► La vidéomicroscopie permet de suivre la dynamique de constituants biologiques, marqués de façon spécifique, généralement par couplage à des fluorochromes, tant à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle moléculaire. La reconstitution des trajectoires à l'aide d'algorithmes dédiés permet ainsi de caractériser des mouvements de type aléatoire, linéaire, confiné, et de documenter des événements, tels que des interactions transitoires entre les partenaires observés et avec leur environnement. Pour divers paramètres, tels que la vitesse ou la durée d'interaction, des mesures à l'échelle de la cellule ou de la molécule unique fournissent non seulement des valeurs moyennes, mais aussi la distribution détaillée des valeurs mesurées. ◀

La microscopie représente une approche expérimentale privilégiée en biologie. Elle est historiquement associée à de nombreuses avancées majeures, telles que la description de la première cellule par Hooke en 1665, la réfutation de la génération spontanée par Pasteur ou encore la première observation du mouvement brownien. Un point remarquable concernant ces deux derniers exemples est d'observer l'« infiniment petit » de manière dynamique. De fait, la notion de mouvement, macroscopique et microscopique, est un des aspects fondamentaux du vivant [1, 2]. Les cibles à détecter, cellulaires ou moléculaires, doivent être marquées de façon spécifique. La méthode de choix en microscopie est de recourir à des marquages fluorescents. En effet, la fluorescence est une propriété relativement rare, et les tissus biologiques sont en général spontanément peu autofluorescents. L'ajout ciblé de fluorochromes de brillance élevée permet d'obtenir un signal qui se détache fortement du bruit de fond. La GFP (*green fluorescent protein*), associée au prix Nobel de Tsien, Chalfie et Shimomura [3, 4], et ses nombreuses variantes chromatiques ou photoconvertibles exprimées par des cellules transfectées, voire par des animaux transgéniques, fournissent ainsi un outil de marquage privilégié.

Vignette (Photo © Inserm - Patrice Latron).

Mouvements cellulaires et moléculaires

Ordre et désordre

Arnauld Sergé^{1,2}, Magali Irla^{1,3}

¹Département de pathologie et d'immunologie, faculté de médecine, université de Genève, 1 rue Michel Servet, 1211 Genève, Suisse ;

²Centre de recherche en cancérologie de Marseille, Aix-Marseille université, Marseille, France ;

³Centre d'immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille université, Marseille, France.
arnauld.serge@univ-amu.fr
magali.irla@inserm.fr

Dynamique à l'échelle cellulaire

Méthodologie

La caractérisation du mouvement cellulaire dépend étroitement du type cellulaire considéré. Ainsi, les organismes unicellulaires (virus, bactéries, etc.) adoptent généralement un trajet aléatoire leur permettant d'explorer leur environnement, en quête de nutriments, par exemple. Dans le cadre d'organismes multicellulaires, l'observation, difficile à mettre en œuvre *in situ*, nécessite des techniques dédiées ; la principale est la microscopie biphotonique (Figure 1A). Cette technique consiste à exciter les molécules fluorescentes avec des photons ayant la moitié de l'énergie requise, donc une longueur d'onde double [5, 6] (Figure 1B). L'excitation n'est efficace que lorsque les photons arrivent quasiment simultanément, ce qui n'a lieu qu'au point de focalisation et nécessite des lasers pulsés de haute énergie. L'intérêt majeur pour la biologie est que la longueur d'onde résultante se situe dans l'infrarouge, domaine plus transparent et moins réfringent que le visible pour la majorité des tissus. Cette caractéristique permet des observations à plusieurs centaines de nanomètres de profondeur, au lieu de quelques dizaines pour un système classique, monophoton. Il est ainsi possible d'observer des cellules au sein d'organes, soit *ex vivo* après dissection, soit *in vivo* par exposition chirurgicale ou implantation d'une vitre sur l'animal.

