

Applications biologiques du couplage de la microscopie de fluorescence et de l'électrochimie

Frédéric Lemaître et Manon Guille-Collignon

Résumé Chacune à leur façon, fluorescence et électrochimie ont pour but de convertir une information chimique en un signal, respectivement optique ou électrique. Ces deux techniques analytiques sont ainsi particulièrement adaptées à l'étude de phénomènes biologiques. En effet, cellules ou protéines peuvent être marquées par des fluorophores tandis que nombre de molécules d'intérêt biologique sont électroactives. C'est pourquoi cet article décrit de manière non exhaustive le couplage entre ces deux outils analytiques à des fins biologiques. À travers l'exemple de l'exocytose, est posée notamment la question de la construction d'une telle combinaison.

Mots-clés **Électrochimie, microélectrodes, fluorescence, TIRFM, exocytose, cellule unique.**

Abstract **Bioanalytical applications of the fluorescence-electrochemistry combination**
Both fluorescence and electrochemistry techniques aim at converting a chemical signal into an optical or an electrical one respectively. Particularly, they correspond to appropriate techniques for investigating biological phenomena due to the electroactivity of many biomolecules while cells or proteins can be labeled with fluorophores. Therefore, this article is a non exhaustive presentation of the coupling between electrochemistry and fluorescence for biological investigations. By focusing on exocytosis, it also raises the question of the implementation of such a combination.

Keywords **Electrochemistry, microelectrodes, fluorescence, TIRFM, exocytosis, single cell.**

La microscopie de fluorescence et l'électrochimie ont pour principe de transcrire une information chimique (concentration) en données optiques (émission de lumière) ou électriques (courant ou potentiel). Depuis plusieurs années, ces méthodes sont des outils de choix pour l'analyse de phénomènes biologiques, via l'utilisation de fluorophores – protéines fluorescentes comme la GFP (« green fluorescent protein ») ou l'acridine orange... – pour le marquage sélectif cellulaire (membranes, compartiments...) et de l'ADN, ou la détection de neurotransmetteurs et de courants ioniques à travers les membranes cellulaires. Leur combinaison apparaît donc comme complémentaire et prometteuse pour sonder différentes facettes d'un même objet/phénomène. La notion de couplage proprement dit reste toutefois à définir, et ce dernier présentera un intérêt par rapport aux deux techniques prises séparément si les informations sont recueillies simultanément et sur le même endroit de l'objet biologique.

Couplage(s) fluorescence-électrochimie

Association de techniques pour l'étude de protéines

Dans de nombreux cas, les propriétés spectrales des protéines dépendent de l'état d'oxydation du site redox actif [1]. Greffer un fluorophore à l'extrémité de la protéine doit donc

permettre d'établir un transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) entre le fluorophore et le centre redox. Ainsi, l'évolution de l'émission de fluorescence donne accès à la modification de l'état redox de la protéine réalisée par électrochimie et permet d'en extraire les paramètres thermodynamique et cinétique, comme dans le cas de l'azurine (une protéine de cuivre) modifiée avec une cyanine fluorescente (Cy5) [2] (*figure 1*). La protéine, comme la thiorédoxine SoxS, peut déjà contenir une sonde fluorescente (un résidu tryptophane) dont l'extinction de fluorescence est induite par le transfert électronique initié par électrochimie [3]. Ce type d'association constitue un couplage en raison d'acquisitions simultanées des données électrochimiques et de fluorescence et d'une distance centre redox-sonde fluorescente suffisamment faible et sans « barrière physique » pour permettre leur communication.

Association de techniques pour l'analyse de cellule(s) vivante(s)

La présence de la membrane cellulaire, « barrière » entre l'intérieur (où a lieu le marquage par les sondes fluorescentes) et l'extérieur de la cellule (où est localisée l'électrode qui détecte les espèces électroactives émises par l'organisme), influe sur la pertinence et la construction du couplage fluorescence-électrochimie. L'association indépendante et non simultanée des deux techniques est déjà en soi riche d'informations. Ainsi, l'internalisation d'un anticancéreux (la daunorubicine)

