



HAL
open science

Amélioration de la durée de vie de fluorophores organiques. Utilisation dans des extraits cellulaires

Nicolas Fiszman, Antoine Le Gall, Hélène Chommy, David Dulin, Hélène Walbott, Dominique Fourmy, Satoko Yoshizawa, Olivier Namy, Nathalie Westbrook, Karen Perronet

► To cite this version:

Nicolas Fiszman, Antoine Le Gall, Hélène Chommy, David Dulin, Hélène Walbott, et al.. Amélioration de la durée de vie de fluorophores organiques. Utilisation dans des extraits cellulaires. OptDiag 2012 Diagnostic et Imagerie Optique en Médecine et Biologie, Biophotonique, May 2012, Paris, France. pp.1. hal-00708294

HAL Id: hal-00708294

<https://hal-iogs.archives-ouvertes.fr/hal-00708294>

Submitted on 19 Jun 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Amélioration de la durée de vie de fluorophores organiques. Utilisation dans des extraits cellulaires

Nicolas Fiszman^{1*}, Antoine Le Gall¹, Hélène Chommy³, David Dulin¹,
Hélène Walbott², Dominique Fourmy², Satoko Yoshizawa², Olivier Namy³,
Nathalie Westbrook¹, Karen Perronet¹

¹Laboratoire Charles Fabry, CNRS UMR 8501, Institut d'Optique Graduate School et
Université Paris Sud 11, 2 avenue Fresnel, 91127 Palaiseau Cedex, France

²Centre de Génétique Moléculaire, CNRS UPR 3404, 1 Av. de la Terrasse, 91198 Gif-
sur-Yvette Cedex, France

³Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS UMR 8621 et Université Paris Sud 11,
bât. 400, 91405 Orsay Cedex, France

*nicolas.fiszman@mines-paristech.org

Résumé :

Nous présentons une étude de la durée de vie avant photoblanchiment du marqueur fluorescent ATTO647N à l'échelle de la molécule unique par microscopie de fluorescence en réflexion totale. Nous avons mesuré la durée de vie avant photoblanchiment dans un tampon usuel et dans des extraits cellulaires. Nous avons ensuite étudié l'influence de l'appauvrissement en oxygène de la solution tampon et l'ajout d'agents oxydants et réducteurs sur la durée de vie de l'ATTO647N dans ces milieux. L'amélioration importante de la durée de vie grâce à la combinaison de ces deux facteurs dans le tampon usuel n'est pas reproductible dans tous les extraits cellulaires. Nous en concluons que les extraits contenant des réservoirs d'oxygène comme l'hémoglobine doivent être prétraités avant d'être appauvris en oxygène par les méthodes habituelles.

Abstract: Reduced photobleaching of organic fluorophores in cell extracts

We present a study of the lifetime before photobleaching of the ATTO647N fluorescent dye at the single molecule scale using total internal reflection fluorescence microscopy. We measured the lifetime before photobleaching in a standard buffer and in cell extracts. We then studied the influence on the lifetime of the ATTO647N of oxygen depletion combined with the addition of oxidizing and reducing agents to the buffer. The large lifetime enhancement due to the combination of these two factors in a standard buffer is not reproducible in all cell extracts. We conclude that extracts containing oxygen sinks like hemoglobin have to be pretreated before being mixed with usual oxygen scavengers.

1. Introduction

Pour le suivi de molécules uniques par microscopie de fluorescence, les fluorophores organiques restent très utilisés du fait de leur petite taille, de leurs propriétés photophysiques bien caractérisées, et de la facilité avec laquelle on peut les lier de façon covalente avec des molécules biologiques (1)]. Que ce soit pour contrôler leur processus de blanchiment pour des applications en super-résolution (2)], ou simplement pour pouvoir les observer plus longtemps, l'augmentation de la durée de vie des fluorophores organiques connaît encore un

fort engouement (3-6)]. L'oxygène étant l'un des facteurs principaux menant au photoblanchiment, différentes stratégies ont été proposées pour l'éliminer des échantillons à étudier. Cependant, l'oxygène contribue aussi à réduire la durée de vie de l'état triplet, qui correspond à un état noir pour les marqueurs organiques. De ce fait, éliminer l'oxygène conduit souvent à augmenter le clignotement des fluorophores, et à diminuer le taux de fluorescence moyen, ce qui est particulièrement gênant pour des applications telles que le FRET (Förster résonance energy transfer) ou le suivi de molécules. Dans ce contexte, Tinnefeld et ses collaborateurs (3)] ont développé une approche rationnelle pour minimiser à la fois le blanchiment et le clignotement. Pour ce faire, non seulement ils appauvrissent le milieu en oxygène, mais ils ajoutent un agent oxydant et un agent réducteur pour réduire la durée de vie de l'état triplet via des réactions de transfert électronique. Ce système a été dénommé ROXS pour Reducing and Oxidizing System. L'équipe de Tinnefeld a montré sa grande efficacité sur différentes familles de fluorophores organiques émettant du jaune au proche infrarouge (3)]. Ce système peut aussi être efficace pour des fluorophores émettant dans le vert (7)].