Diversité des mouvements

Bien que la plupart des cellules soient statiques au sein d'un organisme multicellulaire, certaines comme les cellules embryonnaires présentent un mouvement collectif (expansion, invagination, etc.) conduisant à l'élaboration des différentes structures tissulaires. Par ailleurs, les cônes de croissance neuronaux sont mus par divers

Figure 1. Suivi de cellules uniques. **A.** Des cellules peuvent être observées *in vivo* si elles ont été rendues fluorescentes, par expression d'une protéine de type GFP (green fluorescent protein) ou par marquage avec des fluorochromes dédiés. Le microscope biphoton, utilisant un laser infrarouge peu absorbé par les tissus biologiques, est l'outil de choix pour observer des cellules en profondeur, au sein d'un organe [5, 6]. Le schéma ne respecte pas les proportions réelles. **B.** Diagrammes illustrant les énergies mises en jeu lors d'un processus de fluorescence monophotonique (haut) ou biphotonique (bas). L'excitation (représentée par une onde bleue) requiert toujours plus d'énergie que l'émission (onde verte), ce qui engendre un décalage spectral vers le rouge. Un processus biphotonique combine deux photons ayant chacun la moitié de l'énergie nécessaire (ondes rouges). **C.** Trajectoires (en blanc) de lymphocytes OTI-GFP (verts, exprimant un récepteur T qui reconnaît spécifiquement un épitope de l'ovalbumine) enregistrés au sein d'une tumeur EG7 (exprimant l'ovalbumine) chez une souris anesthésiée. Les vaisseaux irrigant la tumeur ont été marqués par injection de dextran couplé à la rhodamine (rouge). **D.** Contrôle négatif, enregistré au sein d'une tumeur analogue, EL4, mais n'exprimant pas l'ovalbumine. Noter l'étendue accrue des trajectoires, pour une durée d'enregistrement égale (30 min). Pour **C** et **D**, images adaptées de Boissonnas *et al.* [14].

gradients attractifs ou répulsifs et décrivent une chorégraphie subtile pour établir leur connectivité [7]. Chez l'adulte, le mouvement est essentiellement l'apanage des cellules sanguines [8], ainsi que des cellules impliquées dans les processus de cicatrisation ou de cancer [9, 10]. À noter que ces exemples impliquent les cellules immunitaires, véritables sentinelles en ronde permanente au sein de l'organisme.

Trois grands types de déplacements peuvent être distingués : (1) le mouvement cellulaire aléatoire, permettant d'explorer l'environnement, (2) le mouvement cellulaire dirigé : chimiotaxie [11], au cours

1 Observation intravitale du recrutement de lymphocytes T dans une tumeur

L'évolution, favorable ou non, d'une tumeur résulte d'un processus dynamique, dans lequel la vascularisation joue un rôle critique. D'une part, des cellules du système immunitaire peuvent être recrutées au sein de la tumeur par un processus d'extravasation leur permettant de franchir la paroi des vaisseaux sanguins [13], pour reconnaître et éliminer les cellules tumorales. D'autre part, cette vascularisation permet d'accélérer la croissance de la tumeur, et constitue également une étape critique vers l'apparition de métastases, en permettant à certaines cellules malignes suffisamment différenciées de rejoindre la circulation sanguine par un mécanisme inverse d'intravasation vers l'intérieur des vaisseaux. L'étude de ces mouvements cellulaires nécessite de recourir à la microscopie intravitale, en condition native, pour pouvoir observer *in situ* le recrutement de lymphocytes au sein d'une tumeur vascularisée [10]. La lignée tumorale EG7 (référéncée à l'ATCC sous le n° CRL2113), établie à partir d'un lymphome murin, est un modèle répandu car elle présente à sa surface, via les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I, un épitope spécifique de l'ovalbumine, protéine de poulet non exprimée chez la souris. Après transfert adoptif, des lymphocytes T CD8⁺, provenant d'une souris transgénique OTI exprimant un récepteur T spécifique de cet épitope, sont recrutés au niveau de la tumeur. La reconnaissance spécifique de l'antigène provoque des interactions fortes entre lymphocytes et cellules tumorales, se traduisant par une mobilité réduite de ces lymphocytes T (Figure 1C), en comparaison de la mobilité normalement observée dans des tumeurs similaires mais n'exprimant pas l'ovalbumine et n'engageant donc pas d'interactions aussi stables (Figure 1D). Ces interactions spécifiques de l'antigène apparaissent initialement à la périphérie puis au cœur de la tumeur, permettant aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques de lyser graduellement les cellules tumorales [14]. La régression tumorale est accrue lorsque les lymphocytes T ont été préalablement différenciés en cellules cytotoxiques *in vitro* avant leur transfert adoptif, comme établi sur un modèle animal de thérapie anticancéreuse employant les mêmes lignées cancéreuses et lymphoïdes [15].

