

Biophysique : De la molécule au vivant

5 cours – 5 TDs

Mercredis 5, 12, 19, 26 mars

Mercredi 2 avril

Mercredi 9 avril: examen

Isabelle Bonnet

isabelle.bonnet@curie.fr

François Graner

francois.graner@univ-paris-diderot.fr

Thèmes	Cours		TD	
Molécules Uniques	05/03	09h00-10h30	12/03	10h45-12h15
Membranes	05/03	10h45-12h30	19/03	10h45-12h15
Cellules	12/03	09h00-10h30	26/03	10h45-12h15
Agrégats	19/03	10h45-12h15	02/04	09h00-10h30
Systemes multi cellulaires	26/03	09h00-10h30	02/04	10h45-12h15

Isabelle Bonnet

Université Pierre et Marie Curie
& Institut Curie

isabelle.bonnet@curie.fr

François Graner

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes,
Université Paris Diderot & CNRS

francois.graner@univ-paris-diderot.fr

Cours # 1 : Molécules Uniques

Plan:

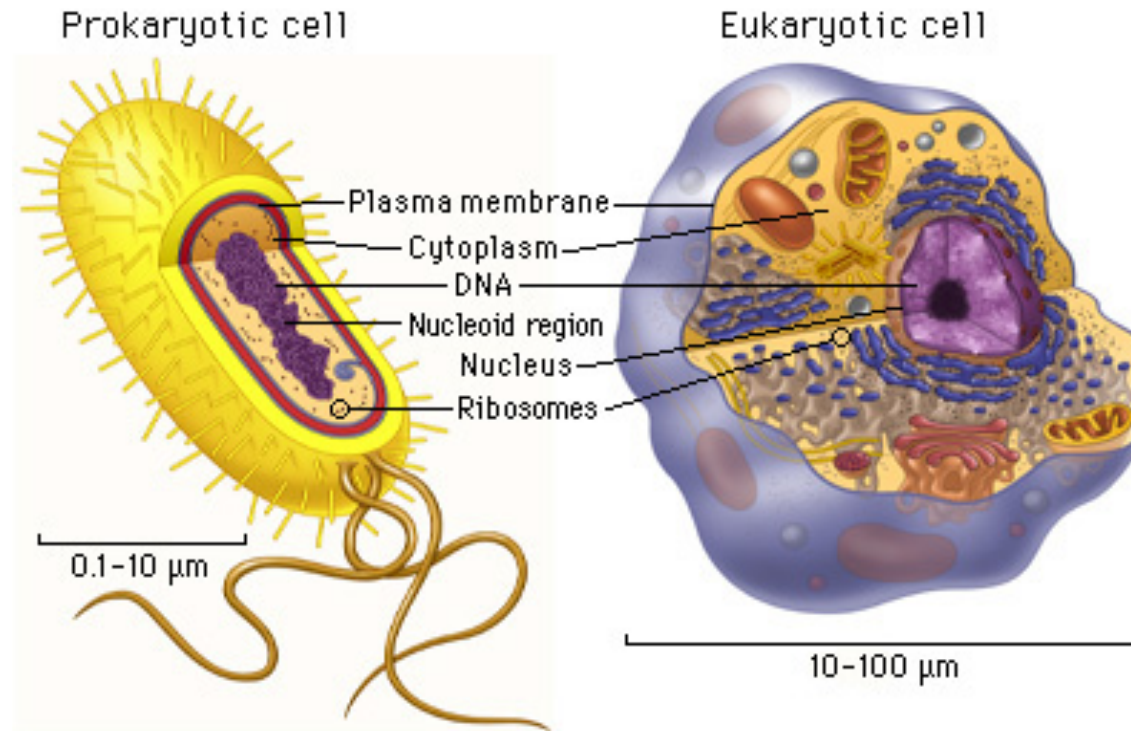
- Introduction sur les briques moléculaires du vivant
- I. Description physique et propriétés mécaniques d'une molécule d'ADN
- II. Manipuler une UNIQUE molécule d'ADN
- III. Détection optique de biomolécules individuelles

TD # 1:

- Deux modèles de l'élasticité de l'ADN (courbe force-extension)
- La technique des pinces optiques

Introduction - Cellule

Structure générale de la cellule



- Grande diversité de formes et de fonctions
- Consommation d'énergie (lumineuse, chimique)
- Multi-échelle (\varnothing ADN = 2 nm, \varnothing noyau = 5 μm)
- Système dynamique et stochastique
- Système hors équilibre \Rightarrow thermodynamique HE (physique statistique)

Introduction – Constituants de la cellule

Petites molécules :

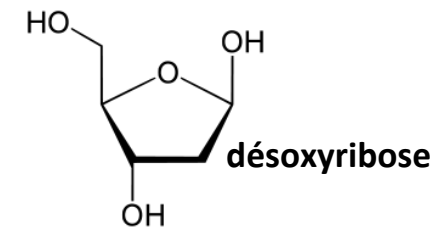
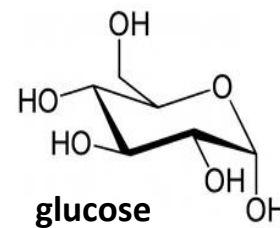
- inorganiques (71,2 % poids total d'une cellule)

H_2O (70%)

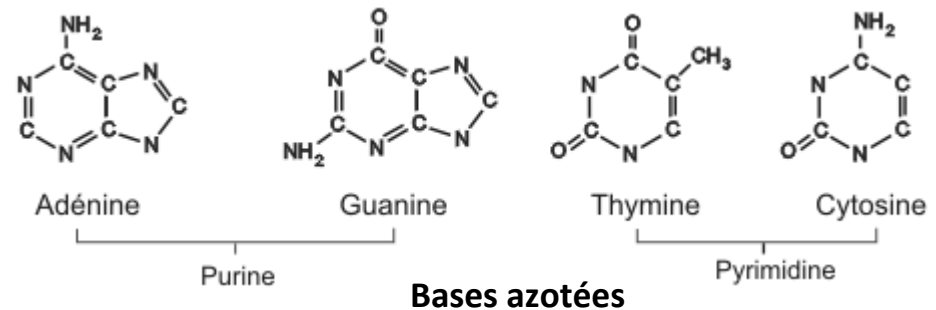
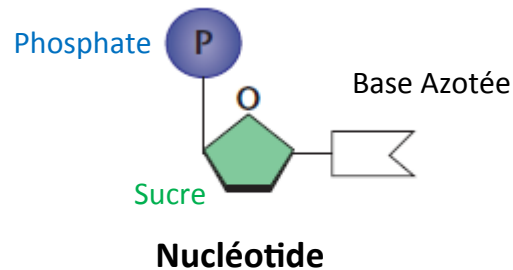
H_3PO_4

- organiques (3%)

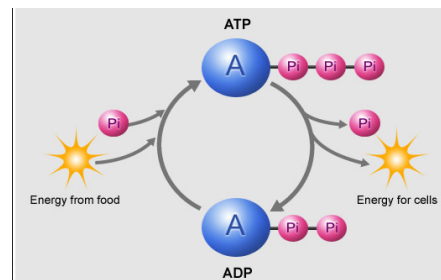
* sucres



* nucléotides individuels



* ATP, ADP

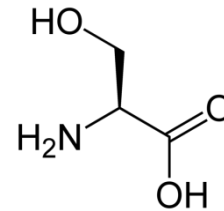


Introduction – Constituants de la cellule

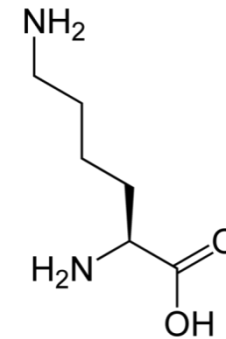
Petites molécules - Suite

- organiques (3%)

* acides aminés individuels



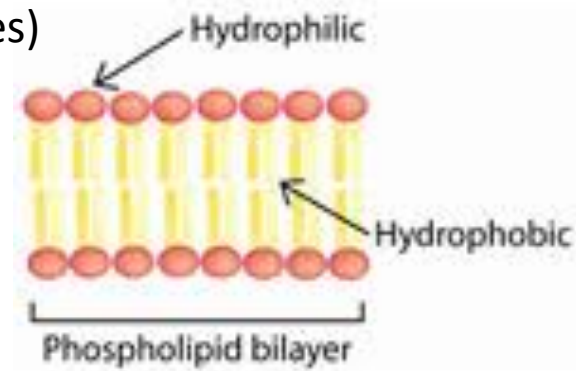
L-Sérine



L-Lysine

Grandes molécules :

- phospholipides (membranes)



- polynucléotides

ADN (1 %)

ARN (6 %)

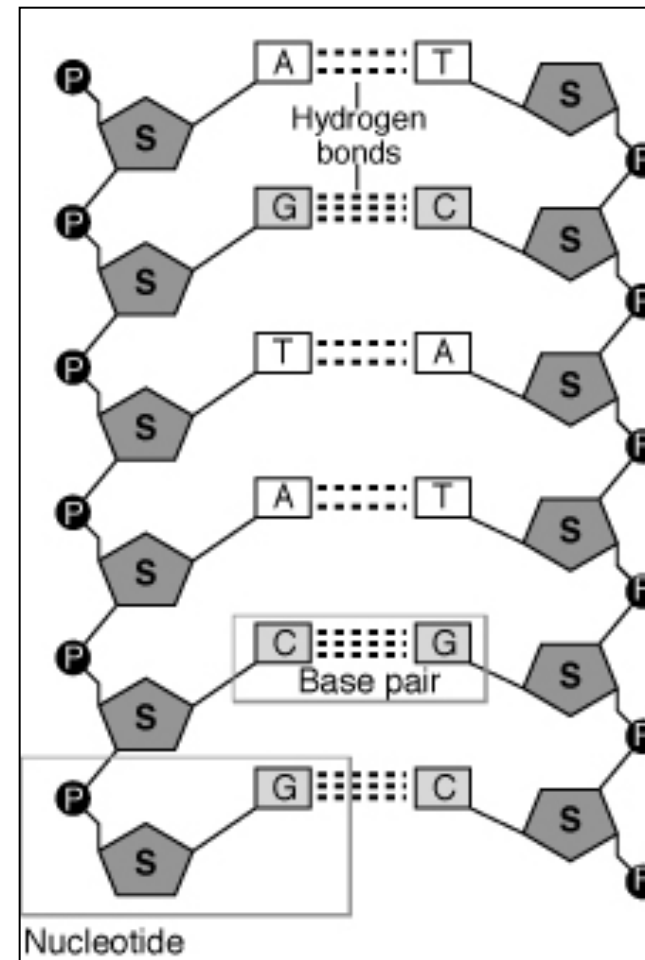
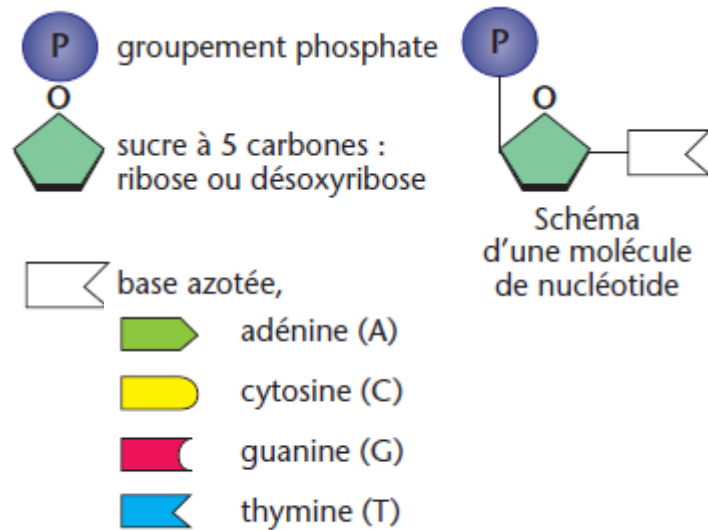
- polypeptides (15%)

- polysaccharides

Introduction – ADN

Acide Désoxyribo Nucléique

Structure primaire = polymère dont le motif est un des 4 nucléotides



Introduction – ADN

Structure secondaire = double hélice

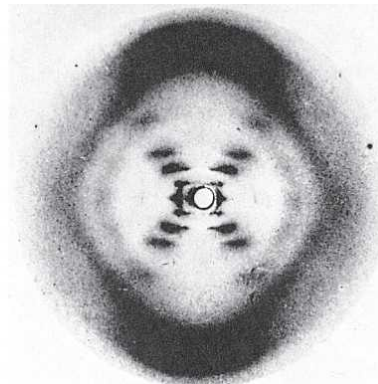
1947 Erwin Chargaff

$$\begin{array}{l} \% A \approx \% T \\ \% G \approx \% C \end{array}$$

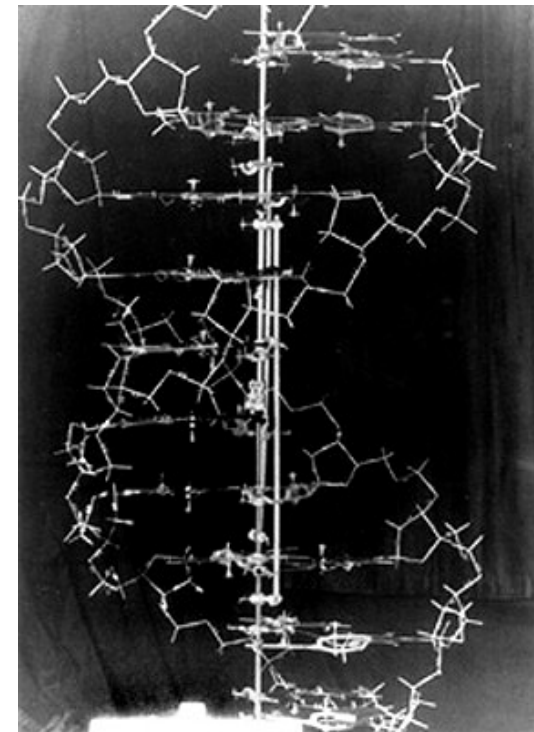
Ex. chez l'Homme :

A = 30.9 %, T = 29.4%, G = 19.9 % et C = 19.8 %

1953 Rosalyn Franklin, Francis Crick et James Watson



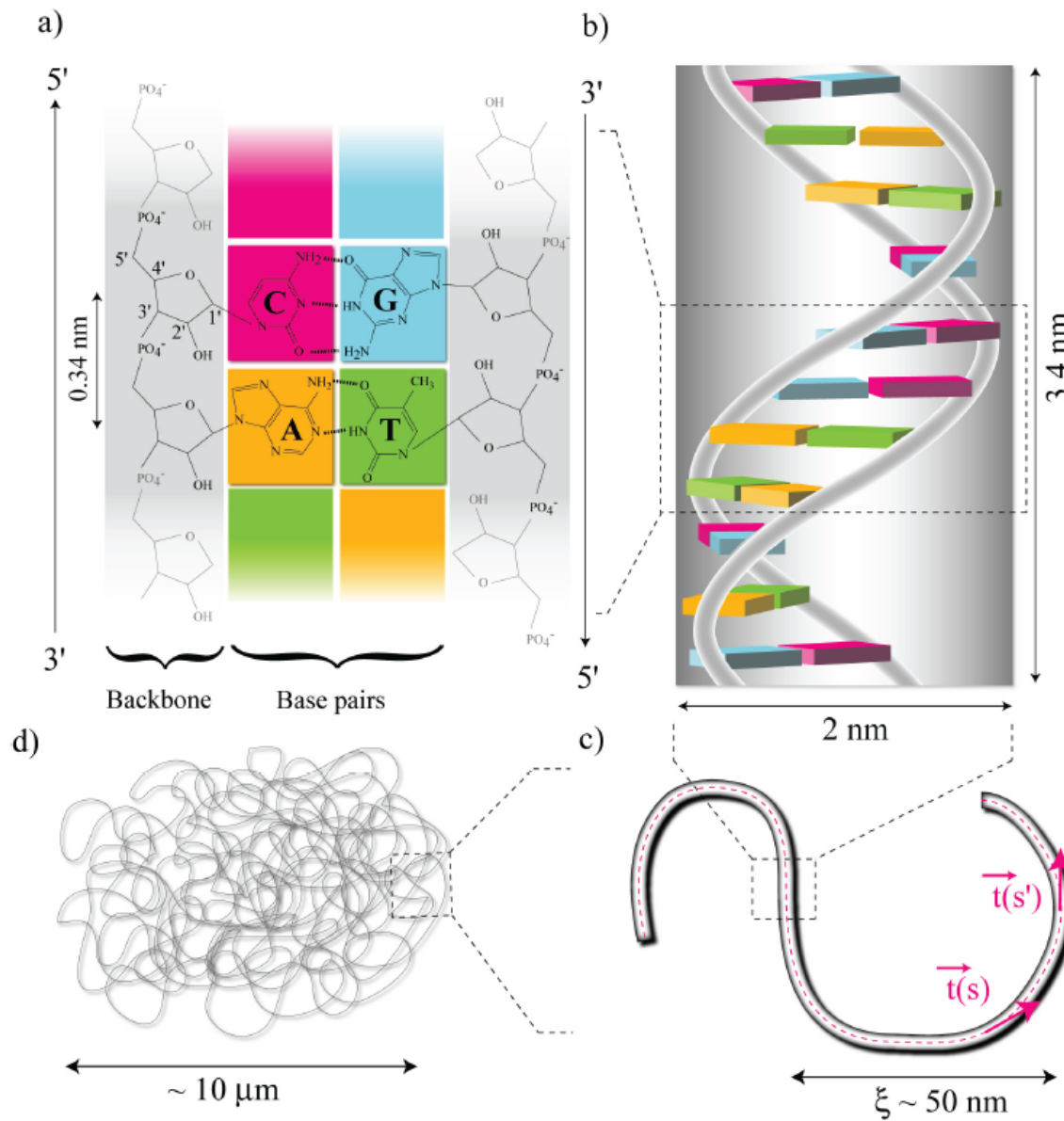
R. Franklin - Diffraction par rayon X d'un cristal d'ADN



Watson et Crick proposent la structure en double hélice de l'ADN en 1953.

