

Ultramicroelectrodes et Fonctionnement Cellulaire à l'Echelle de la Cellule Unique : Neurotransmission et Stress Oxydatif

Christian Amatore

Académie des Sciences

Ecole Normale Supérieure. Département de Chimie. UMR CNRS 8640

24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05

e-mail : christian.amatore@ens.fr

(<http://helene.ens.fr/w3amatore/>)

En utilisant la technique de synapses artificielles mise au point au laboratoire nous avons pu explorer et résoudre le processus de la neurotransmission vésiculaire au niveau d'une cellule unique.

La même méthode nous a permis de démontrer que le phénomène de stress oxydatif correspondait à l'émission immédiate, mais pendant une durée de quelques dizaines de secondes, d'un " cocktail " de quelques femtomoles de peroxyde d'hydrogène, de NO, de peroxyde nitrite et de nitrites dont les flux sont mesurables individuellement par ampérométrie résolue dans le temps et pratiquée à différents potentiels.

Ces résultats démontrent donc pour la première fois la quasi-instantanéité de la réponse de stress oxydatif primaire, source des fameux radicaux libres, et identifient la nature et l'origine des différentes espèces émises. Ils suggèrent ainsi l'implication d'un couplage entre NADPH-oxydase et de NO-synthases intracellulaires.

La mise en jeu de ce phénomène important en parallèle de la communication interneuronale explique la manière dont nos neurones s'adressent aux réseaux de capillaires pour « demander » un afflux sanguin plus important lorsqu'ils travaillent activement, comme cela sera discuté sur la base de nos résultats les plus récents. Notons que c'est ce même phénomène (hyperhémie) qui est exploité par imagerie RMN ou à caméra-positon (PET-scan), via la mesure de l'augmentation locale de flux sanguin dans les zones actives du cerveau, afin d'imager le fonctionnement du cerveau et en sciences de la cognition.

Caractérisation quantitative des mécanismes de régulation de la transcription dans les cellules vivantes via des approches basées sur la fluctuation de fluorescence

Catherine A. Royer

Director, Centre de Biochimie Structurale, Montpellier

La bonne compréhension d'une fonction biologique, comme la régulation de la transcription, même dans les organismes les plus simples, nécessite la caractérisation *in vivo* de chacun des éléments intervenant dans le système étudié en termes de concentration, de stoechiométrie, de localisation et d'interactions. Connaître ce type d'information est déjà fortement souhaité pour accéder seulement à une compréhension qualitative de la fonction, et devient absolument indispensable dans le contexte d'une approche de la biologie des systèmes, ou dans l'évaluation quantitative de la réponse cellulaire à un stress, à des médicaments ou à des changements dans les nutriments.

Nos études ont comme objectif la caractérisation quantitative des interactions entre protéines dans deux systèmes biologiques: le récepteur d'œstrogène humaine et la régulation du métabolisme de Carbone Central (CCM) chez la bactérie Gram positive. Pour ce faire nous utilisons les techniques photoniques les plus en pointes, basées principalement sur la spectroscopie de fluctuation de fluorescence dans des mises en oeuvre sur cellule vivante unique. Nous utilisons au laboratoire les techniques de mesures de corrélation et de corrélation croisée de fluorescence (FCS et FCCS) et en développons d'autres à partir d'une spectroscopie de corrélation e fluorescence innovante et de techniques d'imagerie, en particulier la scanning FCS (sFCS), la Raster Scanning Image Correlation Spectroscopy (RICS), l'analyse en nombre et en brillance (Number and Brightness Analysis -NBA) et aussi la PhotoActivatable Localization Microscopy (PALM).

Après une longue introduction aux techniques, nous présenterons les résultats des deux applications.

