

LES FLUOROPHORES EN IMAGERIE MICROSCOPIQUE : ANALYSE COMPARATIVE DES PETITES MOLÉCULES ET PROTÉINES FLUORESCENTES

Samuel Setiano
Licence 2 CPES - Université Strasbourg

Janvier 2025

1 Fluorescence en biophotonique

Définition

La fluorescence est l'émission de lumière par une substance ayant absorbé un rayonnement de longueur d'onde spécifique. Ce phénomène optique repose sur les propriétés intrinsèques de certaines molécules, appelées fluorophores, capables d'absorber de l'énergie lumineuse et de la réémettre sous forme de photons de plus faible énergie.

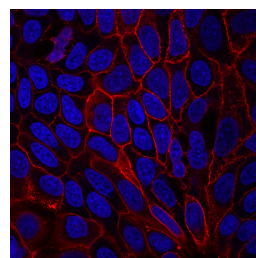
Phénomène physique

Le processus de fluorescence comprend trois étapes principales :

1. **Absorption d'un photon (excitation) :** Un photon d'une certaine longueur d'onde est absorbé par un fluorophore, ce qui excite ses électrons à un niveau d'énergie supérieur.
2. **Relaxation non radiative :** Avant de retourner à un état stable, une partie de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur ou de vibrations moléculaires.
3. **Émission d'un photon :** L'électron retourne à son état fondamental, émettant un photon de longueur d'onde plus longue (et donc d'énergie plus faible) que celui initialement absorbé.

Applications

La fluorescence est technique incontournable pour l'observation en temps réel des structures biologiques et des processus intracellulaires. Elle permet une visualisation précise des organites et des membranes, tout en offrant la possibilité de marquer sélectivement des molécules et des cellules dans des échantillons vivants. L'utilisation de la fluorescence s'étend également à des domaines cliniques, comme la détection de biomarqueurs dans les tissus vivants, avec des applications cruciales pour le diagnostic de maladies telles que le cancer ou les infections virales. Ci contre, un exemple de cellules MCF-7 fixées au méthanol, teintées avec un anticorps anti-CD9 clone HI9a et un anticorps secondaire CF568. Noyaux teintés avec DAPI (bleu)¹.



Ces technologies ouvrent la voie à une meilleure compréhension des interactions cellulaires, des mécanismes physiopathologiques, et facilitent l'identification de cibles thérapeutiques dans des contextes biologiques et médicaux.

1. Biotium. (n.d.). *Protocol : Staining cells with Hoechst or DAPI nuclear stains*. Biotium. Récupéré le 8 Janvier 2025, de <https://url1.fr/yGNpR7>

2 Différents fluorophores

Il existe deux grandes familles de fluorophores : les **petites molécules** et les **protéines marquées**. Les petites molécules, comme le DAPI (pour colorer le noyau), le Fura 2 (pour mesurer le calcium intracellulaire) et le Red CC-1 (pour analyser les mitochondries), sont utilisées pour observer des processus cellulaires spécifiques. Les protéines marquées, telles que la GFP et ses variantes (YFP, CFP), permettent de suivre l'expression génétique, d'étudier les dynamiques intracellulaires et les interactions protéiques. Elles sont aussi utilisées dans des études multi-couleurs pour mieux comprendre les cellules vivantes et leurs composants.

	Petites molécules fluorescentes	Protéines fluorescentes
Origine	Synthèse chimique ou extraction naturelle. La fluorescéine, première molécule fluorescente identifiée, a été découverte en 1871 par Adolf von Baeyer.	Naturelles (ex. GFP issue de la méduse <i>Aequorea victoria</i>) ou modifiées génétiquement pour des applications spécifiques. La GFP a été identifiée en 1962 par Osamu Shimomura.
Structure	Structures organiques simples, souvent basées sur des cycles aromatiques. Poids moléculaire faible (généralement < 1 kDa).	Structures complexes composées d'acides aminés, formant des protéines globulaires. Poids moléculaire élevé (environ 27 kDa pour la GFP).
Propriétés optiques	Large gamme de spectres d'excitation/émission. Par exemple, DAPI absorbe la lumière UV (350 nm) et émet une fluorescence bleue brillante (450-490 nm). Ex : Fura-2, change de spectre en fonction de leur environnement (liaison au calcium).	Spectres d'excitation/émission spécifiques (ex. GFP : excitation 488 nm, émission 509 nm), mais modifiables par des mutations génétiques (ex. YFP, CFP, dsRed).
Photostabilité	Photostabilité variable, influencée par l'environnement (pH, oxygène). Certaines molécules sont très stables, tandis que d'autres se dégradent plus rapidement sous lumière intense.	Bonne photostabilité pour des variantes comme la GFP. Certaines protéines peuvent être plus sensibles à la photodégradation. Les conditions environnementales (pH, oxygène) jouent également un rôle.
Biocompatibilité	Peut être limitée par la toxicité (ex. DAPI est toxique à forte dose). Des dérivés moins toxiques comme ATTO et BODIPY sont développés.	Excellente biocompatibilité grâce à leur origine biologique. Particulièrement adaptées à l'imagerie dans les systèmes vivants.
Synthèse et utilisation	Synthèse chimique en laboratoire. Manipulation relativement facile et adaptées pour des tests <i>in vitro</i> .	Codage génétique dans le génome des organismes hôtes ou expression dans des systèmes recombinants (bactéries, levures, cellules eucaryotes). Adaptées aux systèmes vivants pour des études dynamiques.