Introduction – ADN

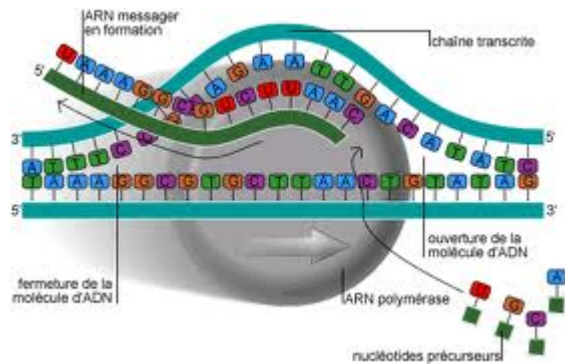
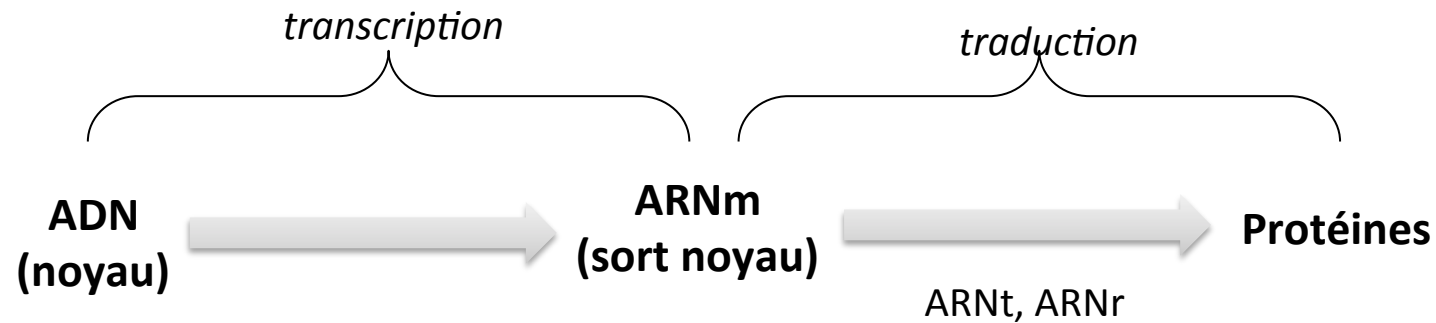
Tailles caractéristiques



Chromosome *E. coli*
($4,6 \cdot 10^6$ pb)

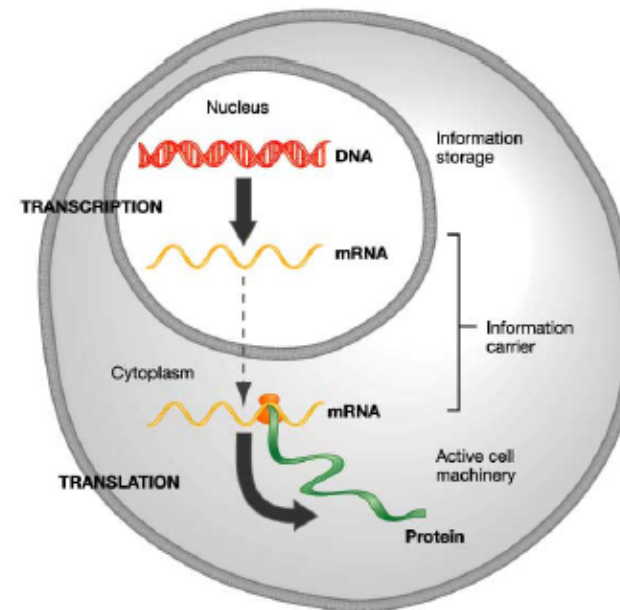
Introduction – Le dogme central de la biologie

Synthèse des protéines à partir du code de l'ADN en deux étapes



A T G C = ADN

A U G C = ARN



Les séquences des nucléotides déterminent les protéines qui sont fabriquées ...
..... vision réductrice !

Partie I – Description physique d'une molécule d'ADN

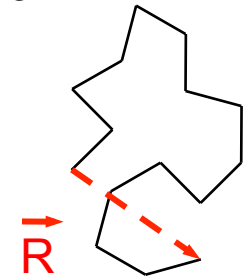
Physique de l'ADN

ADN = polymère linéaire : succession de N segments de taille a

I-A1. Grandeurs caractéristiques des polymères

- Distance bout à bout $\vec{R} = \sum_{i=1}^N \vec{r}_i$

A cause des fluctuations thermiques, le polymère adopte plusieurs configurations.
Il faut donc considérer la moyenne thermique, système isotrope : $\langle \vec{R} \rangle = \vec{0}$



- Distance quadratique moyenne (norme):

Caractérise la taille de la pelote

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = \sum_{i=1}^N \langle r_i^2 \rangle + 2 \sum_{i=1}^N \sum_{j=i}^{N-i} \langle \vec{r}_i \vec{r}_{i+j} \rangle$$

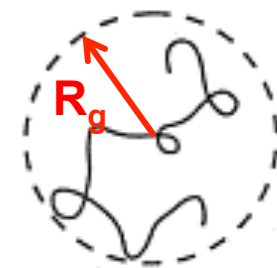
- Rayon de giration:

Mesure l'étendue spatiale occupée par un polymère

Distance moyenne entre monomères et le centre de masse

Mesuré expérimentalement

$$\langle \vec{R}_g^2 \rangle = \frac{\sum_{i=1}^N m_i \langle (\vec{r}_i - \vec{r}_{CM})^2 \rangle}{\sum_{i=1}^N m_i} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle (\vec{r}_i - \vec{r}_{CM})^2 \rangle$$



Physique de l'ADN

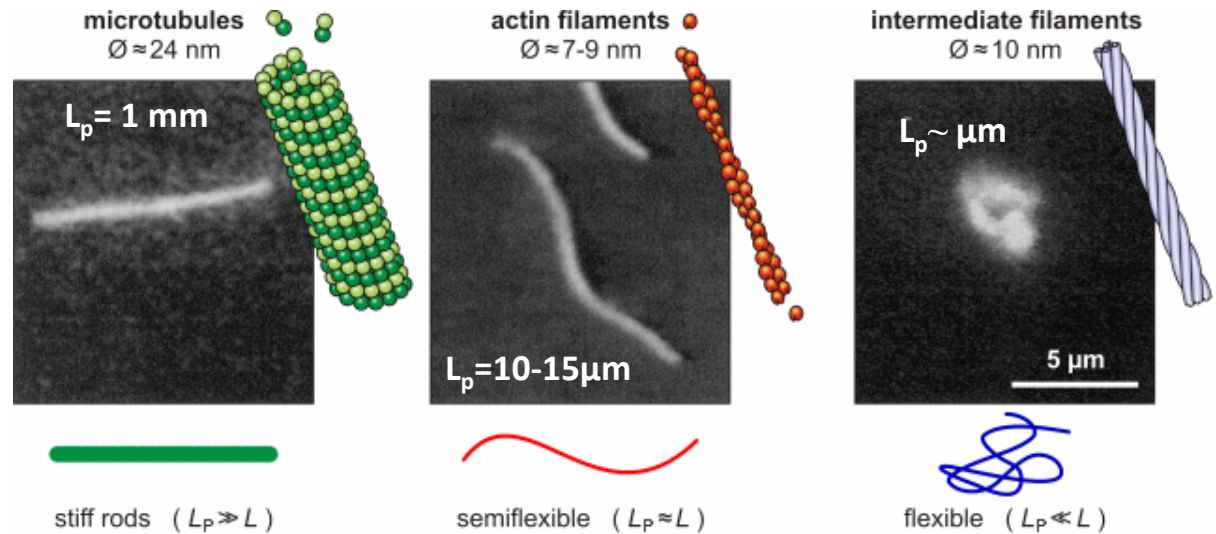
I-A1. Grandeurs caractéristiques

- Longueur de persistance

Caractéristique de la rigidité du polymère: à quel point sont corrélés les segments i et j ?

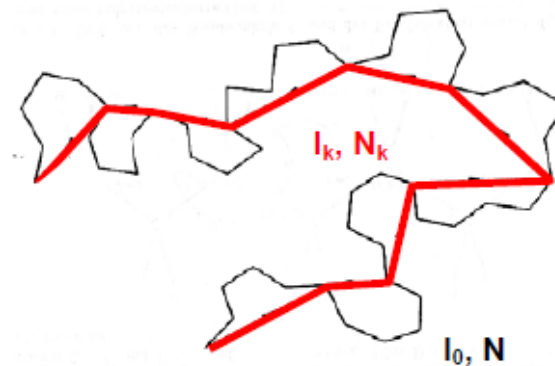
$$L_P = \lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^N \left\langle \frac{\vec{R}_1 \vec{R}_i}{|R_1|} \right\rangle$$

$$L_P = \frac{\kappa}{k_B T}$$



- Segments de Kuhn

$$L_K = \frac{\langle \vec{R}^2 \rangle}{L_P}$$



Physique de l'ADN – comportement en solution

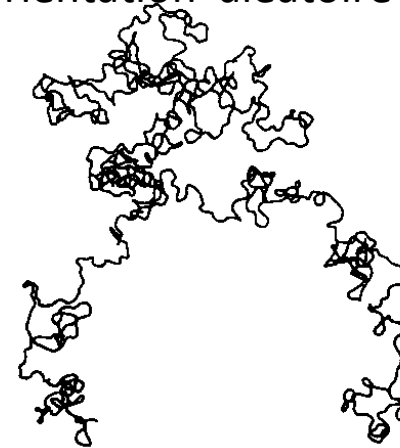
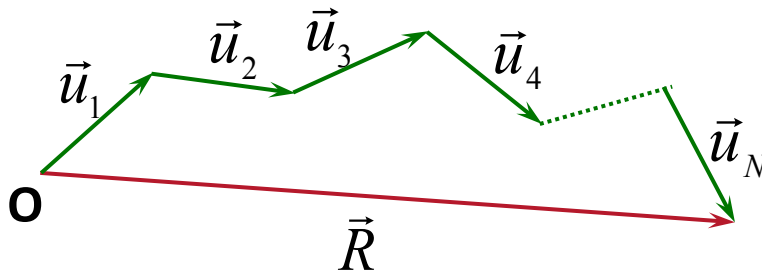
Question : comportement en solution d'une molécule d'ADN ?

Hypothèse : bon solvant, régime dilué: le polymère est sous forme de pelote



I-A2. Pelote Gaussienne – Freely Joined Chain (FJC)

- Description la plus simple
- Chaîne idéale non perturbée : pas d'influence du solvant ni des autres segments
- Equivalent à une marche au hasard : chaque segment a une orientation aléatoire par rapport à ses voisins



Quelle est la distance bout à bout d'une molécule d'ADN de N segments de taille a ?

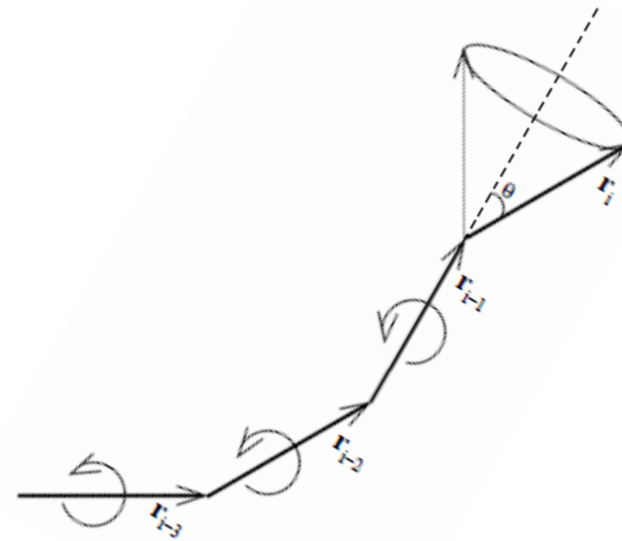
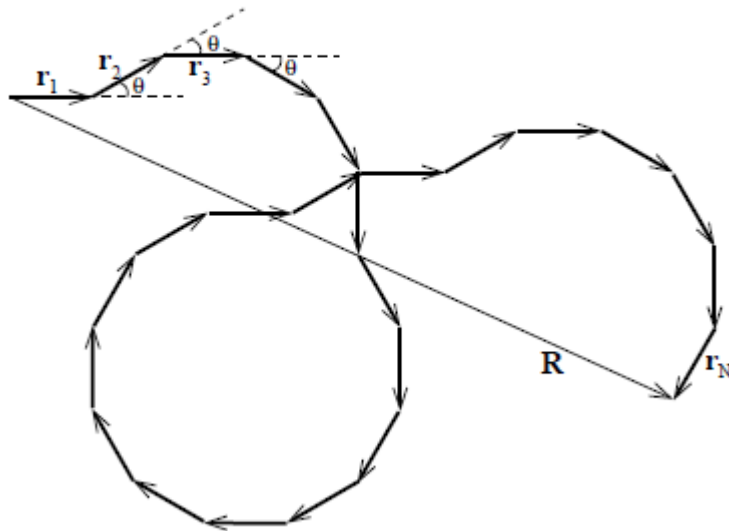
Application: ADN double brin du phage λ (50 kpb)

$$\text{On a : } \langle R_G^2 \rangle = \frac{\langle \vec{R}^2 \rangle}{6}$$

Physique de l'ADN – comportement en solution

I-A1 variante à la marche aléatoire 3D – Freely Rotating chain (FRC)

l'angle θ entre 2 segments successifs est fixé

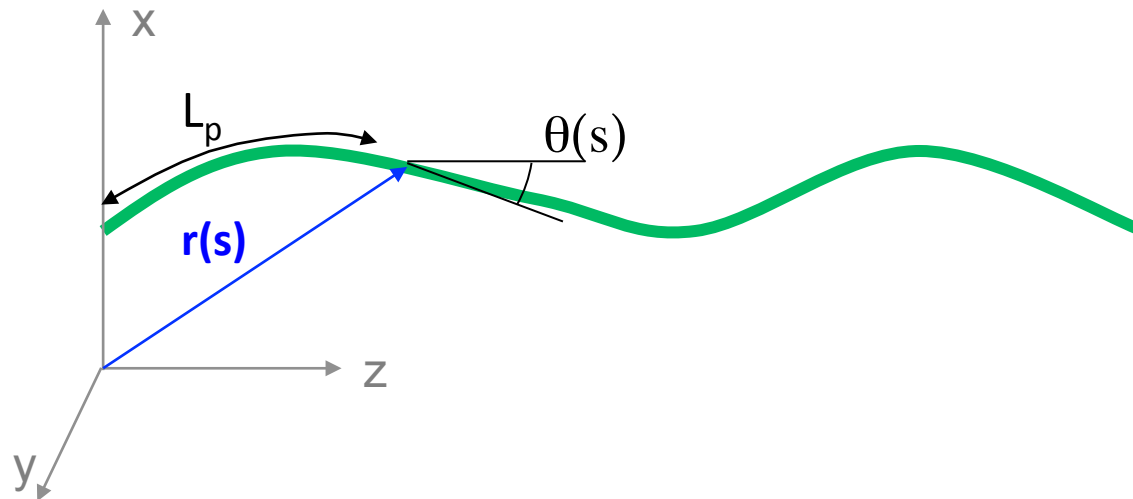


Montrer que $\langle \vec{R}^2 \rangle = Na^2 \frac{1 + \cos \theta}{1 - \cos \theta}$

Physique de l'ADN – comportement en solution

I-A2. Modèle du ver - Worm Like Chain (WLC)

- Modèle continu
- Rigidité intrinsèque de la chaîne



$$\langle \vec{t}(s) \cdot \vec{t}(s') \rangle = e^{-|s-s'|/L_p}$$

- Existence d'une longueur de corrélation le long de la chaîne, égale à la longueur de persistance de l'ADN.