Quantitative characterization of transcriptional regulatory mechanisms in live cells using fluorescence fluctuation approaches

The precise understanding of biological function, such as the regulation of transcription, even in the simplest organisms, requires the *in vivo* characterization of each of the elements intervening in the system of interest in terms of concentration, stoichiometry, localization and interactions. Such information is already highly desirable for even a qualitative understanding of function, and is absolutely necessary in the context of a systems biology approach or in the quantitative evaluation of cellular response to stress, to drugs or to changes in nutrients.

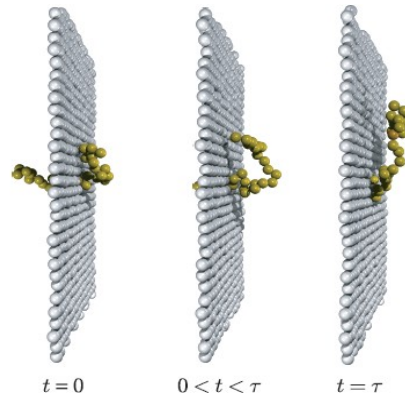
Our studies have for objective, the quantitative characterization of protein interactions in two biological systems, the human estrogen receptor and the regulation of the central carbon metabolism (CCM) in Gram positive bacteria. We approach this quantitative characterization using state-of-the-art biophotonics methodologies based primarily on fluorescence fluctuation spectroscopy (FFS) in single live cell settings. Fluorescent correlation and cross-correlation spectroscopy (FCS and FCCS) measurements and other innovative fluorescence fluctuation spectroscopy and imaging techniques, in particular scanning FCS (sFCS), Raster Scanning Image Correlation Spectroscopy (RICS), Number and Brightness Analysis (NBA) as well as PhotoActivatable Localization Microscopy (PALM) are currently in use or under development in the laboratory. After a comprehensive introduction to the techniques, results on both systems will be presented.

Translocation de fragments d'ADN à travers des nanopores : Modélisation et défis

Gary W. Slater¹

Département de physique

Université d'Ottawa, Canada



Depuis maintenant plus de 10 ans, des dizaines de groupes de par le monde tentent de mettre au point un séquenceur d'ADN qui utiliserait le passage d'un fragment moléculaire à travers un nanopore. Comme le diamètre du nanopore est à peine plus grand que la taille d'un nucléotide, le fragment passe dans le nanopore à la file indienne, base par base. Pourquoi ne pas lire l'ADN directement lorsqu'il sort du nanopore? Idée élégante, mais pas facile à mettre en application. La course technologique est devenue un marathon de longue haleine. Mais l'espoir persiste.

Notre groupe s'est intéressé très tôt à la modélisation du processus de translocation d'un polymère à travers le nanopore. En principe, on doit incorporer dans le modèle des éléments tels que l'hydrodynamique de l'ADN dans le solvant, l'interaction entre l'ADN et le milieu physique environnant (le nanopore, les parois, etc.), l'entropie moléculaire de l'ADN, l'électrolyte, et le champ électrique qui force l'ADN à passer dans le trou de l'anguille. Bien qu'il soit possible de simuler le processus au niveau atomique pour de petits ADN, des modèles plus simples sont nécessaires pour les cas utiles en pratique.

On pourrait penser que le simple passage d'un polymère dans un nanopore en absence d'hydrodynamique et de forces électriques serait un problème « mécanique » simple. En fait, il y a présentement des débats animés sur ce sujet et la situation est confuse. Les simulations se multiplient et se contredisent les unes les autres.

Dans cette présentation, nous allons faire le point sur certaines des questions les plus chaudement débattues par les théoriciens, et nous allons montrer comment notre groupe s'est attaqué à ces problèmes à l'aide de modèles simples et originaux. En particulier, nous allons montrer que la translocation peut même être provoquée par des effets de désordre, ce qui démontre une fois de plus que l'entropie n'est pas intuitive. Les cellules elles-mêmes utilisent peut-être ces effets pour déplacer des polymères.

¹ Travail fait en collaboration avec les Drs. Hendrick de Haan et Michel Gauthier.