) :3486.

[Vercesi et al., 1991] Vercesi, A. E., Bernardes, C. F., Hoffmann, M. E., Gadelha, F. R., and Docampo, R. (1991). Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of trypanosoma cruzi in situ. *J. Biol. Chem.*, 266(22) :14431–14434.

[Voisin et al., 2000] Voisin, C., Christofilos, D., Del Fatti, N., Vallée, F., Prével, B., Cottancin, E., Lermé, J., Pellarin, M., and Broyer, M. (2000). Size-dependent electron-electron interactions in metal nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.*, 85(10) :2200–2203.

[Wang et al., 2006] Wang, Z., Shah, J. V., Berns, M. W., and Cleveland, D. W. (2006). In vivo quantitative studies of dynamic intracellular processes using fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 91(1) :343.

[Wawrezinieck et al., 2005] Wawrezinieck, L., Rigneault, H., Marguet, D., and Lenne, P. F. (2005). Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys. J.*, 89(6) :4029.

[Weitz and Pine, 1993] Weitz, D. A. and Pine, D. J. (1993). Dynamic light scattering.

[Widengren et al., 1995] Widengren, J., Mets, U., and Rigler, R. (1995). Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution : A theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.*, 99(36) :13368.

[Wilchek and Bayer, 1990] Wilchek, M. and Bayer, E. A. (1990). Applications of avidin-biotin technology : Literature survey. *Methods in Enzymology*, 184 :14.

[Wilcoxon, 1945] Wilcoxon, F. (1945). Individual comparisons by ranking methods. *Biomet. Bull.*, 1(6) :80–83.

[Wilson and Sheppard, 1984] Wilson, T. and Sheppard, C. (1984). Theory and practice of scanning optical microscopy academic. *New York*.

[Wu et al., 2003] Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K. N., Treadway, J. A., Larson, J. P., Ge, N., Peale, F., and Bruchez, M. P. (2003). Immunofluorescent labeling of cancer marker her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.*, 21(1) :41–6.

[Yamada, 1999] Yamada, J. (1999). Evanescent wave doppler velocimetry for a wallŠs near field. *Appl. Phys. Lett.*, 75(12) :1805–1806.

[Yguerabide and Yguerabide, 1998] Yguerabide, J. and Yguerabide, E. E. (1998). Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. *Anal. Biochem.*, 262(2) :137–56.

[Yildiz et al., 2003] Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., and Selvin, P. R. (2003). Myosin v walks hand-over-hand : Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 300(5628) :2061–2065.

[Yuste and Konnerth, 2005] Yuste, R. and Konnerth, A. (2005). *Imaging in Neuroscience and Development : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[Zamzami, 1995] Zamzami, N. (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.*, 181(5) :1661–1672.

[Zamzami et al., 1996] Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.*, 183(4) :1533–44.

[Zondervan et al., 2004] Zondervan, R., Kulzer, F., Kol'chenko, M. A., and Orrit, M. (2004). Photobleaching of rhodamine 6g in poly(vinyl alcohol) at the ensemble and single-molecule levels. *J. Phys. Chem. A*, 108(10) :1657.

Index

ACS : Absorption Correlation Spectroscopy, 131
Alexa, 23
AMPA, AMPAR, 109
apoptose, 118
ATP : Adénosine triphosphate, 117
Atto, 33
autofluoescence, 25
axone, 104

blinking, 30

caspase, 118
CCCP : Carbonyl cyanide m-chlorophenyl -hydrazone, 123
cellule gliale, 103
chimère, 25
clignotement, 30
confluence, 91
confocal, 22
COS-7, 90
Cy3, 23
Cy5, 23
cytochrome c, 118
cytotoxicité, 41

dendrite, 104
DIC : Differential Interference Contrast Microscopy, 16
DIV, 98
DLS : Dynamic Light Scattering, 142
DsRed, 24

endocytose, 114
exocytose, 105, 114

FAD : Flavin adenine dinucleotide, flavines, 25
FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy, 131
FGF, facteurs de croissance fibroblastiques, 76
fonction d'autocorrélation, 132
fonction erreur complémentaire, 66
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching, 32

GFP : Green Fluorescent Protein, 24
glissement, 31
GluR, sous-unité, 108
glutamate, 108
glycine, 108

HeLa, 125, 126
HSPG, protéoglycanes à héparane sulfate, 76
hème, 116

intégration, 107
ionotropique, récepteur, 106

KA, sous-unité, 108
Kaïnate, 110

LISNA : Laser Induced Scattering around a NanoAbsorber(= PHI), 46
LTP, Long Term Potentialisation, 113

mGluR, 108, 110
mitochondrie, 116
MitoTracker, 119
MSD, Mean Square Displacement, 86
métabotropique, récepteur, 106