Pour l'ADN double brin, 10 mM NaCl, $L_p = 150 \text{ pb} = 50 \text{ nm}$
(Segments de Kuhn $L_k = 100 \text{ nm}$)

Physique de l'ADN – comportement en solution

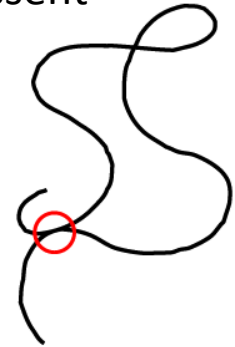
I-A3. Chaîne auto-évitante - Self Avoiding Chain

- « Chaîne réelle » : deux segments de la chaîne ne peuvent occuper le même espace
- existence d'un volume exclu: si deux monomères se chevauchent, ils se repoussent
- description par une marche aléatoire auto-évitante

⇒ $\langle \vec{R}^2_{Gaussien} \rangle$ est sous évalué.

$$\langle \vec{R}^2_{g,Flory} \rangle = aN^\nu \quad \nu \text{ ne dépend que de la dimension de l'espace}$$

bon solvant + 3D, $\nu = 0,588$



Rq: on a supposé être en situation de « bon solvant ». Or, la solubilisation d'un polymère dépend de:

- température
 - nature du solvant
 - nature du polymère
- } affinité chaîne / solvant

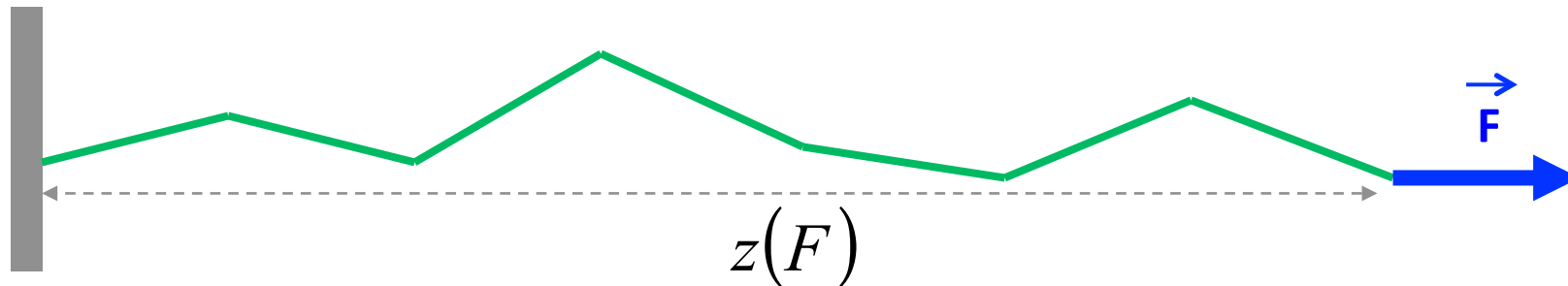


Paul Flory

I-B1. Elasticité de l'ADN

Les expériences à l'échelle de la molécule unique permettent de:

- accrocher une des extrémités d'UNE molécule d'ADN à une surface
- appliquer une force contrôlée à l'extrémité libre du polymère



⇒ l'ADN tend à s'aligner dans la direction de cette force :

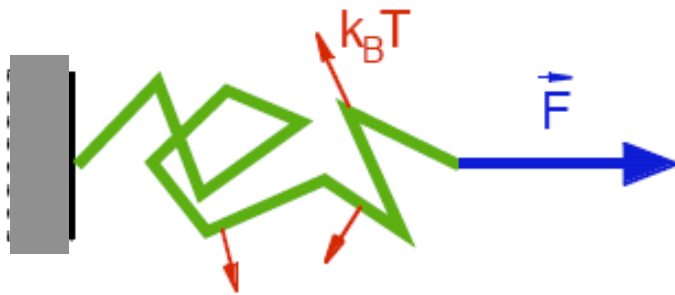
Question : allure de la courbe force –extension de l'ADN ?

Intérêt :

- obtention de la courbe force extension pour de l'ADN nu
- ajout de protéines agissant sur l'ADN
- détermination des forces , des mécanismes,

I-B1. Elasticité de l'ADN : deux modèles

Le plus simple
Freely Jointed Chain (FJC)



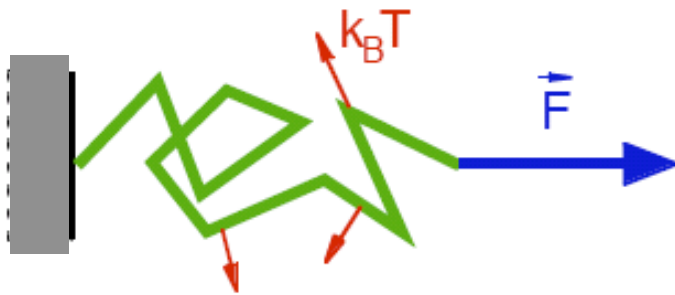
Extension moyenne z :

$$z(F) = NbL \left(\frac{Fb}{k_B T} \right)$$

où L est la fonction de Langevin

I-B1. Elasticité de l'ADN : deux modèles

Le plus simple
Freely Jointed Chain (FJC)



Extension moyenne z :

$$z(F) = NbL \left(\frac{Fb}{k_B T} \right)$$

où L est la fonction de Langevin

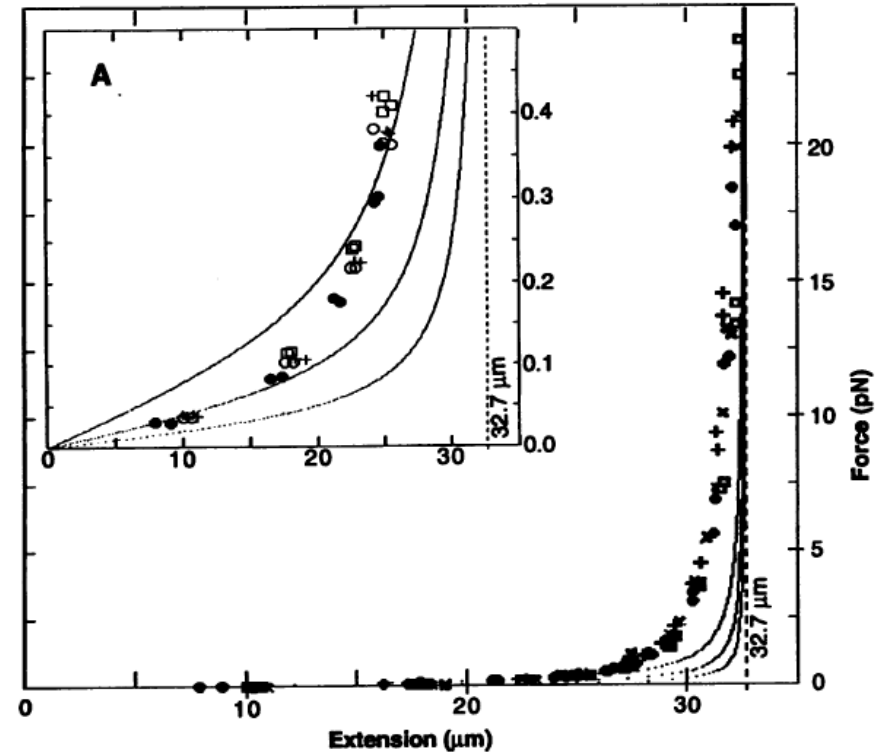
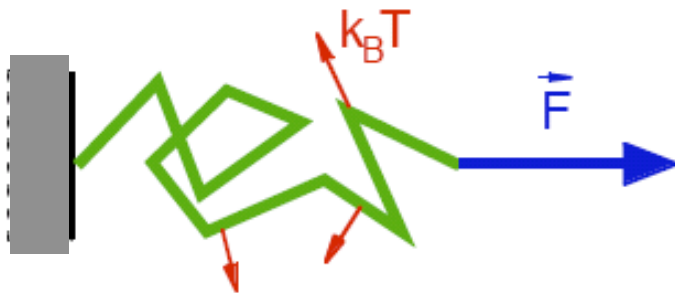


Fig. 3. (A) Force versus extension data for four different λ -dimer molecules (\bullet , \square , $+$, and \circ) in 5 mM Na_2HPO_4 buffer (10 mM Na^+ , pH 8.3). Inset: expanded vertical scale (0 to 0.5 pN). Continuous curves are from Eq. 2 assuming $L = 32.7 \mu\text{m}$ and $b = 500 \text{ \AA}$ (top), 1000 \AA (middle), and

I-B1. Elasticité de l'ADN : deux modèles

Le plus simple
Freely Jointed Chain (FJC)



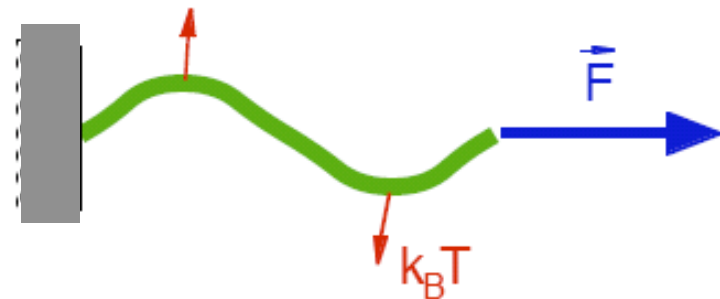
Extension moyenne z :

$$z(F) = NbL \left(\frac{Fb}{k_B T} \right)$$

où L est la fonction de Langevin

Smith *et al* (1995)

Energie de courbure
Worm-like Chain Model (WLC)



Force en fonction de l'extension z :

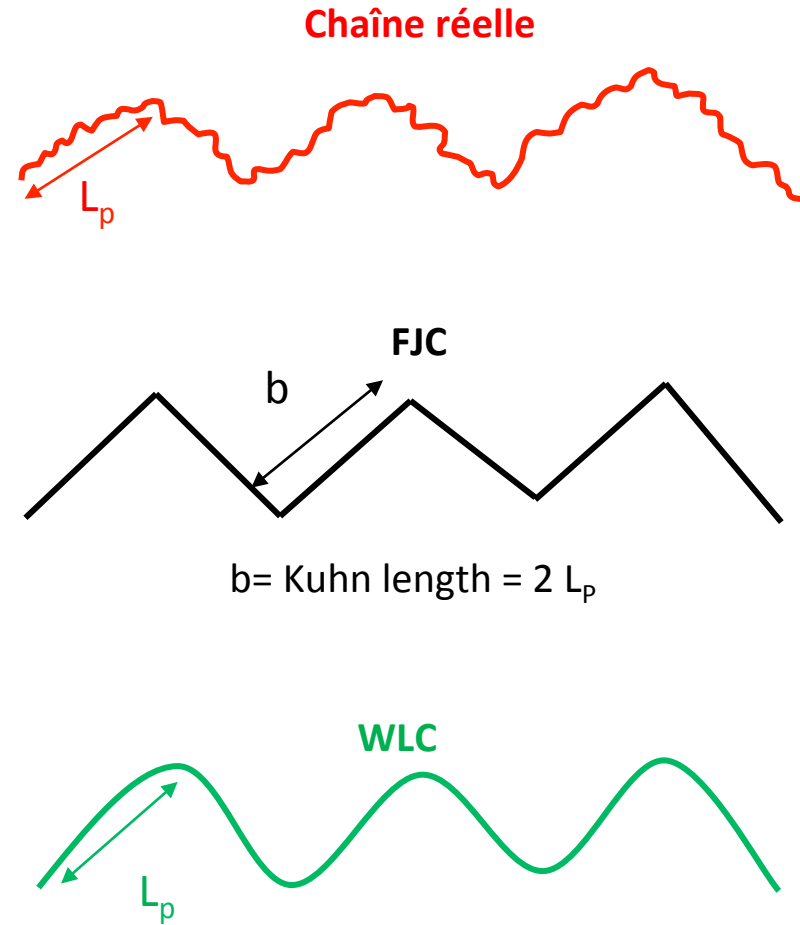
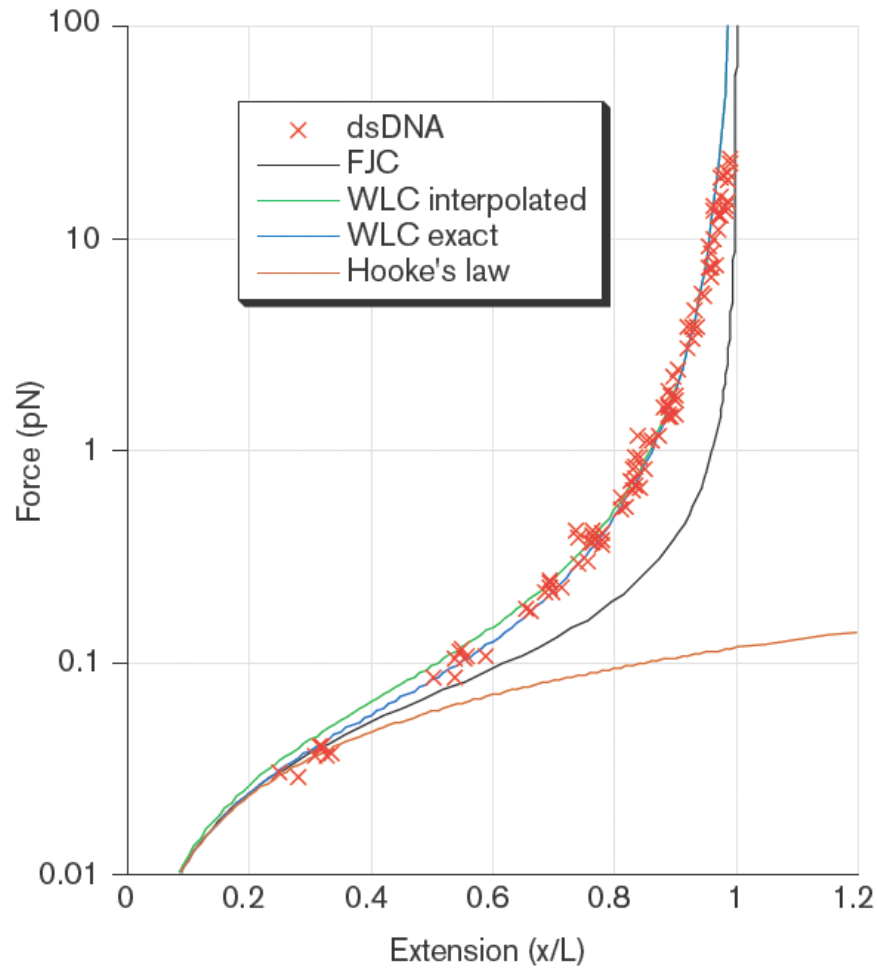
$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1 - z/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L} \right]$$

où L_p est la longueur de persistance,
 L la longueur totale

Marko & Siggia *et al* (1995)