du développement et des phénomènes d'infection ou de cicatrisation, et (3) les arrêts cellulaires lors d'interactions transitoires entre cellules, telles que la reconnaissance de pathogènes par des cellules du système immunitaire [12]. L'observation des cellules dans leur environnement natif permet ainsi d'appréhender finement leur fonction.

Figure 2. Suivi de molécules uniques. **A.** Pour étudier leur dynamique, des molécules d'intérêt sont marquées individuellement. Des protéines de la membrane plasmique peuvent être marquées via des anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes, tels que les *quantum-dots* par exemple. Des protéines d'intérêt peuvent également être étudiées par association avec une protéine fluorescente de type GFP. La cellule est ensuite analysée par microscopie à fluorescence. Le schéma ne respecte pas les proportions réelles. **B.** La photostabilité d'un fluorochrome dépend de paramètres extrinsèques (puissance d'excitation) et intrinsèques (photophysique de la molécule). Le photoblanchiment correspond à un déclin exponentiel, pour une population de fluorochromes, et survient typiquement en quelques secondes ou quelques minutes. Les *quantum-dots* présentent une stabilité remarquable, pouvant être maintenue pendant plusieurs heures. **C.** Trajectoires de récepteurs de l'EGF, identifiés par marquage avec des *quantum-dots*, superposées sur l'image en contraste interférentiel de la cellule en culture exprimant les récepteurs. Les épisodes de confinement sont indiqués en orange. **D.** Agrandissement de l'image précédente. **C.** et **D.** images adaptées de Sergé et al. [19, 20]. Barres d'échelle : 10 μm .

Dynamique à l'échelle moléculaire

Au niveau moléculaire, l'étude peut porter sur une protéine, un lipide, ou un acide nucléique. On peut distinguer deux cas, selon qu'il s'agit de molécules cytosoliques [16, 17] ou membranaires [18-22]. Les molécules peuvent être typiquement des protéines recombinantes, fusionnées avec une GFP ou marquées par des anticorps, eux-mêmes couplés à des fluorochromes, et utilisés suffisamment dilués pour autoriser l'observation de molécules individuelles (Figure 2A). Les *quantum-dots* sont des nanocristaux de semi-conducteurs dont le spectre d'émission dépend directement de la taille [23]. Ils sont particulièrement adaptés à l'observation de molécules uniques, en raison de leur brillance et de leur stabilité exceptionnelle. En effet, le photoblanchiment, processus correspondant à l'extinction irréversible d'un fluorochrome, reste

l'un des principaux facteurs limitants pour ce type de mesure (Figure 2B).

Résolution latérale et axiale : nanoscopie et mesures 3D

L'utilisation d'une caméra suffisamment sensible est un paramètre clé pour pouvoir détecter un fluorochrome unique, dont la position peut être déterminée à l'échelle du nanomètre, bien en deçà de la limite de résolution optique [18]. Cette propriété est d'ailleurs à la base des récentes approches dites de nanoscopie [24, 25] qui consistent, soit à affiner optiquement la zone d'excitation, soit à accumuler séquentiellement les positions de l'ensemble d'une population moléculaire (Figure 3A, 3B). Ces stratégies permettent de générer des images à très haute résolution, comparable à celle fournie par la microscopie électronique. L'accumulation des positions moléculaires nécessite en général la fixation de l'échantillon. Cependant, ces approches ont été étendues à des mesures dynamiques, ainsi qu'à des mesures en trois dimensions ou pour plusieurs populations.

La résolution axiale peut également être affinée par plusieurs approches. La zone excitée peut être confinée au voisinage immédiat de la lamelle (Figure 3C). L'emploi d'optiques dédiées, multifocales ou induisant une déformation liée à la position axiale [26], permet d'étendre en trois dimensions des études habituellement limitées au plan de la membrane plasmique.