NAD(P)H : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), 25
neurone, 103
neurotransmetteur, 105
NiNTA, 77
NMDA, NMDAR, 109
NR, sous-unité, 108

perceptron, 112
PHI : Photothermal Heterodyne Imaging (= LISNA), 46
photoblanchiment, photobleaching, 27
PIC : Photothermal Interference Contrast, 45
PIV : Particle Image Velocimetry, 32
plasticité synaptique, 111, 113
potentialisation, 113
potentiel d'action, 105
protéine G, 106
PSD : densité postsynaptique, 110
PVA : Poly-vinyl-alcool, 51
péricaryon, 103

QDs : Quantum Dots, 28

rayon hydrodynamique, 134
RSB : rapport signal à bruit , 51
récepteur postsynaptique, 105
résonance plasmon de surface, 43

section efficace, 17, 42
SMT : Single Molecule Tracking, 26
SNaPT : Single Nanoparticle Photothermal Tracking, 86
soma, 103
SPT : Single Particle Tracking, 18
synapse, 105

TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence, 21
transfection, 25, 90

épifluorescence, 20

Résumé : Nous présentons dans ce manuscrit le développement d'une nouvelle méthode de détection optique de nanoparticules métalliques individuelles pour des applications à la biochimie et à la biologie. Cette méthode, appelée LISNA (Laser Induced Scattering around a NanoAbsorber) tire profit des propriétés absorbantes des nanoparticules métalliques au voisinage de la résonance plasmon. Nous montrons dans un premier temps qu'elle peut être utilisée sur des échantillons statiques, avec des applications en biochimie *in vitro*. Nous montrons ensuite qu'elle peut être appliquée efficacement pour étudier des phénomènes dynamiques selon deux modalités. En premier lieu, en utilisant une technique de triangulation, elle permet d'enregistrer la trajectoire de nanoparticules diffusant à 2 dimensions (Single Nanoparticle Photothermal Tracking – SNaPT). Nous avons ainsi pu suivre des récepteurs postsynaptiques marqués avec des billes d'or de 5 nm à la surface de neurones vivants pendant plusieurs minutes. Pour caractériser la diffusion de nanoparticules plus rapides, nous avons développé une seconde approche basée sur les corrélations de signal lors du passage de nanoparticules dans le volume de détection. Cette méthode (Absorption Correlation Spectroscopy – ACS) donne une information très précise sur le rayon hydrodynamique de l'objet observé, mais peut aussi être appliquée à l'étude du mouvement de molécules en milieu biologique où elle constitue une alternative intéressante à la corrélation de fluorescence dans le cas de dynamiques lentes. Enfin, l'imagerie par la méthode LISNA des mitochondries, des organelles cellulaires absorbantes, a été démontrée sur cellules vivantes sans avoir recours à un marqueur extrinsèque, et l'origine du signal a été étudiée.

Mots-clés : microscopie, effet photothermique, nanoparticules métalliques, suivi de particules uniques, diffusion de protéines membranaires, neurobiologie, récepteurs de neurotransmetteurs, mitochondries, spectroscopie de corrélation.

Abstract : In this manuscript a new optical method is introduced to detect single metal nanoparticles for biological and biochemical applications. This method called LISNA (Laser Induced Scattering around a NanoAbsorber) takes advantage of absorbing properties of metal nanoparticles near their plasmon resonance. We first show that it can be used on fixed samples such as in *in vitro* biochemistry experiments. We then show that this technique can also be used efficiently to study dynamic phenomena through two modes. First, it allows to record the trajectories of 2D-diffusing nanoparticles using a triangulation scheme (Single Nanoparticle Photothermal Tracking – SNaPT). We thus could track postsynaptic receptors labelled with 5 nm gold beads on live neurons for several minutes. To characterize the diffusion of faster nanoparticles, we have developed a new approach based on the analysis of signal correlations as nanoparticles go through the detection volume. This method (Absorption Correlation Spectroscopy – ACS) gives precise information about the hydrodynamic radius of the objects that are observed, but should also find interesting applications in live cell studies by giving access to long time scales that are not accessible for standard FCS experiments. Finally, we demonstrate that mitochondria (some absorbing cellular organelles) could be imaged using LISNA on live cells without extrinsic labelling, and the origin of the signal was studied.

Keywords : microscopy, photothermal effect, metal nanoparticles, single particle tracking, membrane proteins diffusion, neurobiology, receptors for neurotransmitters, mitochondria, correlation spectroscopy.