I-B2. Courbe forces extension de l'ADN double brin

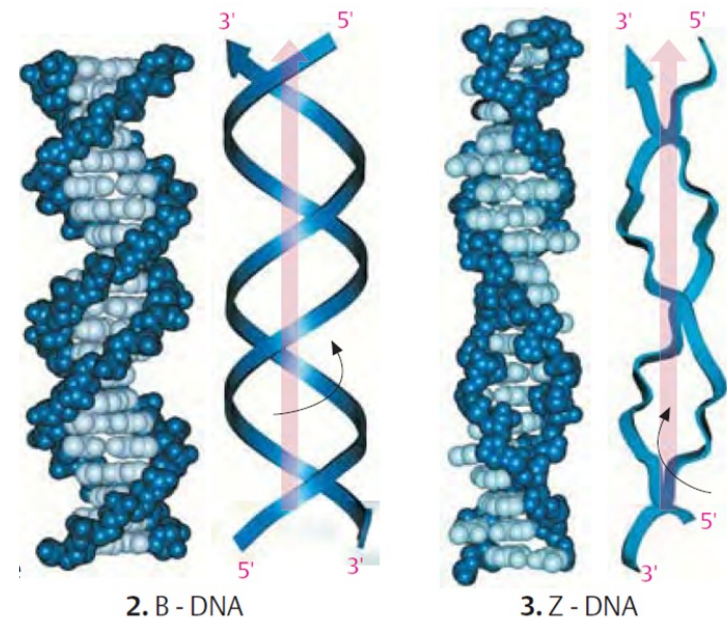
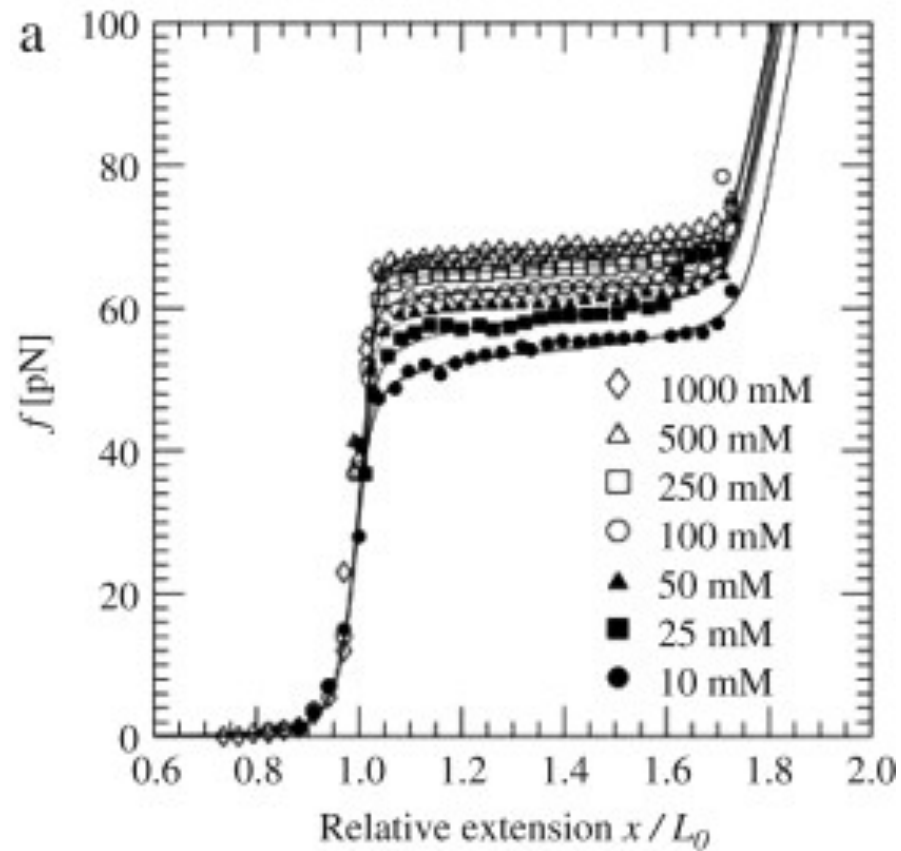
λ phage dsDNA, persistence length $L_p=53$ nm



Elasticité de l'ADN

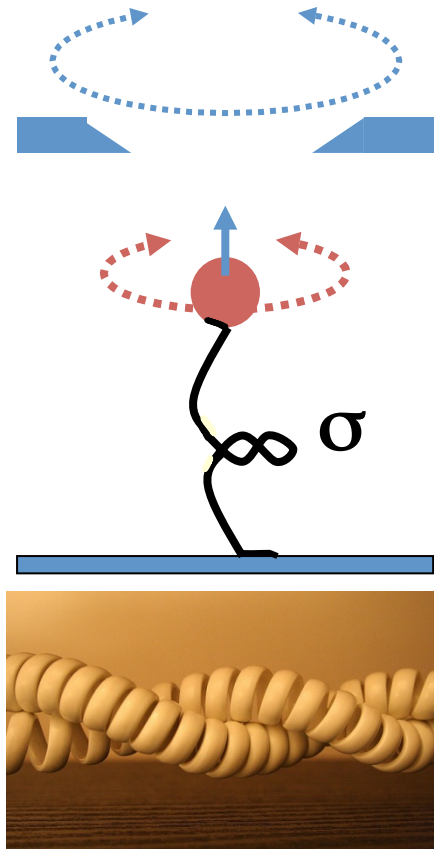
I-B3. Sur-extension de l'ADN double brin

Transition structurale de l'ADN



Elasticité de l'ADN

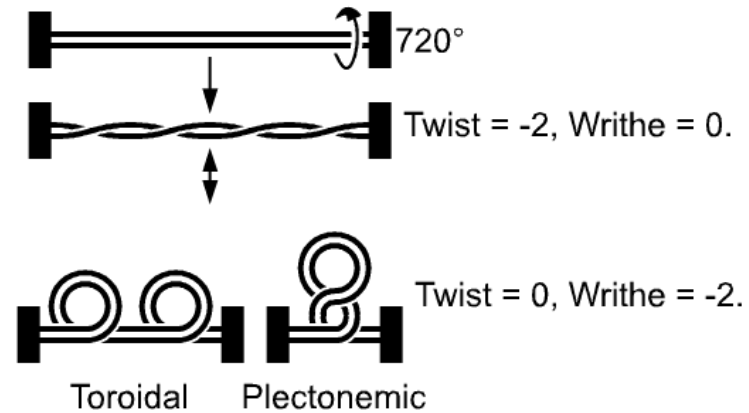
I-B4. Sur-enroulement de l'ADN



L'ADN possède de la **torsade** (T_w) et de la **vrille** (W_r)

T_w : nombre de tours qu'effectue un simple brin d'ADN autour de l'autre brin

W_r : caractérise le chemin tridimensionnel suivi par l'axe du ruban la double hélice.

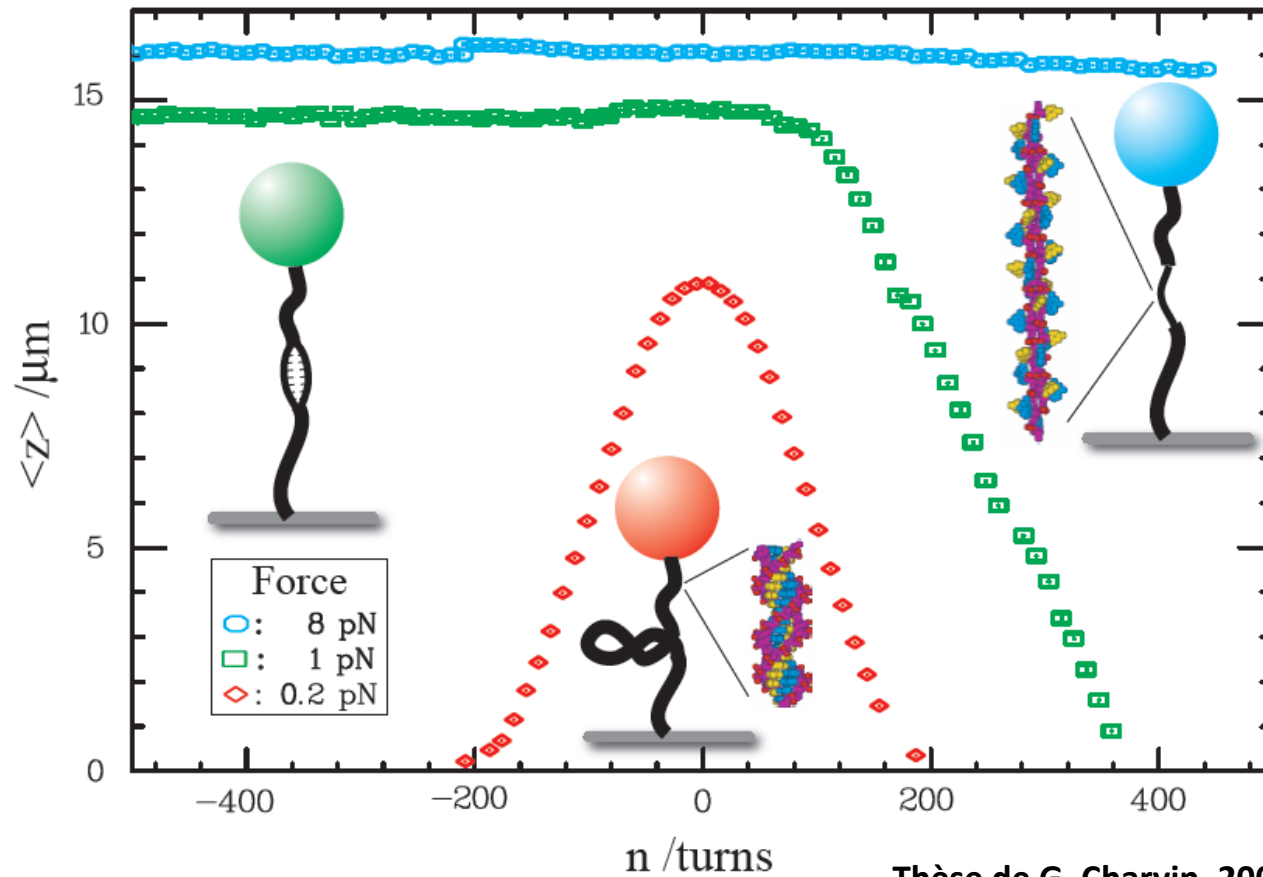


Indice d'enlacement : $L_k = T_w + W_r$

Etat d'enroulement de la molécule $\sigma = \frac{\Delta L_k}{L_{k,0}}$ où $L_{k,0} = \frac{N}{h}$

Elasticité de l'ADN

I-B4. Sur-enroulement de l'ADN



Thèse de G. Charvin, 2004

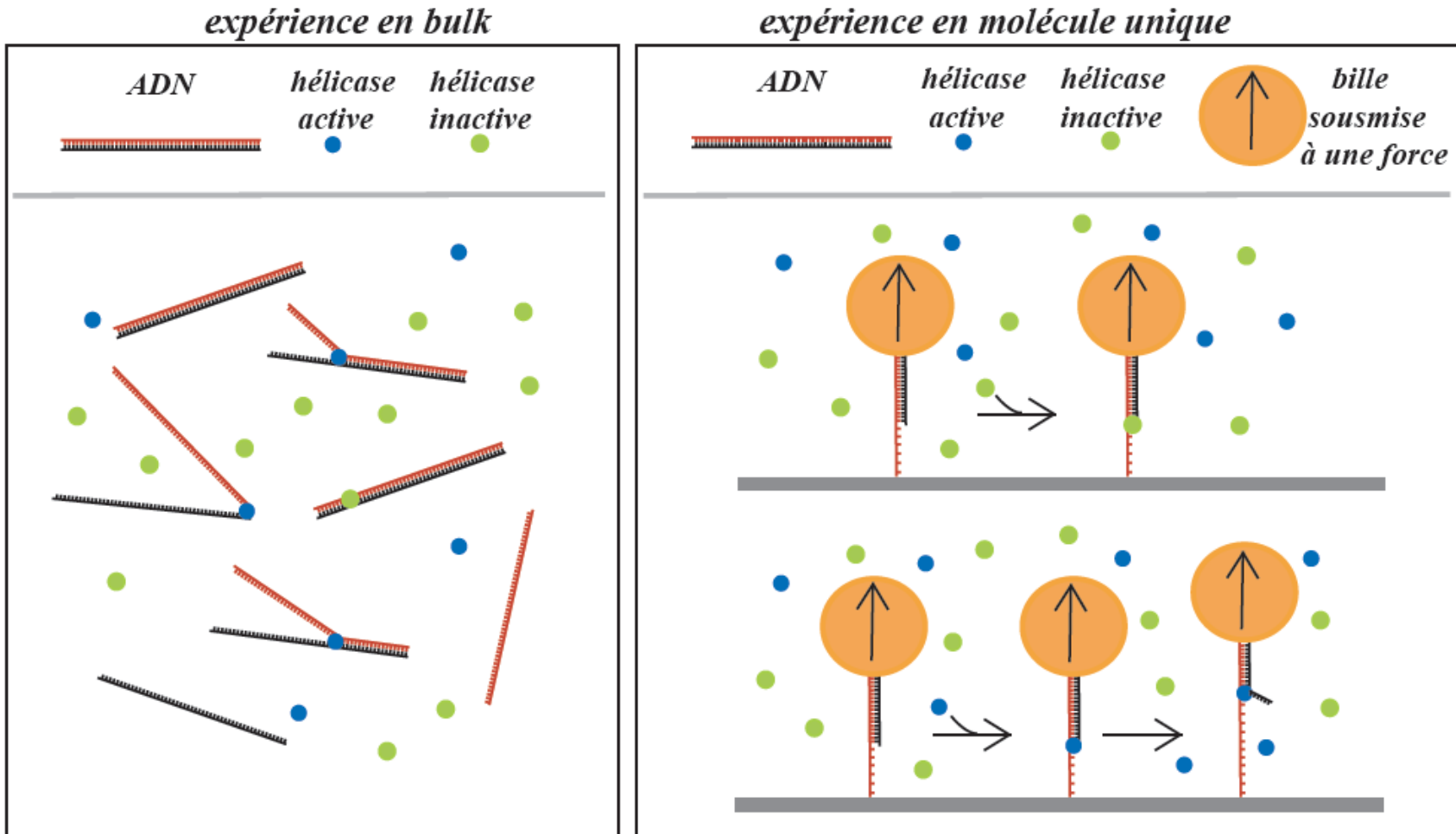
In vivo, l'ADN est super-enroulé $\sigma = -0.05$ (5 %):

- compaction
- transcription
- réplication

Partie II – Manipuler une UNIQUE molécule d'ADN

Etudes en molécules uniques

II-A1. Intérêts des études en molécules uniques



Etudes en molécules uniques

II-A1. Intérêts des études en molécules uniques

Intérêt 1 : s'affranchir des moyennes d'ensemble

les mesures d'ensemble gomment 2 types de désordre :

- désordre statique qui rend compte de l'hétérogénéité : l'analyse molécule par molécule permet d'identifier les inhomogénéités dans l'échantillon
- désordre dynamique: en mesurant l'état d'une molécule au cours du temps, on peut déterminer les constantes cinétiques qui gouvernent son évolution, même si on est à l'équilibre

Intérêt 2 : description plus détaillée

Les études à l'échelle de la molécule unique offrent

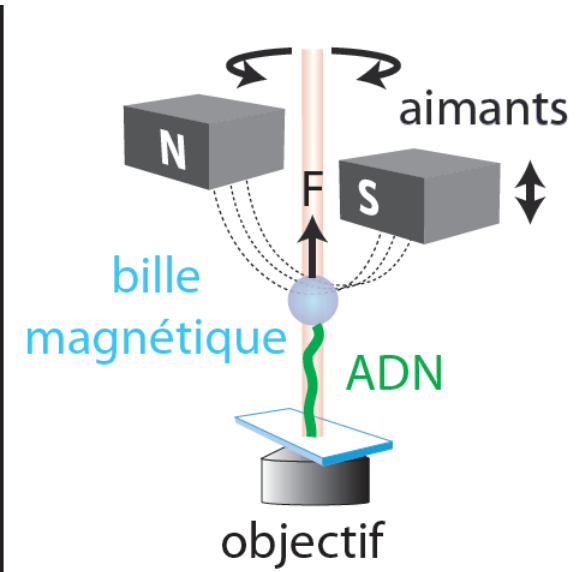
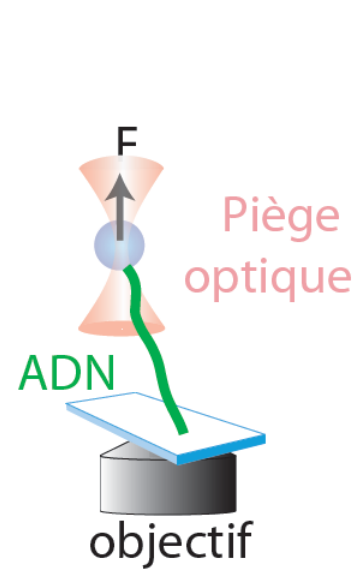
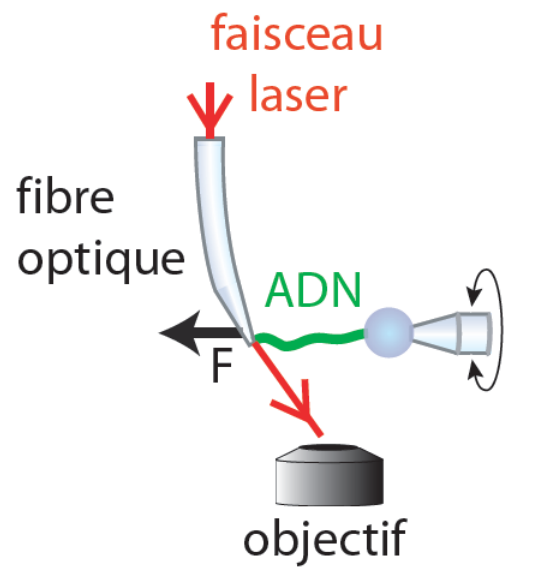
- Information plus fine
- Observation d'effet impossible à appréhender autrement (rotation FTPase)

Inconvénient

Taille de la population plus petite \Rightarrow erreur statistique plus grande, T_{exp} plus long