Mouvements moléculaires

Trois types de mouvements moléculaires, analogues aux mouvements cellulaires évoqués précédemment, peuvent être distingués : (1) le mouvement aléatoire, initialement observé dans des grains de pollen par Brown en 1827. Il résulte de fluctuations stochastiques d'interactions moléculaires, engendrant de perpétuels changements de direction. Ce phénomène a été formalisé notamment par Fick, Bachelier, Einstein, Langevin et Perrin ; (2) le mouvement dirigé, typiquement dû à des moteurs moléculaires suivant des câbles du cytosquelette [31] ; et (3) intègre les arrêts ou confinements dus à des interactions transitoires [21, 22, 32-35] dans des structures membranaires sous-jacentes telles que radeaux protéolipidiques, plates-formes de signalisation, puits d'endo/exocytose, complexes d'adhérence, et synapses neuronales.

La visualisation de mouvements moléculaires a ainsi permis de décrire le mécanisme d'entrée d'un virus dans une cellule [17] et le trafic au niveau postsynaptique de récepteurs de neurotransmetteurs marqués par des *quantum-dots* [24, 36, 37].

Figure 3. Comment améliorer la résolution optique ? **A.** L'émission de fluorescence peut être déplétée selon le principe du STED (*stimulated emission depletion*). La zone d'excitation est restreinte optiquement par un deuxième laser en forme d'anneau, placé autour du faisceau d'excitation et bloquant la fluorescence. Ceci permet de générer une région d'excitation de taille réduite, quasi nanométrique [27]. **B.** La stimulation et l'extinction successive de quelques fluorochromes permettent de localiser les molécules marquées avec une précision proche du nanomètre. Après chaque stimulation, suffisamment brève, seules quelques molécules sont activées et analysées individuellement. Citons les techniques du PALM (*photo-activated localization microscopy*) [28], qui exploite un variant photoactivable de la GFP, et celle du STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*) [29], qui utilise les propriétés de clignotement aléatoire des fluorochromes. **C.** La réflexion totale interne (TIRF, *total internal reflexion fluorescence*) utilise une configuration optique très particulière : le laser d'excitation n'arrive pas directement, mais avec un angle d'inclinaison très important (via l'objectif ou un prisme). Le laser ne pénètre pas dans l'échantillon, mais génère une onde dite évanescente, confinée à $\approx 100 \text{ nm}$ de l'interface avec la lamelle [30]. La résolution axiale est affinée, mais l'observation est intrinsèquement limitée à cette interface qui correspond, pour une cellule adhérente, à la membrane basale et à son environnement immédiat.

Analyse des vidéos

Les enregistrements sont analysés à l'aide d'outils dédiés pour évaluer, par exemple, l'impact d'un traitement ou d'une mutation. Il faut détecter et estimer les cibles au sein des images pour reconstruire et caractériser leurs trajectoires (Figure 4) [19, 25].

Figure 4. Mesures obtenues par vidéomicroscopie. **A.** Pour des cellules comme pour des molécules, l'enregistrement par vidéomicroscopie peut être étendu à cinq dimensions : une vidéo, succession temporelle (t) d'images (x, y), et même éventuellement de piles d'images recomposant un volume (x, y, z), pour plusieurs couleurs (longueurs d'ondes λ). **B.** L'analyse optimale de tous ces paramètres, en conditions limites de densité de cibles et de rapport signal sur bruit [19], constitue un défi et permet de documenter les évolutions dynamiques des populations cellulaires ou moléculaires étudiées, pour identifier par exemple des événements d'interaction.

Données obtenues par vidéomicroscopie

La qualité de l'information obtenue peut être quantifiée en termes d'échantillonnage (densité des cibles) et de résolution spatiale, temporelle et spectrale. Deux aspects sont à considérer : (1) l'optimisation globale du système expérimental : performance en termes de marquage, d'illumination, de détection (optiques, capteurs), et d'analyse ; et (2) le compromis à établir entre ces différents axes, à documenter au mieux pour un nombre limité de photons émis par chaque fluorochrome, en conditions viables et non phototoxiques pour l'organisme observé. Selon la question posée, l'expérimentateur privilégiera l'échantillonnage spatial, la cadence temporelle, la durée de la mesure, etc.