Ici, nous avons testé l'efficacité du ROXS sur un fluorophore émettant dans le rouge, l'ATTO647N, dans des extraits cellulaires par comparaison à une solution tampon saline ordinaire. Nous montrons que le ROXS est aussi efficace dans ces extraits cellulaires, dans une moindre mesure cependant que dans la solution tampon de référence. Cette étude s'avérera utile pour des expériences de microscopie de fluorescence sur des systèmes biologiques réalisées dans des extraits cellulaires.

2. Expérience

2.1 Préparation des échantillons

Les lamelles de microscope sont préalablement lavées 25' au bain à ultrasons dans l'acétone puis deux fois 25' dans l'eau ultra-pure avant d'être nettoyées 10' dans un plasma d'O₂. Elles sont stockées sous flux laminaire jusqu'à utilisation.

Les cellules microfluidiques sont élaborées à partir d'une lame de verre percée de deux trous pour assurer la circulation des solutions et d'une lamelle propre. Les deux sont fixées ensemble avec de l'adhésif double-face. Un réservoir moulé dans du PDMS permet de charger la solution de travail dans la cellule et l'autre orifice est connecté à un pousse-seringue qui aspire la solution à la vitesse désirée.

La lamelle de microscope est traitée avec du sérum bovin d'albumine biotinylé (Sigma) à 10mg/ml pendant 45' environ, puis de la neutravidine (Pierce) à 0,1mg/ml pendant 5' environ.

La molécule fluorescente d'intérêt est liée à un oligonucléotide biotinylé (Eurofins-MWG) et est injectée sur cette lamelle fonctionnalisée.

Finalement, l'échantillon est rincé et rempli de la solution de travail. Différents milieux ont été étudiés. Le milieu de référence, noté TRIS, est constitué de TRIS 50mM, NaCl 250mM, pH=7,5. Nous l'avons comparé à deux extraits cellulaires, particulièrement utiles pour des applications en biologie moléculaire, le lysat de réticulocyte de lapin, (noté RRL, Promega), et le PURE Express, solution complète de traduction de protéines *in vitro* reconstituée à partir de *E. coli* (New England BioLabs(8)). Chacune de ces solutions est étudiée avec ou sans l'ajout de ROXS. Le ROXS est constitué d'un système enzymatique permettant d'appauvrir la solution en O₂ et d'un couple oxydant/réducteur permettant de limiter la durée de vie de l'état

triplet de la molécule fluorescente. Son action a été décrite dans (3), avec le système enzymatique glucose-oxydase / catalase. L'utilisation dans le ROXS d'un système enzymatique alternatif, basé sur l'acide protocatéchique (PCA, Sigma) et la protocatheuase-3,4,dioxygénase (PCD, Sigma), compatible avec les extraits cellulaires (4) a été démontré dans (7). C'est ce dernier système, combiné avec le méthyl viologène (1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridinium dichloride hydrate, MV, 0.5 mM, Sigma) et l'acide ascorbique (AA, 0,5mM, Sigma) qui est utilisé dans notre étude.

2.2 Microscopie en réflexion totale

Le dispositif expérimental de microscopie en réflexion totale est représenté sur la figure 1. Le faisceau laser est réfléchi par un miroir galvanométrique (MG) puis élargi 10 fois par un télescope (T) avant d'être focalisé par le doublet achromatique L1 dans le plan focal arrière de l'objectif d'un microscope inversé de façon à venir se réfléchir totalement sur la lamelle de microscope. En amont du miroir galvanométrique, sont situés différents miroirs dichroïques basculants permettant de sélectionner et/ou de combiner les sources lasers utiles à l'expérience. Quatre longueurs d'onde d'excitation sont disponibles : 488 nm (laser Sapphire CDRH, Coherent, 200 mW cw, dénoté laser bleu), 515 nm (diode laser Toptica, 50 mW cw), 532 nm (Crystal Laser, 100 mW cw) dénotés laser vert et 638 nm (diode laser LBX-638-100 Oxxius, 100 mW). Un obturateur (Obt.) permet de bloquer le laser bleu et le vert, tandis que le laser rouge peut être bloqué en modulant le courant d'alimentation de la diode. Sous l'objectif se trouve une tourelle porte-filtres, permettant de sélectionner le miroir dichroïque adéquat. L'objectif de microscope utilisé est à immersion dans l'huile (Olympus, PlanApo x60, NA=1,45).