Etudes en molécules uniques

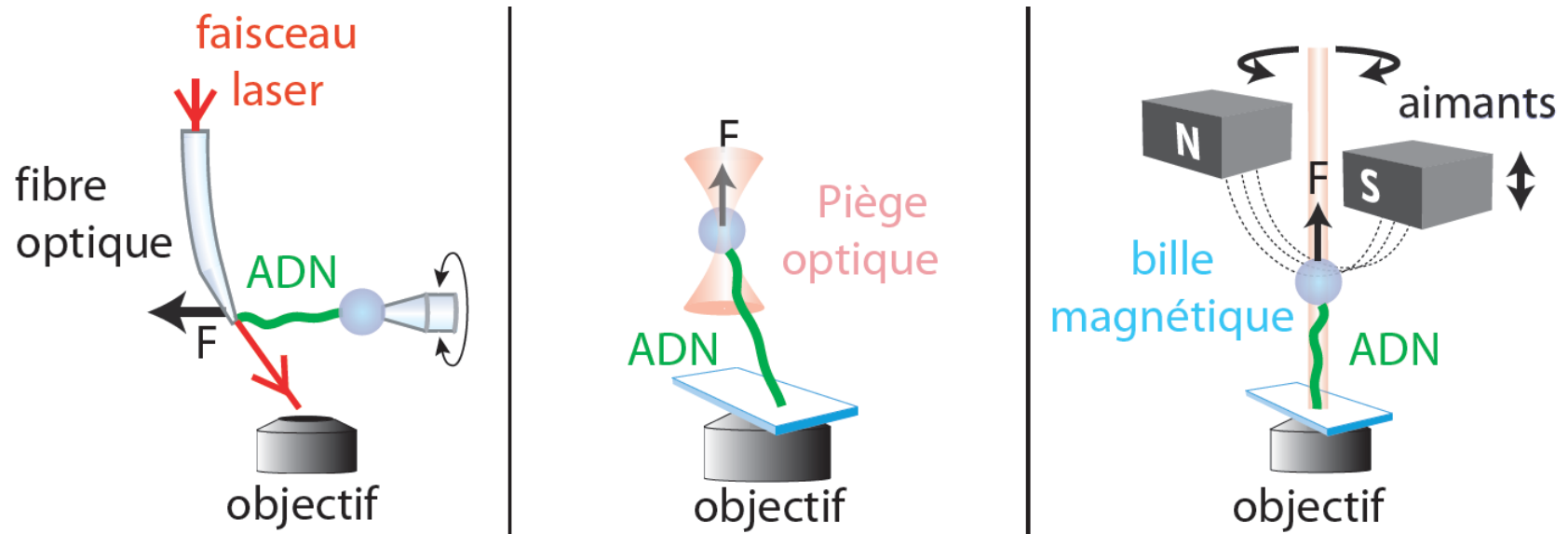
II-A2. Technique de manipulation de molécules individuelles d'ADN



Méthodes	$F_{\min - \max}$ (N)	δx_{\min} (m)	Stiffness (N m ⁻¹)
Cantilevers	10^{-11} - 10^{-7}	10^{-10}	0.001-100
Microfibres	10^{-12} - 10^{-10}	10^{-9}	10^{-6} -1
Pinces magnétiques	10^{-14} - 10^{-11}	10^{-8}	$\sim 10^{-9}$
Pinces optiques	10^{-13} - 10^{-10}	10^{-9}	10^{-10} - 10^{-3}

Etudes en molécules uniques

II-A2. Technique de manipulation de molécules individuelles d'ADN



Intérêts :

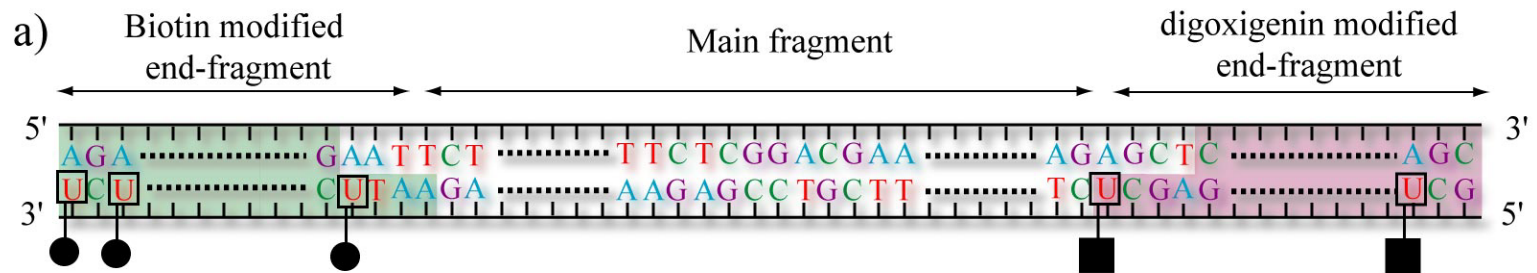
- Mesures directes des propriétés mécaniques de l'ADN
- Etudier les interactions ADN/ protéines : force / couple / mécanisme ...
- Ex : la connaissance de propriétés d'élasticité et de torsion de l'ADN donne des informations sur la réplication de l'ADN et la transcription

Etudes en molécules uniques

II-A2. Technique de manipulation de molécules individuelles d'ADN

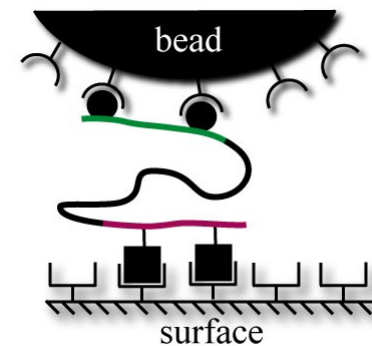
Comment attacher une molécule d'ADN à une surface ?

1 - Fonctionnaliser une molécule d'ADN



2- Ancrage :

$$E_{I(\text{biotine} - \text{streptavidine})} = 35K_B T$$



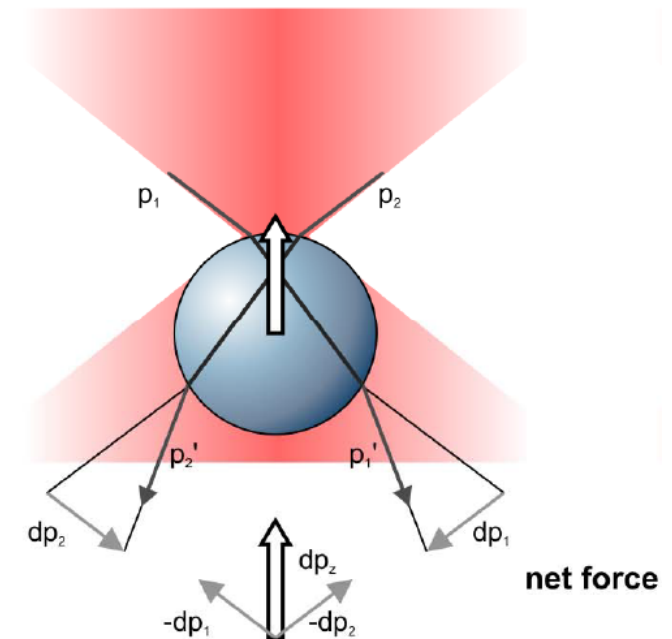
II-B1. Pinces Optiques

Principe:

- Faisceau laser IR focalisé sur des billes diélectriques telles que $n_{\text{bille}} > n_{\text{milieu}}$ (typiquement des billes de silice, $\varnothing \sim 1\mu\text{m}$). Deux forces sont présentes : réflexion / réfraction.

Il faut que $\|\vec{F}_{\text{réflexion}}\| \ll \|\vec{F}_{\text{réfraction}}\|$

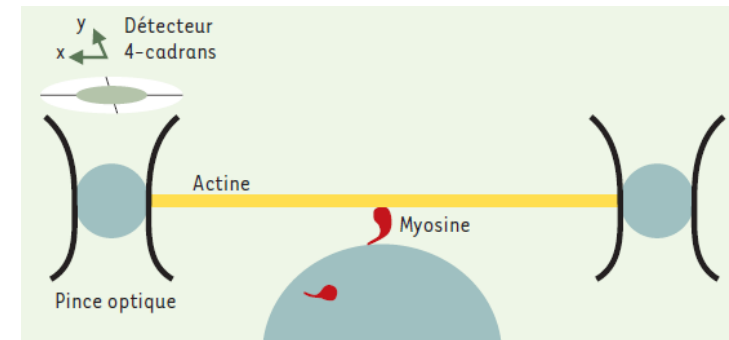
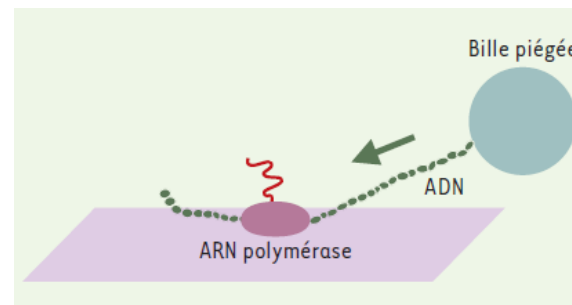
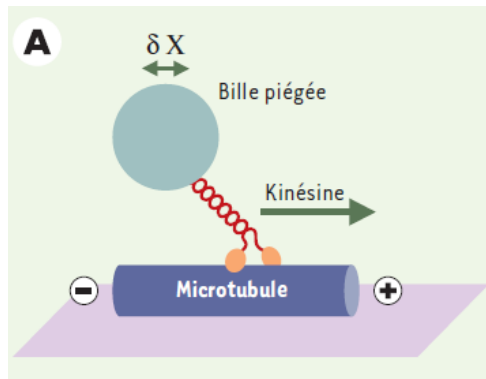
- Au niveau du plan focal : faisceau gaussien $\varnothing \sim 0,5 \mu\text{m}$
- Taille des objets piégés: nm - μm
- Forces engendrées $\sim 0,1 - 100 \text{ pN}$
- Calibration nécessaire pour chaque bille piégée
- Distance piège-échantillon imposée, mesure de la force résultante



Pinces Optiques

Applications :

1. Mesures des propriétés élastiques des polymères biologiques
 - courbe force – extension de l'ADN
 - élasticité membrane globule rouge
2. Analyse du fonctionnement des moteurs moléculaires (cf. TD #1)
 - kynésine: k faible pour mesurer le pas élémentaire, k fort: force maximale
 - ARN polymérase: force produite au cours de la transcription
 - Myosine



Coirault *et al*, *Medecine Sciences* 19, 2003

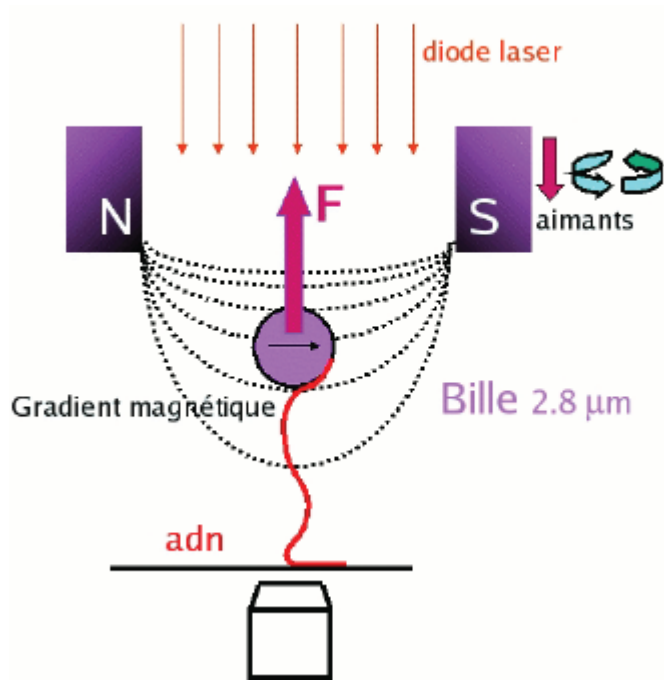
3. Manipulation de cellules (bactéries, virus, globule rouge, cellule épithéliales ...): mesures propriétés motrices (cf. Cours #3)

Pinces Magnétiques

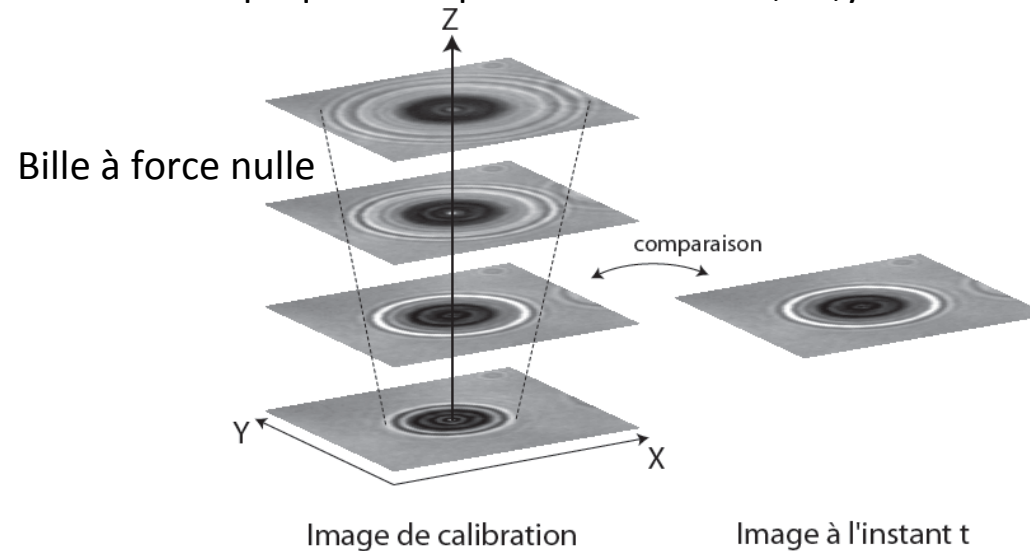
II-B2. Pinces Magnétiques

Principe:

- Utilisation de billes magnétiques ($\varnothing = 1 - 3 \mu\text{m}$) avec un champ magnétique.
- Force imposée en ajustant la distance aimant – échantillon
- Torsion possible



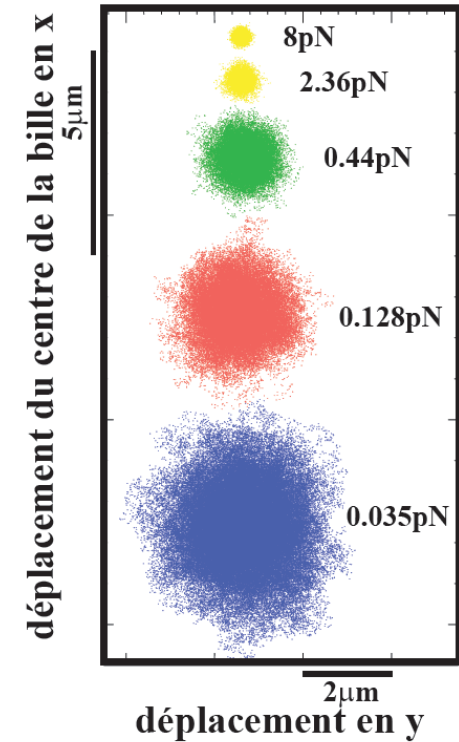
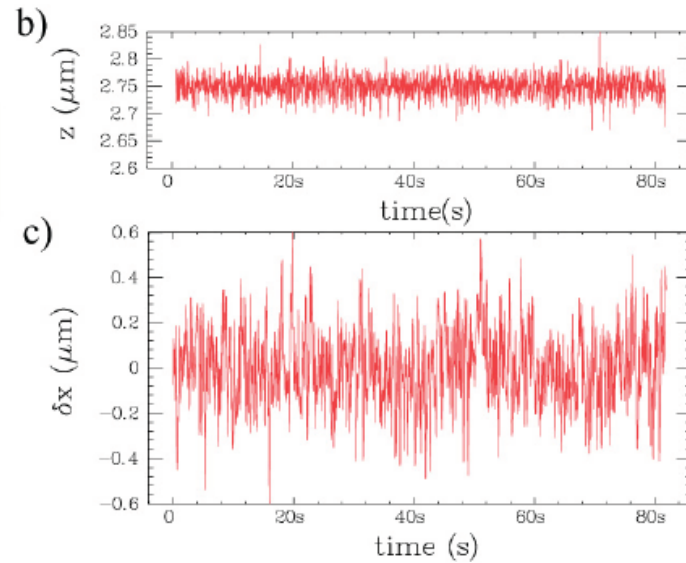
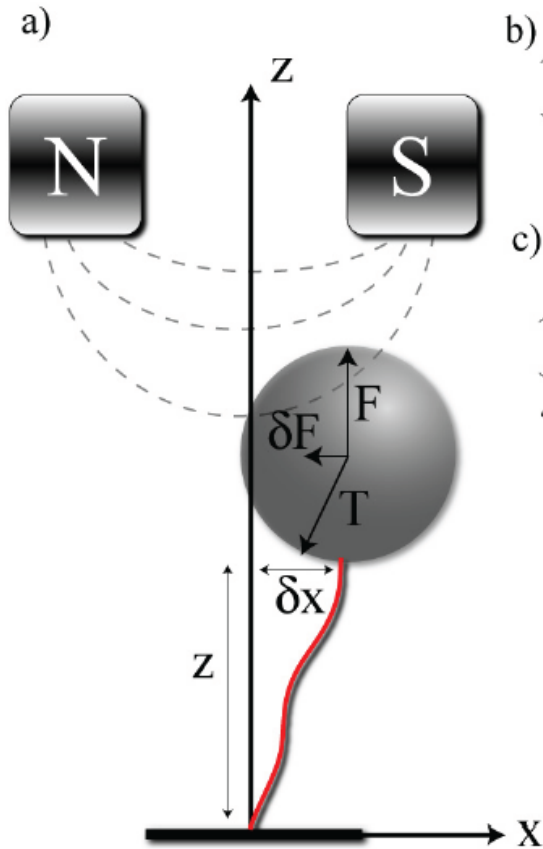
Mesure optique de la position de la bille, $\delta x, y = 1 \text{ nm}$