Les fluorochromes peuvent être, directement ou non, sensibles à des paramètres physiologiques, tels que le pH ou la concentration calcique locale, pour citer les plus utilisés. On peut alors parler de capteurs moléculaires, qui permettent de documenter des paramètres supplémentaires au cours de l'enregistrement, pour caractériser la cinétique d'une réponse à une stimulation par exemple.

La taille des cellules est nettement supérieure à la résolution optique, de l'ordre de la centaine de nanomètres,

2 Étude extensive de la mobilité d'un récepteur membranaire

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) intervient dans la régulation de la croissance, de la différenciation et de la division cellulaire dans la plupart des cellules de l'organisme. C'est à ce titre un oncogène majeur, impliqué dans de nombreux cancers et cible de plusieurs traitements anticancéreux [38]. Les récepteurs endogènes exprimés à la surface d'une lignée cellulaire (fibroblastes de singe COS-7, présentant de larges lamellipodes) peuvent être spécifiquement marqués en grand nombre, jusqu'à un millier simultanément, à l'aide de fragments d'anticorps (Fab, *fragment antigen binding*) couplés à des *quantum-dots*. Ils peuvent alors être suivis individuellement à l'aide d'une caméra rapide et sensible, de type EM-CCD (*electron-multiply charged-coupled device*). Au cours de la détection, certains pics de fluorescence peuvent être manqués, car masqués par d'autres. Une boucle de déflation, qui consiste à soustraire les pics détectés, puis à relancer la détection sur l'image résiduelle, permet de pallier cette limitation. Ce procédé augmente le rendement de détection, qui peut devenir quasi exhaustif. La reconstitution des trajectoires des récepteurs est effectuée à l'aide d'algorithmes dédiés optimisant les données statistiques obtenues sur la position, la mobilité ou encore la brillance et le clignotement, un phénomène inhérent aux *quantum-dots* (Figure 2C, 2D). La résolution spatio-temporelle peut être affinée en dessous de la dizaine de nanomètres et de millisecondes, respectivement. L'analyse des fluctuations de mobilité permet d'identifier des épisodes de confinement transitoire, signatures d'une dynamique fluctuante de cette population moléculaire [19]. L'activation du récepteur entraîne sa dimérisation et sa phosphorylation. Ce mécanisme a pu être confirmé au niveau d'une molécule unique [39]. Il a également été montré que cette activation peut survenir à l'extrémité de filopodes qui permettent à la cellule de sonder son environnement en détectant la présence du ligand EGF [40].

d'après la formule d'Abbe : $0,6 \lambda / \text{ON}$. λ est la longueur d'onde d'excitation (400 à 700 nm pour le spectre visible), ON est l'ouverture numérique de l'objectif (autour de 1,6 dans les meilleurs cas). Il est donc possible de distinguer et de caractériser la forme des cellules : présence de protubérances, arrondissement, zone de contact entre deux cellules, etc. *A contrario*, les dimensions moléculaires se situent en dessous de cette limite de résolution, et leur image est donc réduite à une tâche de diffraction [24]. Dépasser cette limite constitue d'ailleurs tout l'enjeu des approches de nanoscopie évoquées ci-dessus. Par ailleurs, la corrélation de deux marquages traduit une colocalisation spatiale, mais ne donne qu'une indication indirecte sur une possible interaction.

Caractérisation des mouvements observés : outils analytiques

Les analyses peuvent typiquement s'appliquer à une trajectoire dans son ensemble, voire à un ensemble de trajectoires. Il peut s'agir de la distance parcourue ou de la vitesse moyenne. Mais pour le mouvement brownien, ces paramètres ne sont pas les mieux adaptés. Bachelier a en effet établi que le paramètre pertinent n'est plus la distance parcourue, fluctuante sur un trajet aléatoire, mais le carré de cette distance, qui