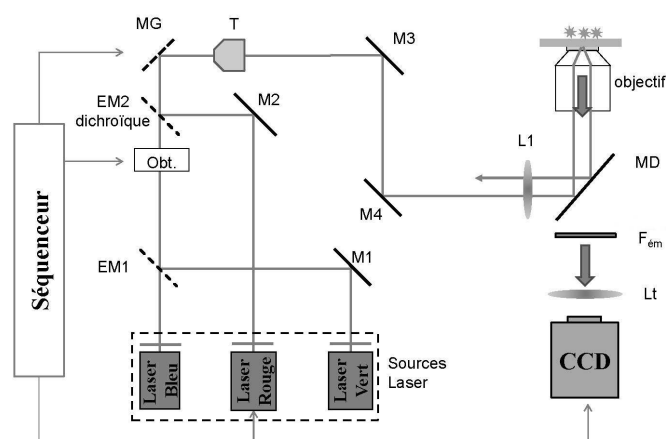


Figure 1 : Dispositif expérimental.

Le signal de fluorescence est collecté sur une caméra à capteur CCD (Andor EM-CCD iXon) après avoir traversé le filtre d'émission adéquat placé dans une roue à filtres motorisée (F_{ém}). Un séquenceur développé au laboratoire permet de gérer la séquence d'acquisition en contrôlant temporellement l'obturateur, et donc le passage des lasers bleu et vert, la

puissance du laser rouge, l'orientation du miroir galvanométrique, le filtre d'émission et le déclenchement de la prise d'acquisition de la caméra.

2.3 Acquisition des données

Le dispositif permet d'acquérir des films d'une zone donnée de l'échantillon de typiquement 100 images avec une durée d'exposition variant de 100 ms à 1 s et un intervalle de temps entre deux images de 100 ms, pendant lequel l'échantillon n'est pas éclairé. Chaque molécule fluorescente unique est détectée sur la caméra sous la forme d'un spot occupant entre 4 et 9 pixels, ce qui correspond à la taille de la tâche de diffraction à la longueur d'onde d'émission du fluorophore considéré. Le photoblanchiment en une étape de ce spot est la signature du caractère unique de l'émetteur. Nous utilisons un programme d'analyse des images développé au laboratoire pour mesurer la durée de vie avant photoblanchiment des molécules à partir des films enregistrés. Il faut tout d'abord soustraire le bruit de fond provenant principalement de la fluorescence résiduelle de la lamelle de verre, ou dans certains cas, de la solution tampon de l'échantillon, puis sélectionner les spots fluorescents ayant une taille compatible avec celle d'une molécule unique, et finalement analyser l'évolution temporelle de la fluorescence du spot pour obtenir sa durée de vie avant photoblanchiment. Les résultats sont ensuite présentés en traçant en fonction du temps la proportion de molécules ayant blanchi normalisée par rapport au nombre de molécules uniques présentes sur la première image du film.

3. Résultats

La figure 2 montre les résultats obtenus de taux de disparition des ATTO647N en fonction de la durée d'exposition, dans différents milieux. La courbe expérimentale est ensuite ajustée par une courbe exponentielle, donnant la durée de vie des fluorophores. Notons que l'analyse est faite sans considérer la position de chaque fluorophore dans la zone d'excitation. De cette façon, l'intensité effective d'excitation n'est pas prise en compte, et les valeurs de durées de vie sont des valeurs moyennées spatialement. Nous nous sommes assurés que les données étaient comparables d'une expérience à l'autre en gardant une géométrie d'excitation identique et en utilisant des échantillons avec une répartition homogène en molécules uniques.

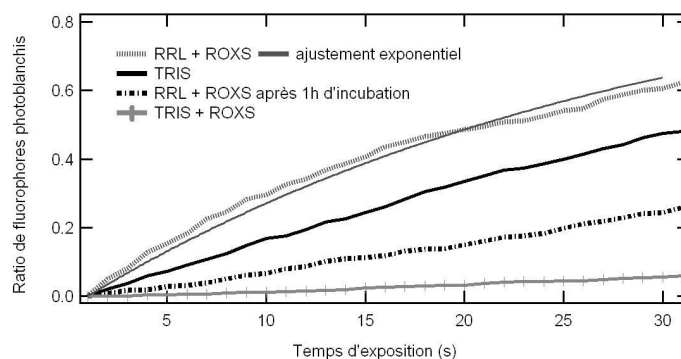


Figure 2 : Ratio de fluorophores ayant blanchi en fonction du temps d'exposition pour différentes solutions tampons.