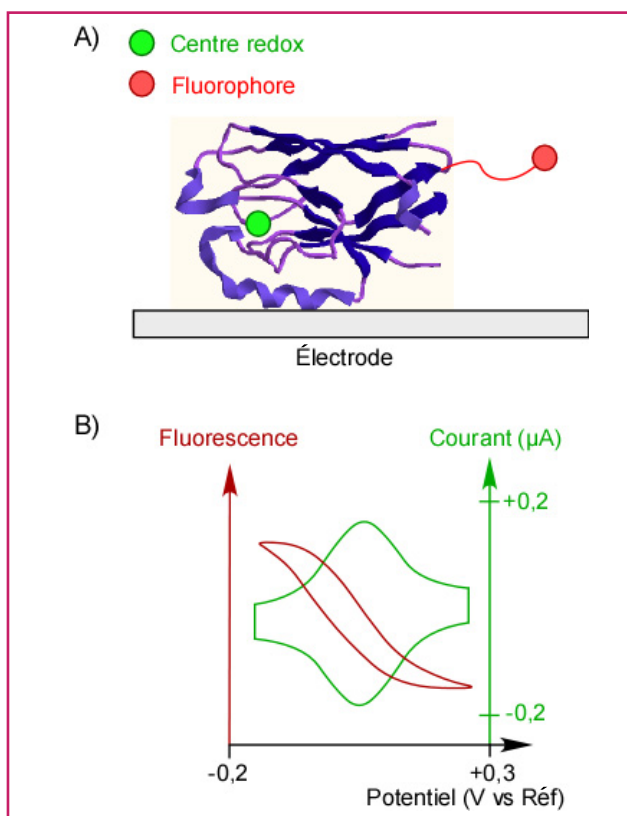


Figure 1 - A) Principe d'une mesure fluorescence-électrochimie sur protéine. Cette dernière possède une sonde fluorescente (en rouge) et est fixée sur une électrode. Le degré d'oxydation du centre redox (en vert) est modulé à travers le contrôle du potentiel de l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence. B) Exemple d'une mesure combinée en épifluorescence et voltammétrie cyclique (adapté de [2]).

par des cellules cancéreuses peut être visualisée par le biais de quantum dots et bénéficier d'une analyse complémentaire par voltammétrie du milieu de culture [4]. Des dispositifs microfluidiques pour la capture et la détection spécifique de cellules tumorales circulantes permettent soit d'identifier les cellules par fluorescence, soit de quantifier la concentration de cellules par ampérométrie [5]. L'adhésion de cellules endothéliales peut être étudiée par microbalance à cristal de quartz et complétée par des analyses par microscopie de fluorescence mettant en jeu le marquage de l'actine [6]. Des études de détection d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) sur cellule unique sont également recensées. Dans cet exemple, la fluorescence sonde la production *intracellulaire* quand la microscopie électrochimique (SECM) permet, avec une ultramicroélectrode (UME), de détecter la production des ERO au *sommet* de la même cellule (mais non simultanément) [7]. Dans ces exemples, un couplage électrochimie-fluorescence au sens strict n'a pas forcément grand intérêt. Il constituera une « plus-value » si la même zone d'intérêt est sondée avec les deux techniques comme dans le cas de l'exocytose à l'échelle de la cellule unique.

Le cas de l'exocytose

L'exocytose illustre l'intérêt et la difficulté d'élaborer un couplage électrochimie-fluorescence sur cellule unique. Mécanisme fondamental de la communication cellulaire, elle