Pinces Magnétiques

II-B2. Pinces Magnétiques

Mesure de force par les fluctuations transverses $\frac{1}{2}k \langle \delta x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T$



Applications :

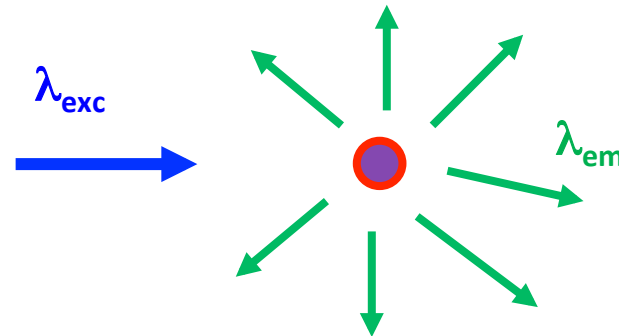
- courbe force – extension de l'ADN
- surenroulement de l'ADN
- activité enzymatique des ADN topoisomérase

Partie III – Détection optique de biomolécules individuelles

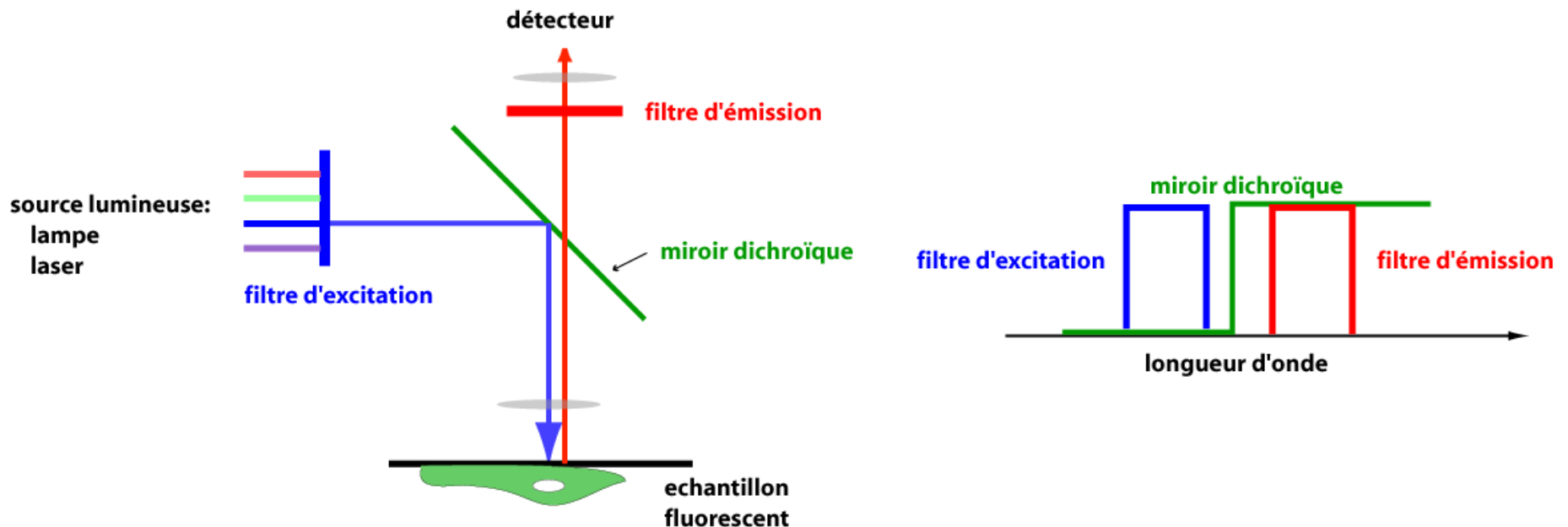
Détection de molécules fluorescentes - Principe

III-A1. La microscopie de fluorescence

Fluorescence : lorsqu'ils sont dans un niveau excité, certains systèmes (atomes, molécules, cristaux,...) peuvent se désexciter en émettant des photons et $\lambda_{em} > \lambda_{exc}$



Microscopie de fluorescence: sélection spectrale de la lumière émise



Détection de molécules fluorescentes - Principe

III-A2. Voir des molécules biologiques en microscopie de fluorescence

- En général, les molécules biologiques (protéines, acides nucléiques,...) ne sont pas fluorescentes dans le visible (quelques exceptions: flavines, NADH, GFP,...). Certains acides aminés ont néanmoins des propriétés de fluorescence dans l'UV (tryptophane).

- On attache spécifiquement des marqueurs fluorescents :

- * couplage covalent (liaison chimique)

- * marquage d'affinité: on utilise une molécule fluorescente qui vient s'attacher spécifiquement (anticorps, ...)

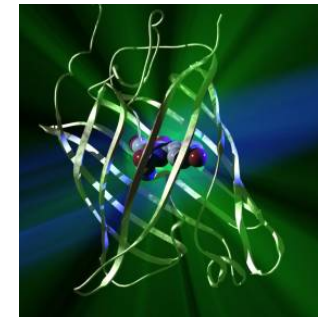
- * clonage d'une protéine fluorescente

- Les marqueurs fluorescents

- fluorophores organiques

- GFP: **Green Fluorescent Protein**, découverte en 1961 chez *Aequorea Victoria*, clonée en 1992

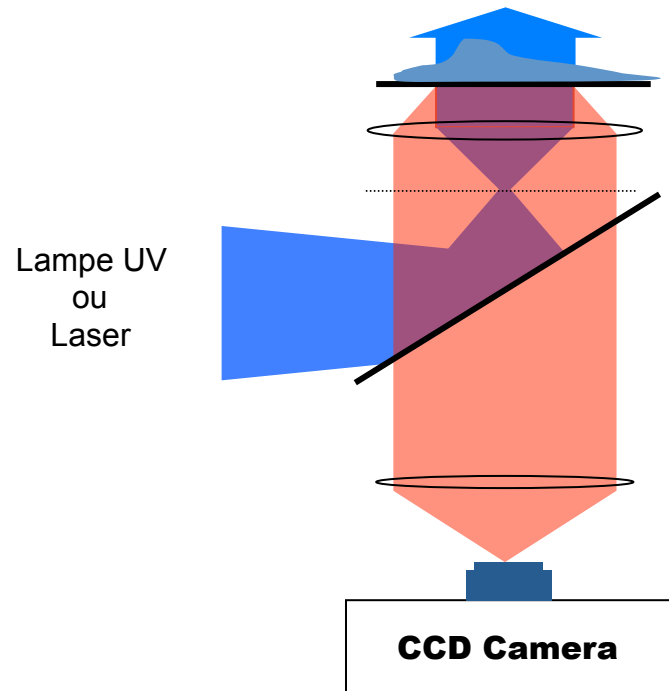
- semi-conducteurs : Qdot (quantum dot)



Détection de molécules fluorescentes - Approches

III-B1. Techniques de microscopie

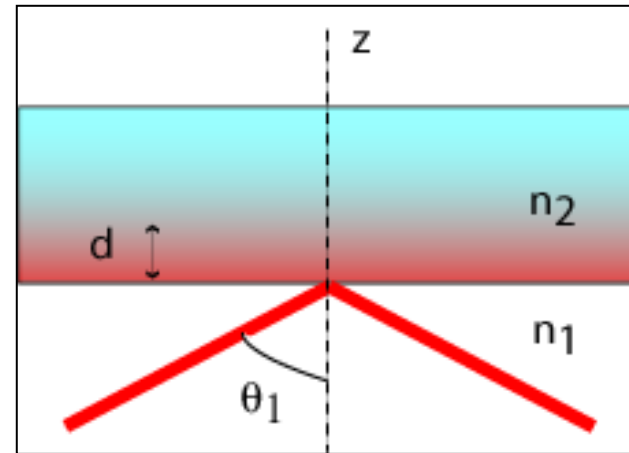
Epifluorescence



On éclaire l'échantillon avec une lumière collimatée. Pour cela, on focalise la lumière dans le plan focal arrière de l'objectif.

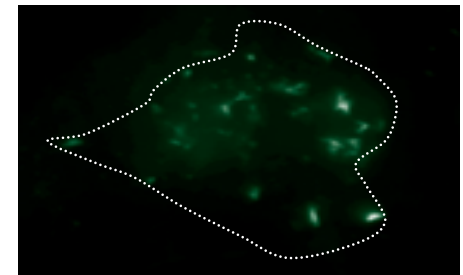
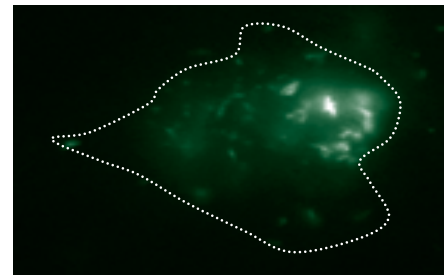
Dans un échantillon épais, on collecte la lumière de tous les plans de l'échantillon

TIRFM: onde évanescente



$$\theta_c = \arcsin(n_2 / n_1)$$

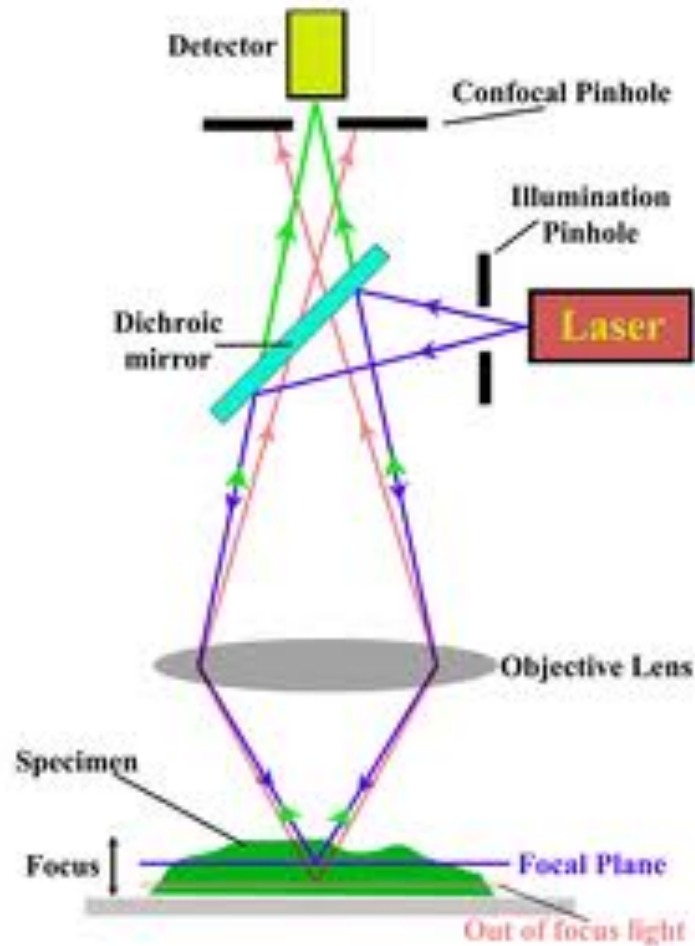
$$I(z) = I_0 e^{-z/d} \quad \frac{1}{d} = \frac{4\pi}{\lambda} \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}$$



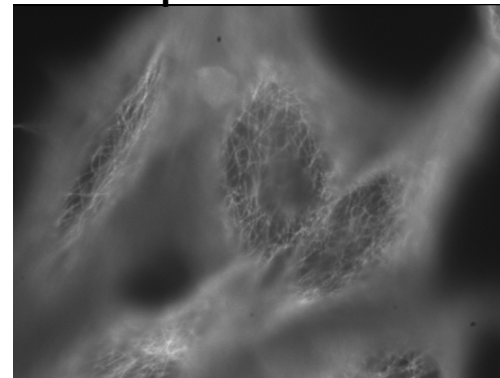
Détection de molécules fluorescentes - Approches

III-B1. Techniques de microscopie

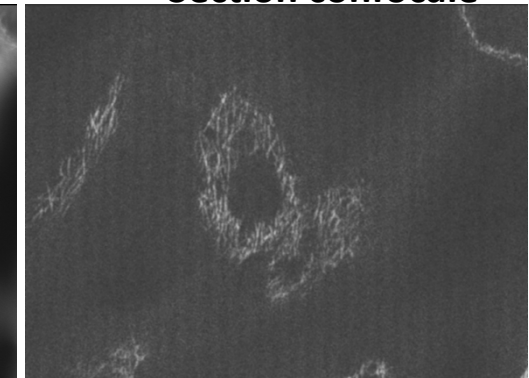
Microscopie confocale



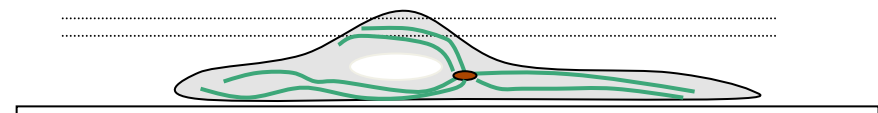
Epifluorescence



Section confocale

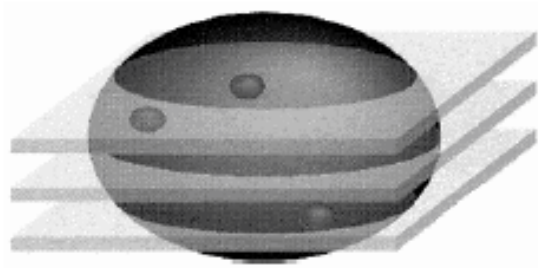


microtubules



On déplace le point de focalisation sur l'échantillon (balayage)

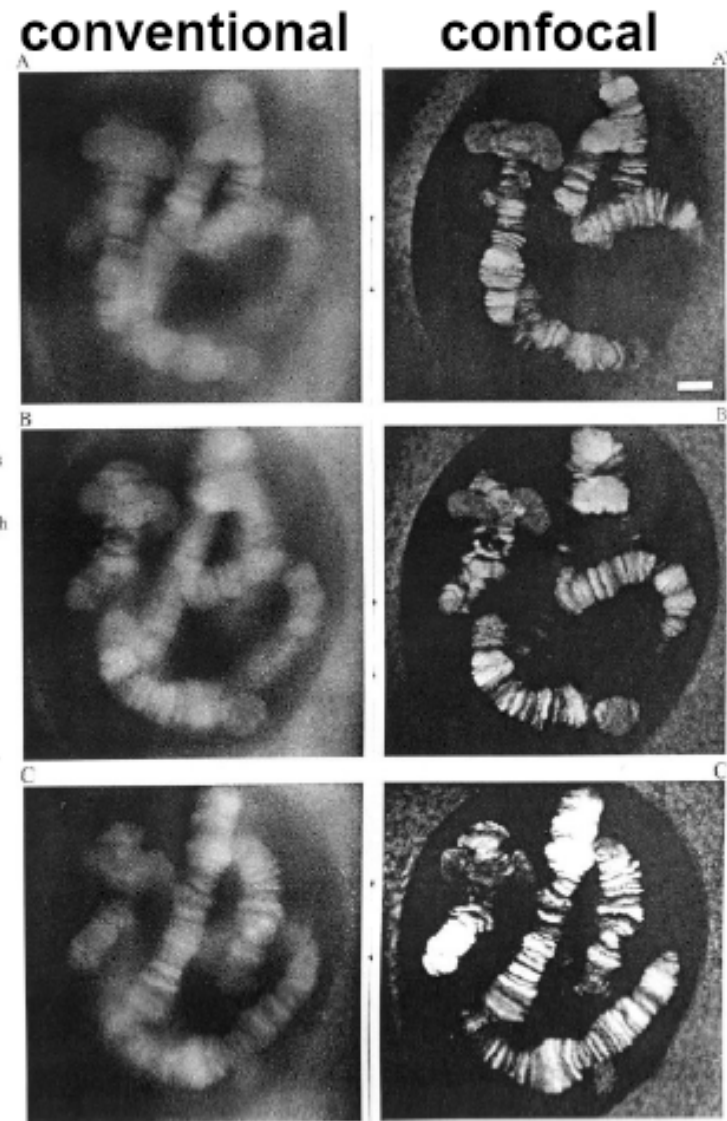
3D-slices through the nucleus



Confocal (A'-C') and non-confocal (A-C) fluorescence images of *Chironomus thummi* polytene chromosomes in situ. Optical slices were taken through a cell nucleus of an explanted salivary gland at three levels of focus with 4 μm separation. Acridine Orange staining, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} \approx 515 \text{ nm}$. Scale bar $\approx 10 \mu\text{m}$.