Figure 5. Analyse des données. **A.** Déplacement carré moyen, pour des trajectoires dirigées, browniennes et confinées, et équation associée. La variable τ correspond à un intervalle de temps entre deux points d'une trajectoire, et $\overline{r^2}$ est le déplacement carré entre ces points, moyenné sur toutes les combinaisons possibles pour chaque valeur de τ . Chaque exemple de trajectoire correspond à une simulation sur 3 000 pas. **B.** Variations temporelles d'un phénomène d'intérêt alternant entre des valeurs élevées et réduites (fond jaune). Par exemple, la mobilité d'une cible (cellule ou molécule) peut présenter des ralentissements transitoires ou encore la distance du partenaire le plus proche peut révéler de possibles rapprochements. **C.** Histogramme d'un descripteur, représentant ici une distribution bimodale. Ce type de distribution peut être analysé par ajustement avec une ou plusieurs lois gaussiennes, par exemple. Les variables (confinement, vitesse, etc.) représentent, à titre indicatif, tout descripteur pertinent pour une analyse donnée.

est en moyenne proportionnel à l'intervalle temporel τ . Le facteur de proportionnalité est relié au coefficient de diffusion D , selon la relation $\overline{r^2} = 2nD\tau$ (la barre indique la moyenne et n la dimension de l'espace exploré soit au niveau moléculaire, 3 pour le cytosol, 2 pour une membrane, 1 pour une fibre et pour une cellule, 3 pour un organe, 2 pour un feuillet ou 1 pour un capillaire). Comme mentionné tant pour les cellules que pour les molécules, le comportement observé n'est pas toujours purement brownien. Il peut être quasi linéaire dans le cas d'une cellule guidée par une structure ou un gradient chimiotactique, ou encore d'une molécule se déplaçant sur une fibre du cytosquelette. Le déplacement peut aussi être confiné par des structures interagissant avec l'objet suivi, cellules exprimant des corécepteurs ou molécules d'affinité modérée. Ces trois comportements

types correspondent respectivement à un déplacement carré moyen linéaire (a), de courbure positive (b) ou négative (c) (Figure 5A, et équations associées). Ces trois catégories de mouvement peuvent survenir en alternance et ne constituent aucunement une liste exhaustive. Ils permettent néanmoins de décrire, en première approximation, une proportion conséquente des mouvements observables à ces échelles. Des fluctuations temporelles, telles que vitesse réduite ou colocalisation [41] (Figure 5B), peuvent permettre d'identifier des phénomènes transitoires, tels qu'une stimulation [21, 22, 32-34]. L'un des attraits majeurs d'une étude à l'échelle de cellules ou de molécules individuelles est de recueillir des données détaillées pour chaque trajectoire, voire pour chaque pas temporel, et donc de pouvoir établir la distribution d'un paramètre (Figure 5C) lorsque d'autres mesures ne donneraient qu'une valeur moyenne. Ceci permet d'établir, par exemple, si le paramètre suit une distribution gaussienne ou présente plusieurs composantes pouvant être reliées à différents états, tels que la vitesse réduite pour des cellules en interaction transitoire, ou l'intensité de fluorescence doublée pour des molécules dimérisées [41].

Le mouvement cellulaire implique l'activation et la coordination du cytosquelette et des complexes d'adhérence. Dotée d'une flexibilité remarquable, la cellule peut ainsi répondre rapidement à un stimulus. Elle présente néanmoins une certaine inertie à court terme, à l'instar d'un navire mais à l'inverse d'un mouvement brownien pur (apanage de trajectoires moléculaires). Ceci amène donc à parler usuellement en termes de vitesse cellulaire ou de coefficient de diffusion moléculaire, avec des valeurs typiques de l'ordre du micron par minute pour les cellules, et du micron carré par seconde pour les molécules, ces valeurs pouvant varier sur plusieurs décades selon le contexte.