Comparaison détaillée des petites molécules fluorescentes et des protéines fluorescentes.

3 Cas Concret : Surveillance Redox des Mitochondries

Les mitochondries jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie redox, et la surveillance de leur état redox est essentielle pour comprendre les mécanismes des maladies neurodégénératives. Parmi les outils utilisés pour cette surveillance, le **MitoSOX Red** et le **roGFP** sont couramment employés. Le MitoSOX Red est un fluorophore sensible aux superoxydes mitochondriaux. En revanche, le roGFP, une protéine fluorescente redox-sensible, offre une mesure plus stable et continue des variations redox.

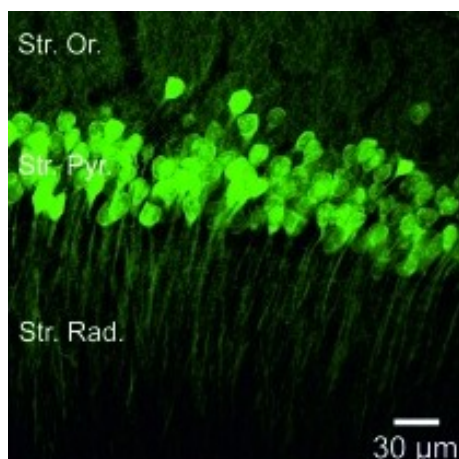


FIGURE 1 – L'indicateur roGFPc est presque universellement exprimé dans le cerveau. Les images montrent un cerveau de souris mâle adulte (P65) en vue sagittale, composée de six images individuelles prises avec une caméra CCD et un objectif 4× (NA 0,28, XL Fluor ; Olympus). Les images sont acquises par microscopie à deux photons (objectif IR 40×, NA 0,8, Achromplan ; Zeiss). [1]

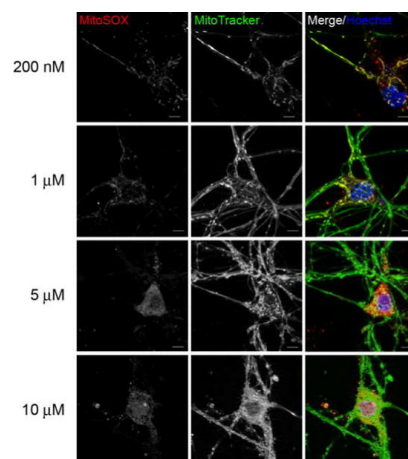


FIGURE 2 – L'image montre que des concentrations faibles de MitoSOX (de l'ordre du μM) ne se localisent pas spécifiquement dans les mitochondries. Les neurones corticaux primaires de rat ont été incubés avec 100 nM de MitoTracker Green (vert), 10 μM de Hoechst (bleu) et des concentrations variables de MitoSOX (rouge) pendant 10 minutes. Les cellules ont été immédiatement observées. [2]

Le roGFP se distingue par sa capacité à fournir des mesures stables et précises des variations redox dans les mitochondries, sans perturber l'équilibre normal des cellules, ce qui en fait un outil idéal pour des études redox en temps réel. En revanche, le MitoSOX nécessite des concentrations relativement élevées, qui peut entraîner des perturbations du système cellulaire, limitant ainsi son utilisation dans certaines situations.

En conclusion, les fluorophores, qu'ils soient utilisés pour mesurer l'état redox ou pour d'autres applications, sont des outils puissants et polyvalents en chimie et en biologie. Leur capacité à émettre de la fluorescence permet une observation précise et en temps réel de processus biologiques. Comme on l'a vu, le choix du fluorophore dépend des besoins spécifiques de l'étude. Ces outils nous aident à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et les maladies.

Références

- [1] K. C. Wagener, B. Kolbrink, K. Dietrich, K. M. Kizina, L. S. Terwitte, B. Kempkes, G. Bao, and M. Müller. Redox indicator mice stably expressing genetically encoded neuronal roGFP : Versatile tools to decipher subcellular redox dynamics in neuropathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*, 25(1) :41–58, 2016.
- [2] B. A. Roelofs, S. X. Ge, P. E. Studlack, and B. M. Polster. Low micromolar concentrations of the superoxide probe mitosox uncouple neural mitochondria and inhibit complex iv. *Free Radical Biology and Medicine*, 86 :250–258, 2015.