permet à une cellule de libérer dans le milieu extracellulaire des (bio)molécules messagères nommées neurotransmetteurs qui sont préalablement encapsulés dans des vésicules de sécrétion. En présence du stimulus approprié, ces dernières migrent puis fusionnent avec la membrane cellulaire, occasionnant la formation d'un pore de fusion et son éventuelle expansion (figure 2A). Le mécanisme global de l'exocytose est bien identifié mais de nombreuses questions subsistent, liées au contrôle de la libération ou à l'existence d'autres étapes (exocytose composée, « baiser volé », figure 2A-c). Dans ce contexte, électrochimie et fluorescence permettent l'acquisition de données expérimentales *en temps réel*, à l'échelle de la *cellule unique* et de l'*événement exocytotique individuel*. L'ampérométrie sur UME (figure 2B) est une méthode adaptée par les dimensions comparables du capteur et de l'objet biologique, le temps de réponse à l'échelle de la milliseconde, la sensibilité du courant à la variation de concentration en neurotransmetteurs, et un excellent rapport signal sur bruit [8]. En positionnant une UME de carbone (diamètre 7 μm , polarisée à un potentiel permettant d'oxyder les neurotransmetteurs électroactifs) au voisinage d'une cellule isolée, chaque événement individuel de libération vésiculaire correspond à un pic de courant qui donne accès à la cinétique de libération, à la quantité de neurotransmetteurs expulsés et à l'analyse du pore de fusion [9]. L'exocytose peut aussi être suivie par microscopie de fluorescence *via* le marquage des vésicules (milieu intravésiculaire ou membrane vésiculaire) par des sondes fluorescentes appropriées. Le déplacement vésiculaire dans le cytoplasme peut être visualisé ainsi que le lieu de chaque événement de libération (extinction ou flash de fluorescence). En pratique, la technique de choix est le TIRFM (« total internal reflection fluorescence microscopy ») qui présente des résolutions temporelle (~ 30 ms) et spatiale en x-y (~ 150 nm) adaptées. Brièvement, la cellule isolée et déposée au fond d'une boîte de Petri est illuminée de façon à ce que la réflexion à l'interface verre-eau soit *totale* (figure 2C). Se crée alors une onde évanescente de faible profondeur (quelques centaines de nm) qui n'illumine que les vésicules au voisinage de la membrane cellulaire, augmentant ainsi le rapport signal/bruit (aucune détection des vésicules situées loin de la membrane) entre autres avantages (limitation des dommages cellulaires par illumination et du photoblanchiment).

Le couplage TIRFM-ampérométrie a pour but de connaître pour un même événement d'exocytose sa localisation et ses caractéristiques dynamiques en temps réel, ce qui implique d'adapter le dispositif expérimental. Ainsi, la détection couplée doit se faire au même endroit de la cellule (*en dessous*). Ceci nécessite un matériau transparent et conducteur comme l'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO) [10-11], ou l'or fin qui a de meilleures propriétés électrochimiques que l'ITO mais avec une transmission dans le visible moindre (40 % contre 90 % pour l'ITO). À ce jour, deux types de couplage ont été référencés dans la littérature : sur or fin avec des cellules chromaffines (sondes électrochimique et fluorescente : catécholamines et acridine orange respectivement) [12], et l'autre avec des cellules entérochromaffines BON (sérotonine et GFP en tant que sondes respectivement électrochimique et fluorescente) sur ITO [13]. L'acquisition d'événements couplés montre la faisabilité du couplage qui n'est toutefois pas encore totalement abouti. La présence d'événements « orphelins » (pic ampérométrique sans flash ou le contraire) pose en effet des questions sur le choix du modèle cellulaire et des sondes électroactives ou fluorescentes. Mais ceci est une autre histoire...