Conclusion

La sensibilité spatiotemporelle de la microscopie permet des observations dynamiques, tant au niveau des cellules au sein d'organes que des molécules au sein de la cellule. Ces mesures permettent de décrire et de quantifier les mouvements associés. Elles permettent ainsi de documenter en conditions physiologiques ou pathologiques, et avec une très bonne résolution, des mécanismes d'interaction tels que le recrutement de lymphocytes sur des sites d'infection ou des tumeurs, ou les interactions de récepteurs membranaires avec leurs partenaires de signalisation. Les outils d'analyse d'image et de mouvement peuvent s'appliquer à diverses échelles, de la physique des particules à l'astronomie. La sensibilité et les degrés de liberté offerts à l'expérimentateur augmentant avec les progrès instrumentaux, le prochain défi majeur pourrait être de combiner les échelles, en observant des molécules individuelles au cœur de l'organisme entier. ♦

SUMMARY

Cellular and molecular motions: order and disorder

Video-microscopy allows monitoring the dynamics of biological components, specifically labeled, usually by fluorescent tags such as GFP or quantum dots, either at the cellular or at the molecular scale.

Reconstructing trajectories over time with dedicated algorithms allows to characterize on both scale different categories of movement, such as random, linear or confined, and to report events such as transient confinements among recorded species and with their environment. Single cell or molecule measurements hence provide detailed access not only to mean values of relevant descriptors, such as speed or interaction duration, but also to the exhaustive distribution of recorded values. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement Stéphanie Hugues, Sarah Garrido, Béat Imhof, Pierre et Catherine Sergé pour leur relecture et discussions fructueuses.

RÉFÉRENCES

1. Amblard F, Coscoy S. Le temps, sculpteur de la cellule ? *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 425-31.
2. Trugnan G, Fontanges P, Delautier D, Ait-Slimane T. FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De nouvelles techniques pour voir la vie en couleur ! *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 1027-34.
3. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998 ; 67 : 509-44.
4. Salameo J. La « révolution-verte » est en marche. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 987-8.
5. Dufour P, Dufour S, Castonguay A, et al. Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux ou un photon c'est bien... mais deux c'est mieux ! *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 837-44.
6. Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990 ; 248 : 73-6.
7. Mortimer D, Fothergill T, Pujic Z, et al. Growth cone chemotaxis. *Trends Neurosci* 2008 ; 31 : 90-8.
8. Niesner RA, Hauser AE. Recent advances in dynamic intravital multi-photon microscopy. *Cytometry A* 2011 ; 79 : 789-98.
9. Beerling E, Ritsma L, Vrizekoop N, et al. Intravital microscopy: new insights into metastasis of tumors. *J Cell Sci* 2011 ; 124 : 299-310.
10. Lavigne AM, Carrière V, Amalric F, et al. Apports de la microscopie réalisée *in situ* sur animal vivant dans l'étude du cancer. *Med Sci (Paris)* 2002 ; 18 : 217-25.
11. Van Haastert PJ. Chemotaxis: insights from the extending pseudopod. *J Cell Sci* 2010 ; 123 : 3031-7.
12. Dustin ML. Visualizing immune system complexity. *Sci Signal* 2009 ; 2 : mr4.
13. Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Lee BP, Imhof BA. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochem Soc Trans* 2008 ; 36 : 203-11.
14. Boissonnas A, Fetler L, Zeelenberg IS, et al. *In vivo* imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 345-56.
15. Breart B, Lemaitre F, Celli S, Bousso P. Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 1390-7.
16. Sergé A, de Keijzer S, Van Hemert F, et al. Quantification of GPCR internalization by single-molecule microscopy in living cells. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* 2011 ; 3 : 675-83.
17. Seisenberger G, Ried MU, Endress T, et al. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 2001 ; 294 : 1929-32.
18. Schmidt T, Schutz GJ, Baumgartner W, et al. Imaging of single molecule diffusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 2926-9.
19. Serge A, Bertaux N, Rigneault H, Marguet D. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat Methods* 2008 ; 5 : 687-94.