A partir de ces courbes, nous déterminons la durée caractéristique de photoblanchiment t_B par un ajustement exponentiel avec comme seul paramètre t_B . Le tableau 1 rassemble toutes les durées caractéristiques t_B des ATTO647N que nous avons mesurées dans différents milieux. Nous confirmons l'efficacité du ROXS dans le tampon TRIS où t_B passe de 35 s à 500 s (3). Les extraits cellulaires ont tendance à accélérer le photoblanchiment de près d'un facteur 2. Dans le cas du PURE Express, l'ajout de ROXS fait remonter la durée de vie jusqu'à 200 s. Nous avons aussi étudié le comportement des ATTO550 dans le tampon de référence et le PURE Express avec et sans ROXS et obtenu des résultats similaires.

	t_B (s)	Facteur de multiplication par rapport au tampon de référence
TRIS	35	1 (réf)
TRIS + ROXS	500	15
RRL seul ou RRL + ROXS	25	0,5
RRL + ROXS (après 1h)	100	3
PURE Express	25	0,5
PURE Express + ROXS	200	5

Tableau 1 : Temps caractéristique de photoblanchiment t_B et facteur de multiplication du temps de vie des fluorophores dans différentes solutions tampons par rapport au TRIS.

En revanche, dans le cas du RRL, ajouter du ROXS semble n'avoir aucun effet perceptible. Il faut alors attendre une heure pour obtenir une amélioration d'un facteur 3 par rapport au tampon de référence sans ROXS, ce qui reste toutefois en deçà des performances dans le PURE Express (augmentation d'un facteur 5).

Le ROXS travaillant de concert avec un système appauvrissant le milieu en oxygène, nous supposons que cette inefficacité est due à une surabondance d'oxygène en solution. En effet, le RRL étant un lysat de réticulocytes, il est naturellement riche en hémoglobine. Nous sommes donc en présence d'un grand réservoir d'oxygène et il n'est pas étonnant de devoir attendre près d'une heure pour retrouver une concentration en oxygène compatible avec un faible photoblanchiment. Des mesures complémentaires sont en cours pour confirmer cette hypothèse.

5. Conclusion

L'augmentation de la durée de vie de fluorophores est un objectif important lorsque l'on souhaite les observer en molécule unique pendant la durée d'une réaction biologique. Travailler avec des extraits cellulaires tels le PURE Express ou le RRL diminue la durée de vie des fluorophores. Nous avons montré que l'utilisation de ROXS dans le PURE Express est possible et augmente les durées de vie d'un ordre de grandeur. Cependant, son utilisation dans le RRL riche en hémoglobine reste malaisée. Nous cherchons actuellement à éliminer

au préalable l'oxygène du RRL sans pour autant le dégrader, pour que le ROXS puisse être efficace immédiatement.

Remerciements

Nous remercions Gilles Clavier et Rachel Méallet-Renault (PPSM, ENS Cachan) pour leur aide sur la compréhension des mécanismes de fonctionnement du ROXS.

Ce travail a été soutenu par la Région Ile-de-France dans le cadre de C'Nano IdF, le centre de compétence en nanosciences de la région parisienne, par le CNRS et le PRES Univer'Sud.

Bibliographie

1. Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*. 2008;5(9):763-75. doi: 10.1038/nmeth.1248. PubMed PMID: WOS:000258912700009.
2. Vogelsang J, Steinhauer C, Forthmann C, Stein IH, Person-Skegro B, Cordes T, et al. Make them Blink: Probes for Super-Resolution Microscopy. *ChemPhysChem*. 2010;11(12):2475-90. doi: 10.1002/cphc.201000189. PubMed PMID: WOS:000281691100001.
3. Vogelsang J, Kasper R, Steinhauer C, Person B, Heilemann M, Sauer M, et al. A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angew Chem-Int Edit*. 2008;47(29):5465-9. doi: 10.1002/anie.200801518. PubMed PMID: WOS:000257601200042.
4. Aitken CE, Marshall RA, Pulgisi JD. An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophys J*. 2008;94(5):1826-35. doi: 10.1529/biophysj.107.117689. PubMed PMID: WOS:000253313800035.
5. Dave R, Terry DS, Munro JB, Blanchard SC. Mitigating Unwanted Photophysical Processes for Improved Single-Molecule Fluorescence Imaging. *Biophys J*. 2009;96(6):2371-81. doi: 10.1016/j.bpj.2008.11.061. PubMed PMID: WOS:000266376700032.
6. Rasnik I, McKinney SA, Ha T. Nonblinking and longlasting single-molecule fluorescence imaging. *Nature Methods*. 2006;3(11):891-3. doi: 10.1038/nmeth934. PubMed PMID: WOS:000241788500011.
7. Le Gall A, Dulin D, Clavier G, Meallet-Renault R, Bouyer P, Perronet K, et al. Improved Photon Yield from a Green Dye with a Reducing and Oxidizing System. *ChemPhysChem*. 2011;12(9):1657-60. doi: 10.1002/cphc.201100085. PubMed PMID: WOS:000292213000010.
8. Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol*. 2001;19(8):751-5. doi: 10.1038/90802. PubMed PMID: WOS:000170188600026.