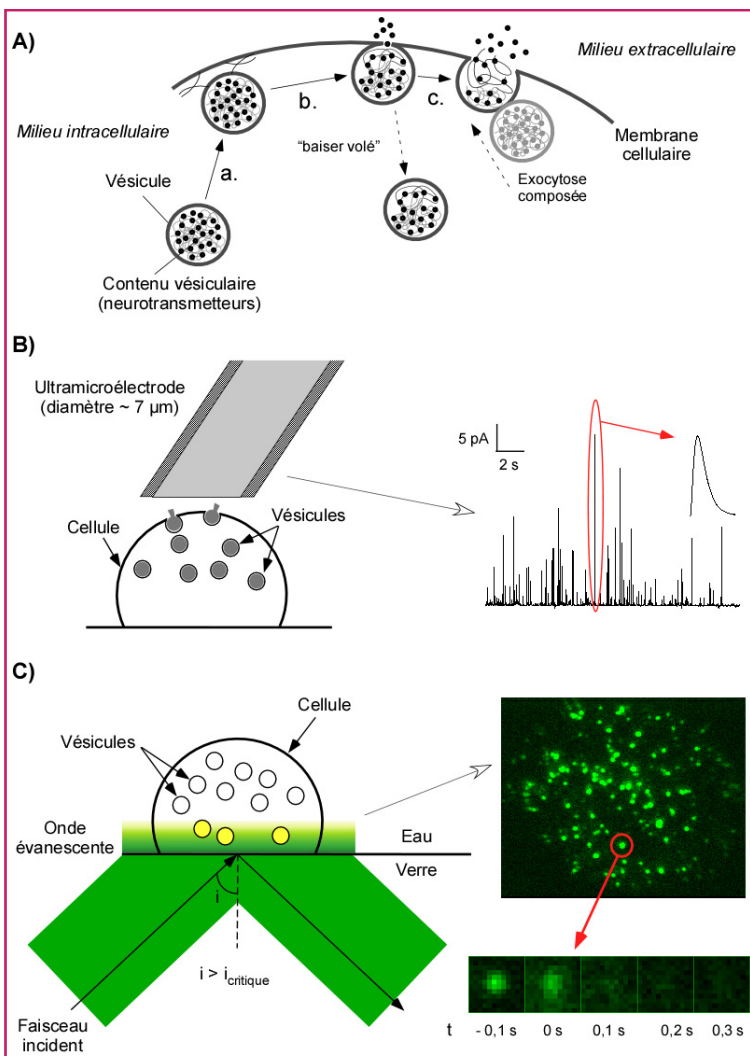


Figure 2 - A) Description schématique d'un événement d'exocytose : a) la vésicule s'arrime à la membrane cellulaire ; b) la fusion des membranes cellulaire et vésiculaire occasionne la formation d'un pore de fusion qui permet une première libération dans le milieu extracellulaire ; c) le pore peut exposer et conduire à une libération plus marquée ou éventuellement se fermer et conduire au retour de la vésicule dans le cytoplasme (« baiser volé » ou « kiss and run »). Une autre vésicule peut fusionner sur une vésicule en cours de relargage (« exocytose composée »). B) Schéma de principe de la détection de l'exocytose par ampérométrie. C) Principe de la détection en TIRFM.

Conclusion

La complémentarité de la microscopie de fluorescence et de l'électrochimie pour l'étude de phénomènes biologiques est réelle. Le degré d'association de ces deux techniques semble lié à la nature de l'objet biologique, *a fortiori* s'il s'agit d'une cellule unique. Le couplage en question devient alors un couplage « sur mesure » dont les caractéristiques (choix des techniques, nature des sondes, détection simultanée ou non...) sont fixées par l'objectif de l'étude et par la conciliation des contraintes qui sont propres aux deux techniques.

Références

- [1] Patil A.V., Davis J.J., *Coord. Chem. Rev.*, **2011**, 255(17-18), p. 1970.
- [2] Salverda J.M. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49(33), p. 5776.
- [3] Voicescu M. et al., *Biochemistry*, **2011**, 50(1), p. 17.
- [4] Zhou Y. et al., *Biomaterials*, **2010**, 31(18), p. 4958.
- [5] Wu Y., Xue P., Hui K.M., Kang Y., *ChemElectroChem*, **2014**, 1(4), p. 722.
- [6] Marx K.A. et al., *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, 16(9-12), p. 773.
- [7] Salamifar S.E., Lai R.Y., *Anal. Chem.*, **2013**, 85(20), p. 9417.
- [8] Amatore C., Arbault S., Guille M., Lemaître F., *L'Act. Chim.*, **2011**, 348-349, p. 25.
- [9] Amatore C., Arbault S., Guille M., Lemaître F., *Chem. Rev.*, **2008**, 108, p. 2585.
- [10] Amatore C., Arbault S., Chen Y., Crozatier C., Lemaître F., Verchier Y., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45(24), p. 4000.
- [11] Meunier A., Fulcrand R., Darchen F., Guille-Collignon M., Lemaître F., Amatore C., *Biophys. Chem.*, **2012**, 162, p. 14.
- [12] Kisler K. et al., *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, **2012**, 3, p. 243.
- [13] Meunier A., Jouannot O., Fulcrand R., Faget I., Bretou M., Karatekin E., Arbault S., Guille M., Darchen F., Lemaître F., Amatore C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50(22), p. 5081.



Manon Guille-Collignon et Frédéric Lemaître (*auteur correspondant*) sont maîtres de conférences à l'Université Pierre et Marie Curie*.



M. Guille-Collignon *

École Normale Supérieure-PSL Research University, Département de Chimie, Sorbonne Universités/UPMC Université Paris 6, CNRS UMR 8640 Pasteur, 24 rue Lhomond, F-75005 Paris.

F. Lemaître

Courriels : manon.guille@ens.fr ; frederic.lemaitre@ens.fr

edif
les éditions d'île de france

102 avenue Georges Clemenceau - 94700 MAISONS ALFORT

Tél. : 01 43 53 64 00 - Fax : 01 43 53 48 00

edition@edif.fr - www.edif.fr