RÉFÉRENCES

20. Rouger V, Bertaux N, Trombik T, *et al.* Mapping molecular diffusion in the plasma membrane by Multiple-Target Tracing (MTT). *J Vis Exp* 2012 ; 27 : e3599.
21. Meilhac N, Le Guyader L, Salome L, Destainville N. Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2006 ; 73 : 011915.
22. Simson R, Sheets ED, Jacobson K. Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys J* 1995 ; 69 : 989-93.
23. Gao X, Chung LW, Nie S. Quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Methods Mol Biol* 2007 ; 374 : 135-46.
24. Izeddin I, Darzacq X, Dahan M. Microscopies cellulaires à l'échelle de la molécule individuelle. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 547-52.
25. Cebecauer M, Spitaler M, Sergé A, Magee AI. Signalling complexes and clusters: functional advantages and methodological hurdles. *J Cell Sci* 2010 ; 123 : 309-20.
26. Kao HP, Verkman AS. Tracking of single fluorescent particles in three dimensions: use of cylindrical optics to encode particle position. *Biophys J* 1994 ; 67 : 1291-300.
27. Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 1994 ; 19 : 780-2.
28. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006 ; 313 : 1642-5.
29. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 2006 ; 3 : 793-5.
30. Axelrod D. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J Cell Biol* 1981 ; 89 : 141-5.
31. Gelles J, Schnapp BJ, Sheetz MP. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature* 1988 ; 331 : 450-3.
32. Meier J, Vannier C, Serge A, *et al.* Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci* 2001 ; 4 : 253-60.
33. Serge A, Fourgeaud L, Hemar A, Choquet D. Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J Neurosci* 2002 ; 22 : 3910-20.
34. Saxton MJ. Single-particle tracking: effects of corrals. *Biophys J* 1995 ; 69 : 389-98.
35. Rossier O, Oceau V, Sibarita JB, *et al.* Integrins beta(1) and beta(3) exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat Cell Biol* 2012 ; 14 : 1057-67.
36. Dahan M, Levi S, Luccardini C, *et al.* Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 2003 ; 302 : 442-5.
37. Groc L, Choquet D. Instabilité dynamique de la communication neuronale : nouveau regard sur le trafic des récepteurs de surface. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 895-7.
38. Vecchione L, Jacobs B, Normanno N, *et al.* EGFR-targeted therapy. *Exp Cell Res* 2011 ; 317 : 2765-71.
39. Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol* 2000 ; 2 : 168-72.
40. Lidke DS, Nagy P, Heintzmann R, *et al.* Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat Biotechnol* 2004 ; 22 : 198-203.
41. Schmidt T, Schutz GJ, Gruber HJ, Schindler H. Local stoichiometries determined by counting individual molecules. *Anal Chem* 1996 ; 68 : 4397-401.

TIRÉS À PART
A. Sergé

De la jaunisse à l'hépatite C

5 000 ans d'histoire

2^e édition mise à jour
Jean-Louis Payen

ISBN : 978-2-8425-4136-1 128 pages

La jaunisse est un symptôme facilement identifiable ; il paraissait bien naturel que l'homme, confronté à une modification de la couleur de ses yeux et de sa peau ait de tous temps recherché les causes de cette transformation.

Il n'est donc pas surprenant que le premier traité de médecine, écrit 3 000 ans avant J.C. par un médecin sumérien, décrive déjà la jaunisse. À chaque époque de l'histoire de la médecine, les praticiens, influencés par les concepts médicaux de leur temps, attribuèrent une ou plusieurs explications particulières à ce symptôme. Ainsi, du démon *Ahhâzu* des Sumériens à la sophistication des biotechnologies qui permirent la découverte du virus de l'hépatite C, le lecteur cheminera sur une période de 5 000 ans au travers des différents continents. Ici encore, l'histoire se révèle une formidable source de réflexion : le foie souvent impliqué dans l'apparition des jaunisses est-il le siège de l'âme ?

Les expérimentations humaines chez des volontaires ou chez des enfants handicapés mentaux étaient-elles justifiées pour permettre la découverte des virus des hépatites ?

Le formidable développement de la transfusion sanguine, des vaccinations, mais aussi de la toxicomanie explique-t-il les épidémies d'hépatites du XX^e siècle ?

Autant de questions qui sont abordées dans ce livre passionnant et accessible à tous.

BON DE COMMANDE

À retourner à EDK, 25, rue Daviel - 75013 Paris - Tél. : 01 58 10 19 05 - Fax : 01 43 29 32 62 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **De la jaunisse à l'hépatite C, 5 000 ans d'histoire** : 12 € + 3 € de port = **15 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de **EDK**

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |

Signature :