M. Roberi-Nicoud,
D. Arndt-Jovin and T. Jovin,
Abt. Molekulare Biologie,
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen,
West Germany.

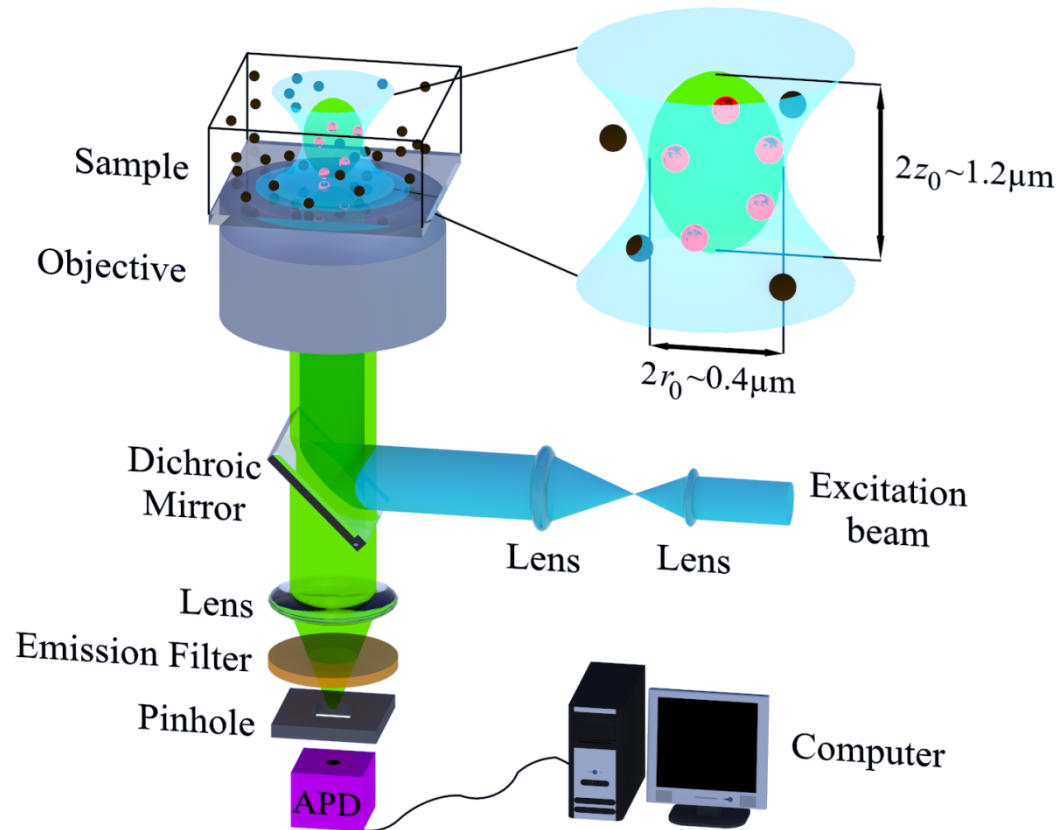
4 μm steps



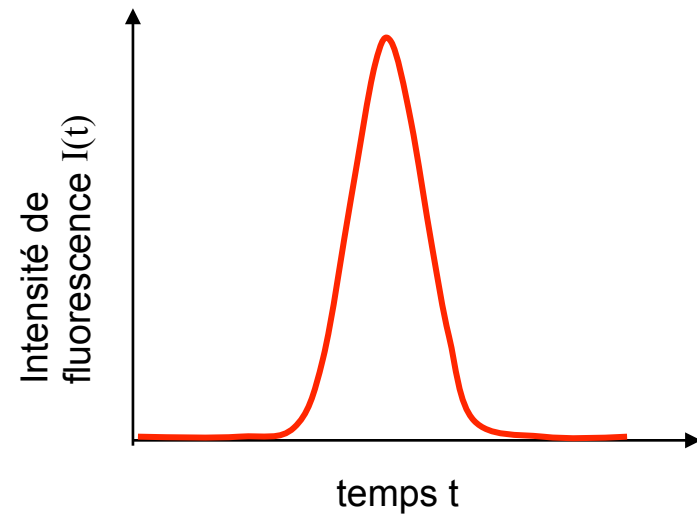
Détection de molécules fluorescentes - Approches

III-B2. Mesure en diffusion, exemple de la FCS

FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy



Passage d'une molécule fluorescente



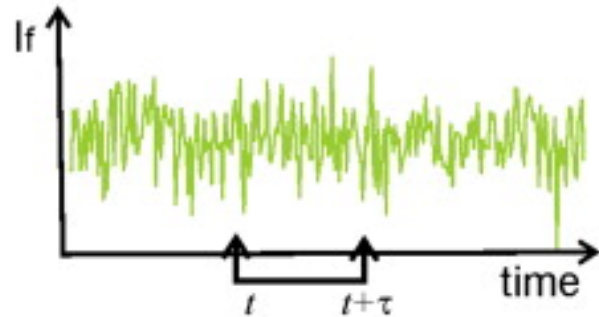
A quelle condition sur la concentration a-t-on détection de molécules individuelles ?

$$V_{\text{eff}} = 1 \times 1 \times 1 \mu\text{m}^3 = 1 \text{ fl} \quad C \sim 1 \text{ nM} \quad T_D \sim L^2/4D \sim 0.1-1 \text{ ms}$$

Détection de molécules fluorescentes - Approches

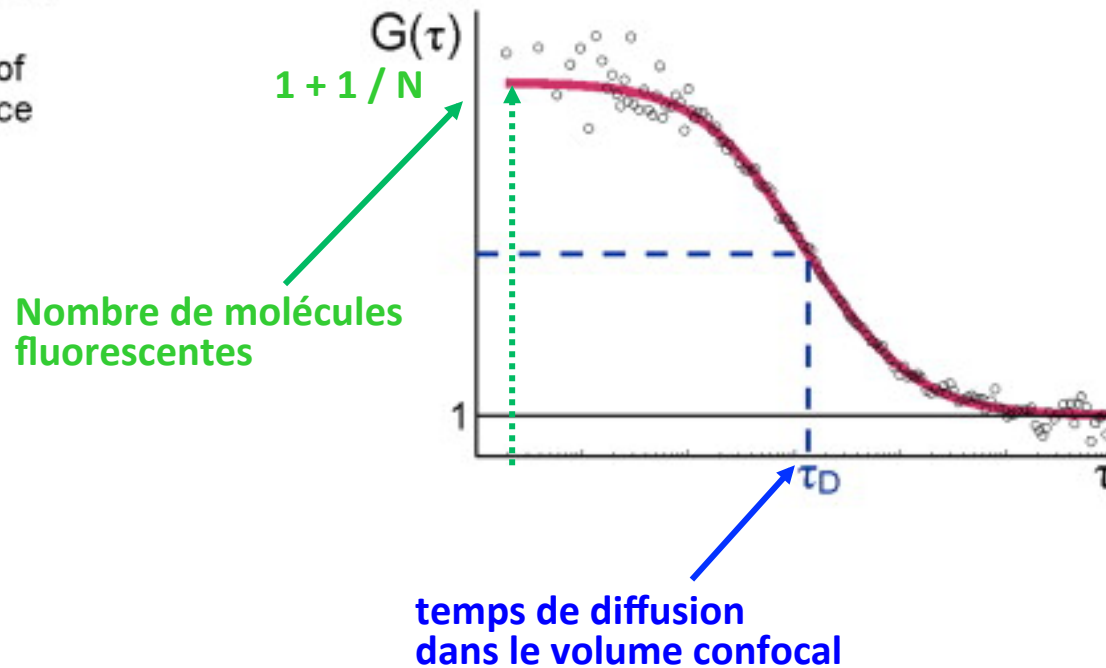
III-B2. Mesure en diffusion, exemple de la FCS

Analyse des corrélations temporelles du signal de fluorescence



temporal autocorrelation of fluorescence intensity trace

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta I(t)\delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$



Détection de molécules fluorescentes - Approches

Des molécules uniques pour sonder l'organisation de la membrane

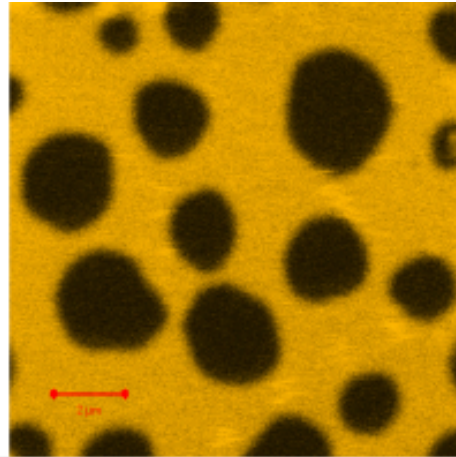
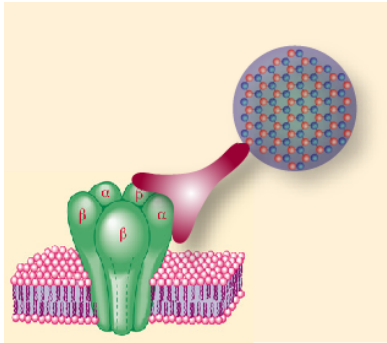
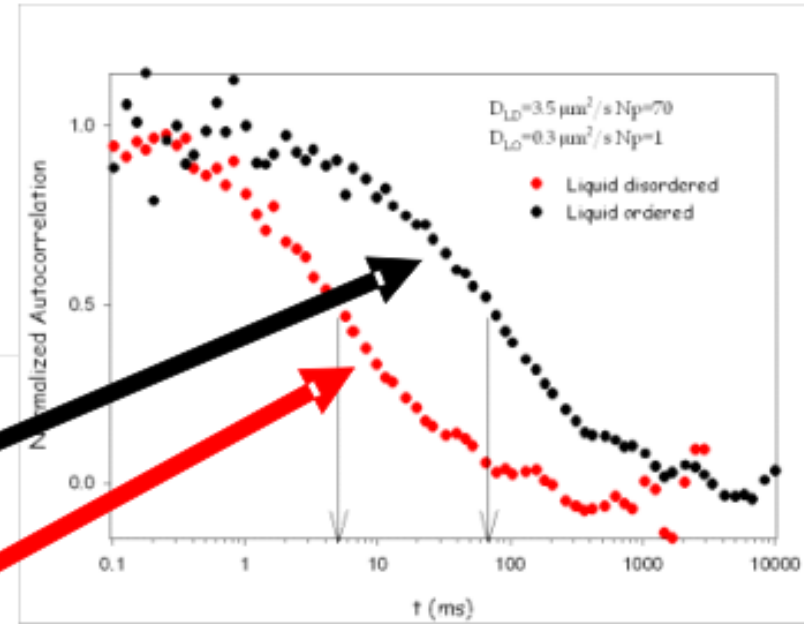
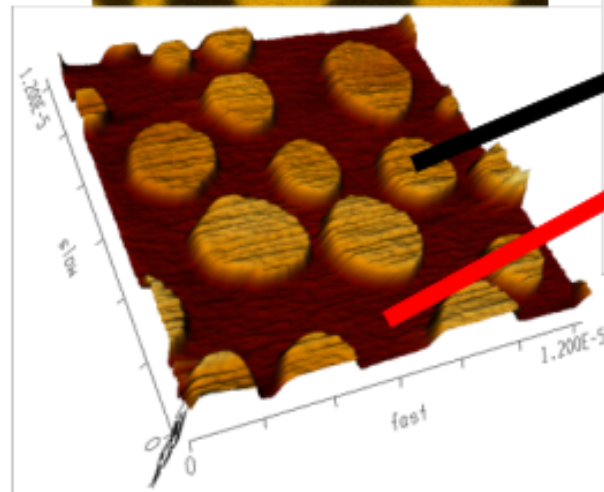


Image de fluorescence
noir = fluorescent



Mesures de FCS



Topographie AFM

⇒ raft-exhibiting" model membrane

Petra Schwille Lab

- ◆ Rob Phillips, Jane Kondev, Julie Theriot.
The Physical Biology of the Cell
Garland Science, 2009

- ◆ Pierre-Gilles de Gennes.
Scaling Concepts in Polymer Physics.
Cornell University Press, 1979

- ◆ Masao Doi and Sam F. Edwards.
The Theory of Polymer Dynamics.
Oxford University Press, 1986

- ◆ Paul R. Selvin and Taekjip Ha
Single-molecule techniques: a laboratory manual
Cold Spring Harbor laboratory Press, 2008

- ◆ Alberts *et al.*
Molecular biology of the cell
Garland Science, 2002 (4th Edition)

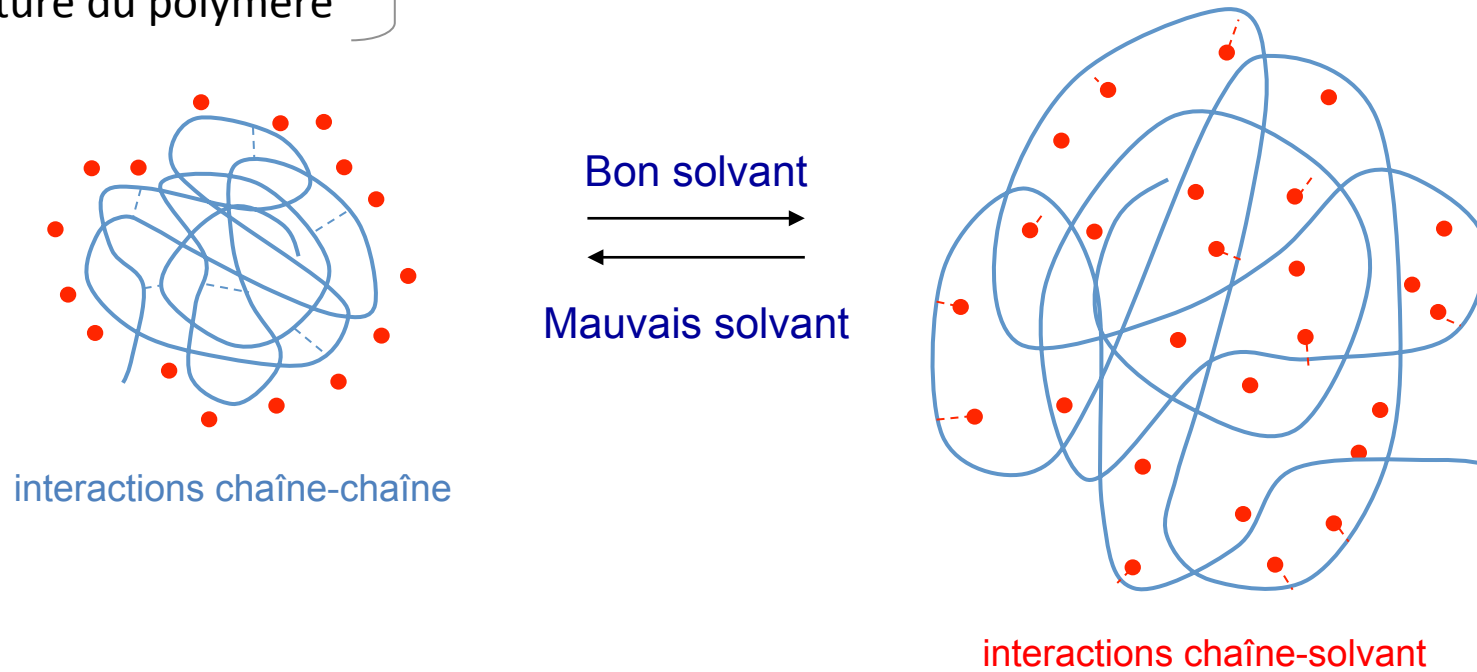
Surplus

I-A4. Effets du Solvant

La solubilisation d'un polymère dépend de:

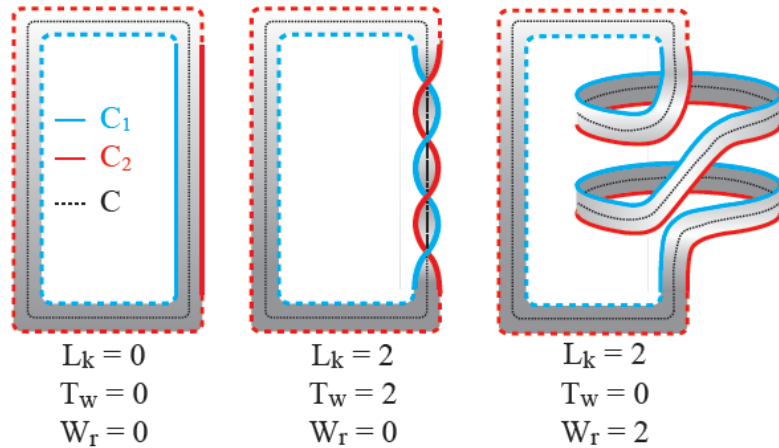
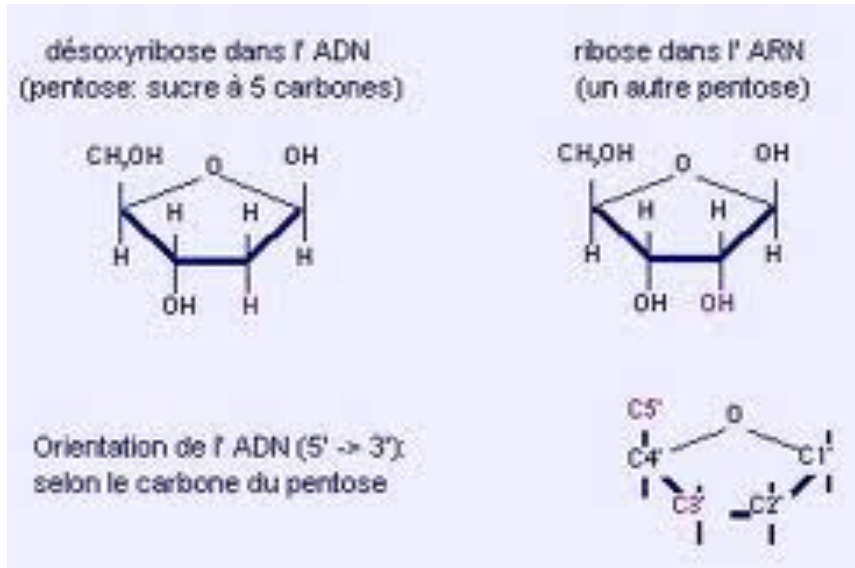
- température
- nature du solvant
- nature du polymère

} affinité chaîne / solvant



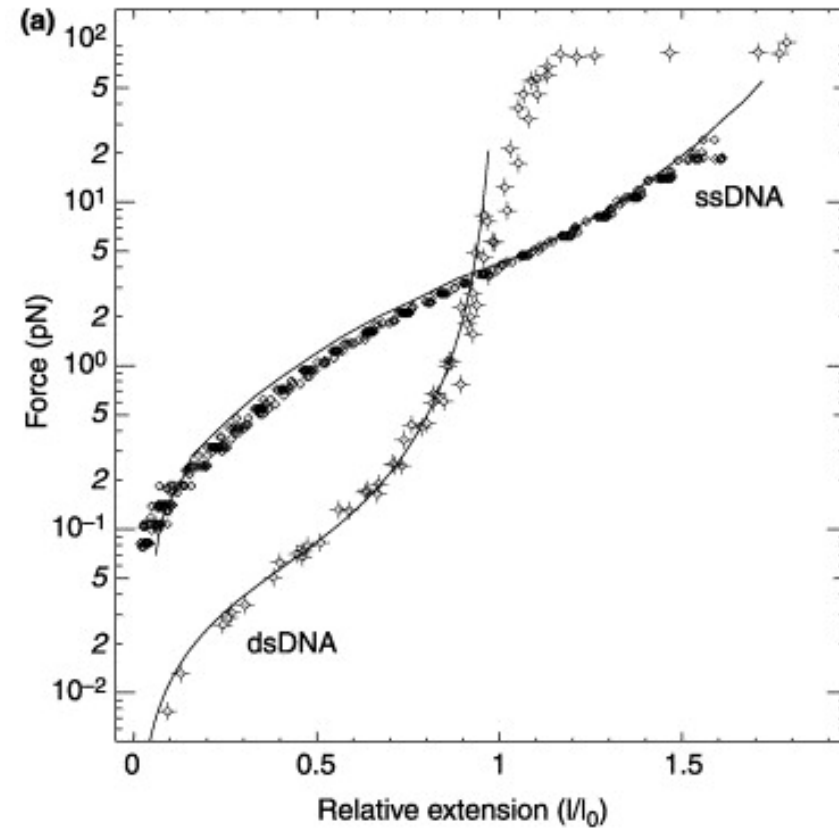
Les interactions chaîne-chaîne sont remplacées par des interactions chaîne-solvant:
La chaîne adopte une conformation de **pelote statistique gonflée par le solvant**

Surplus



Thèse G. Charvin, 2004

ADN simple brin

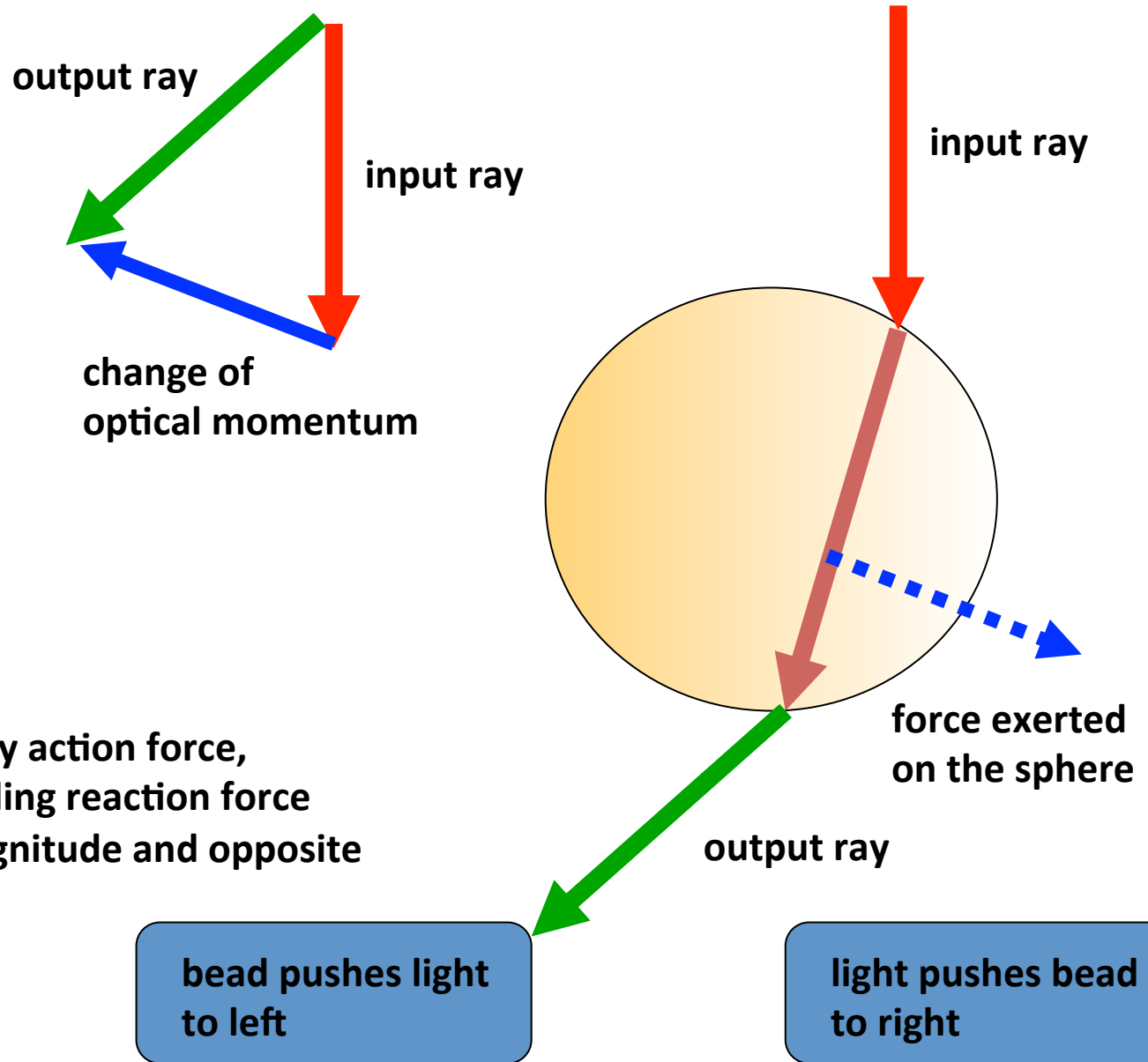


Allemand JF, Bensimon D & Croquette V
Curr Opin Struct Biol 13 (2003)

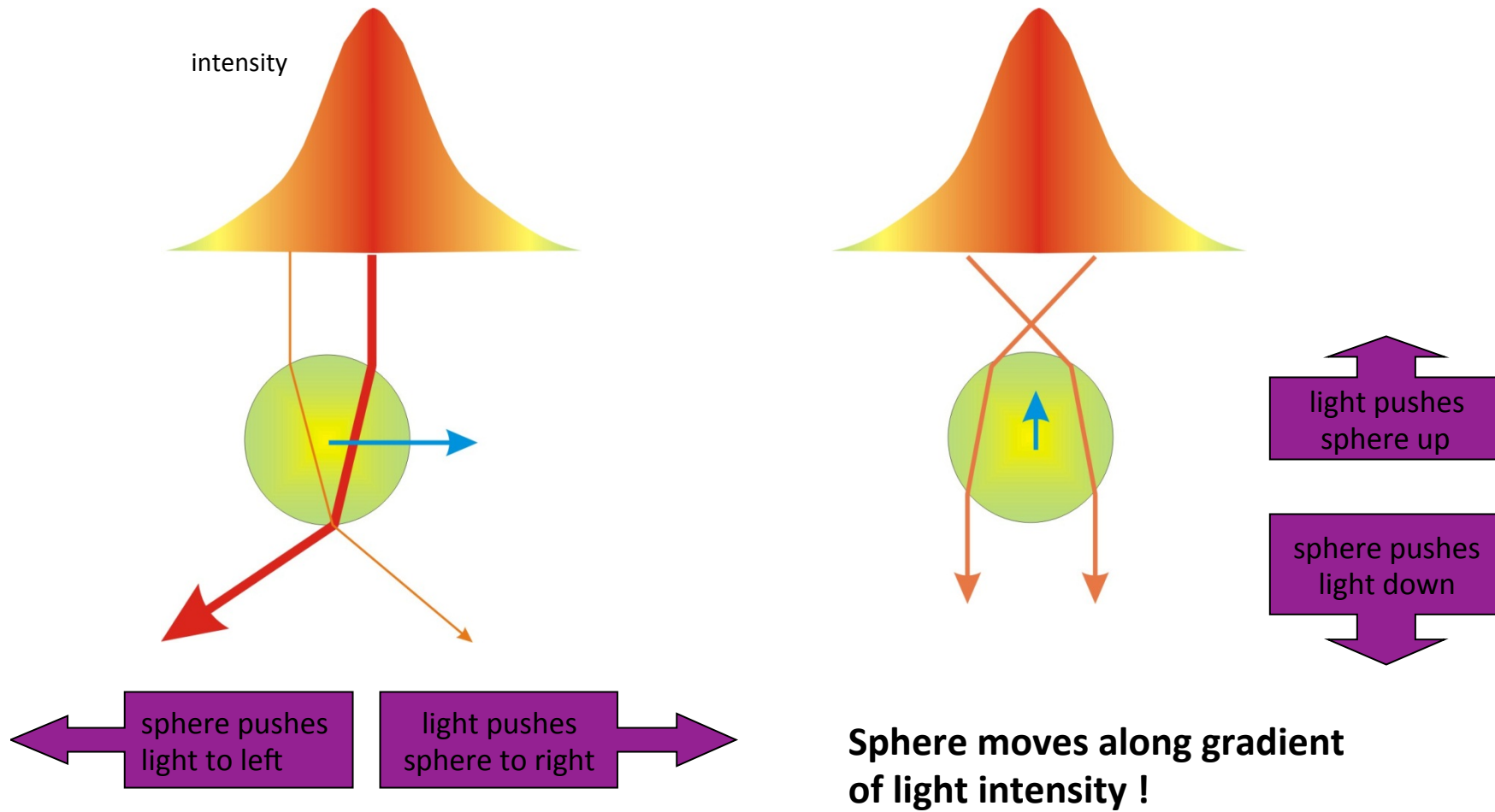
Surplus



I. Newton: “For every action force, there is a corresponding reaction force which is equal in magnitude and opposite in direction”.



Surplus



Etudes en molécules uniques

II-A2. Ordres de grandeur

Energie

Energie thermique à 25 °C : $k_B T = 4,1 \cdot 10^{-21} \text{ J} = 4,1 \text{ pN.nm}$

Energie de liaison faible $\sim qq k_B T$

Énergie d'une liaison covalente $\sim 40 k_B T$

Hydrolyse de l'ATP = $20 k_B T$

Temps

$R_e \ll 1$: la dissipation domine.

Changements de conformation des protéines $\sim \text{ns}$

Pas temporel de l'ADN polymérase $\sim \text{ms}$

Temps caractéristique de diffusion d'une protéine soluble à l'échelle du micron $\sim \text{ms}$

Phosphorylation d'un récepteur $\sim \text{ms}$

Endocytose d'un récepteur $\sim \text{min}$

Synthèse protéique $\sim \text{h}$

Division cellulaire $\sim \text{h}$

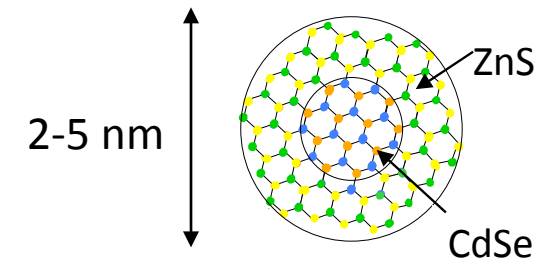
Rythme circadien $\sim \text{jour}$

Détection de molécules fluorescentes - Principe

III-A2. Voir des molécules biologiques en microscopie de fluorescence

Comparatif marqueurs fluorescents :

	Taille	Photostabilité	Absorption
Cy3	1 nm	~ 5 s	$\epsilon = 10^5$
GFP	2-4 nm	~ 10-100 ms	$\epsilon = 10^4$
QD	10-30 nm	> 20 mn	$\epsilon = 10^6$



Aussi, des mutants:

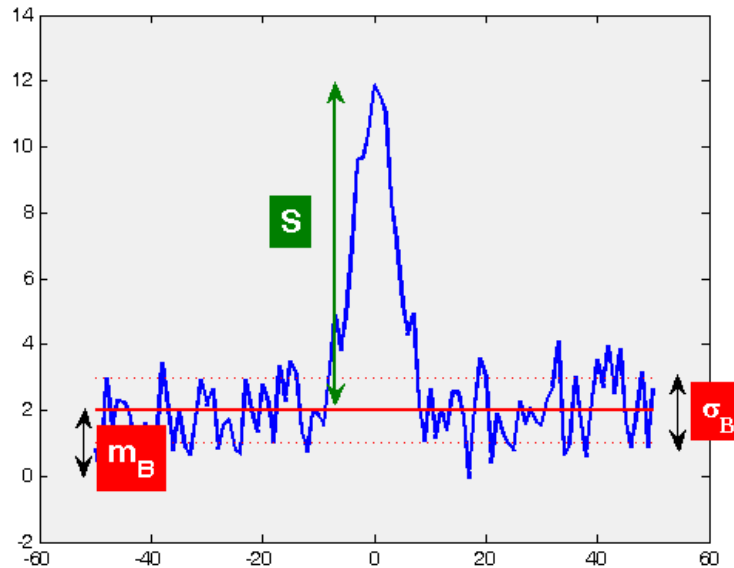
- photoactivables,
- dont l'émission change dans le temps
- sensibles au calcium
- indicateurs de la phosphorylation

Détection de molécules fluorescentes - Principe

III-A2. Maximiser le rapport signal à bruit

Rapport Signal à Bruit :

- Signal **S** de fluorescence (d'une seule molécule)
- Bruit **B** de variance de moyenne μ_B et de variance σ_B :



$$\frac{S}{\sigma_B} \gg 1$$

Sources de Bruit :

- Fluctuations intrinsèques (bruit de photon / shot noise)
- Signaux optiques parasites (autofluorescence, lumière diffusée): proportionnel à I
- Bruit électronique (courant d'obscurité, bruit de lecture) indépendant de I