

BASES DE LA FLUORESCENCE

Aurélie Le Ru, Ingénieur d'étude CNRS

Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité, Plateau d'imagerie, 24 chemin de Borde Rouge
31326 Castanet-Tolosan Cedex

leru@lrsv.ups-tlse.fr

La microscopie en fond clair permet d'observer de nombreux types d'échantillons mais présente quelques inconvénients. Les objets de faible épaisseur telle que des cellules en culture sont quasi invisibles si elles ne sont pas colorées ou observées en contraste de phase ou en contraste interférentiel (Nomarski). Les colorants histologiques, même s'ils sont nombreux, permettent de marquer des composants (cellulose, lignine...), des organites, des organismes (bactéries...) mais manquent cruellement de spécificité. L'hybridation in-situ offre une bonne spécificité mais génère beaucoup de bruit de fond. D'autre part, une observation en lumière blanche peut être détériorée par des poussières, taches de colorants, débris... qui ne mettent pas l'échantillon en valeur.

La fluorescence offre une grande gamme d'outils qui permettent de marquer spécifiquement un élément, un organite ou une protéine. Elle offre d'autre part un fort contraste car l'objet s'illumine sur un fond noir, facilitant la détection des structures d'intérêts. Ces molécules s'appellent fluorochromes ou fluorophores et sont de différentes sortes (cette partie est détaillée dans un cours à venir).

Le principe de la fluorescence est le suivant :

L'énergie E d'un photon fait passer un électron d'un état basal à un état excité.

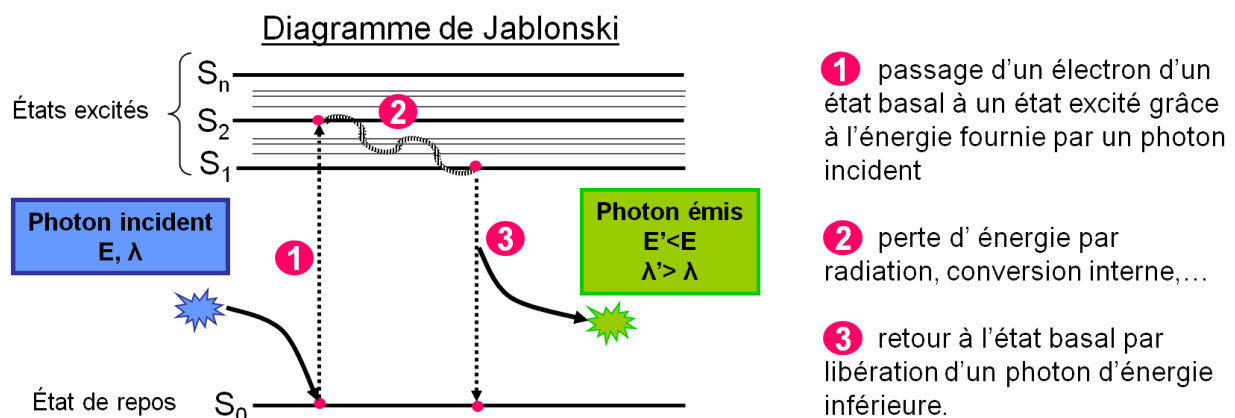
Il perd un peu d'énergie sous différentes formes (radiation, conversion interne,...) avant de retrouver son état de repos en libérant l'énergie restante sous-forme d'un photon.

Ainsi, le photon libéré est moins énergétique que le photon incident.

D'après la loi de Planck, la longueur d'onde (couleur) est inversement proportionnelle à l'énergie. Le photon émis a ainsi une plus grande longueur d'onde que le photon incident.

$$E = hc / \lambda \text{ avec } c = 299\,792\,458 \text{ m/s}$$

$$h = 6,626\,17 \times 10^{-34} \text{ J.s}$$

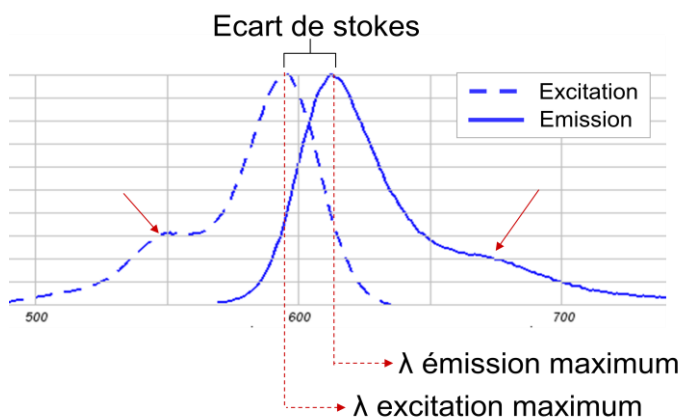


NB : on peut fournir l'énergie d'excitation non pas par un mais par 2 photons (voire plus). On parle de biphoton, triphoton ou plus généralement de multiphoton. Dans ce cas particulier, la longueur d'onde d'excitation de fluorescence est plus loin dans le spectre (dans l'infrarouge) que la longueur d'onde d'émission.

Les électrons ne sont pas tous issus des mêmes sous-couches électroniques et ne seront pas non plus sur la même couche ou sous-couche électronique une fois excités. De même ils ne seront pas sur la même sous-couche électronique après leur relaxation. Il n'existe donc pas une valeur mais une gamme de valeurs d'énergie/longueur d'onde qui sera absorbée ou émise par un fluorochrome. Pour chaque fluorochrome on peut établir un spectre de longueur d'onde capable de l'exciter et un spectre de longueur d'onde de fluorescence.

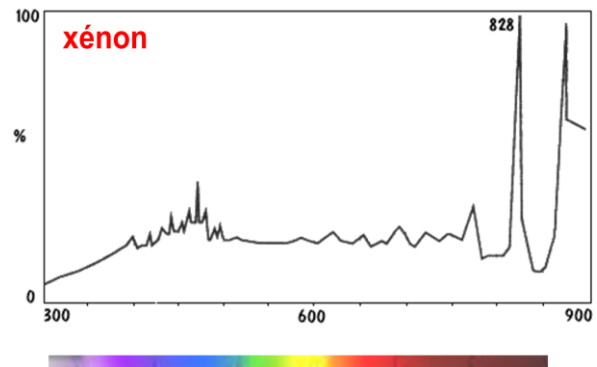
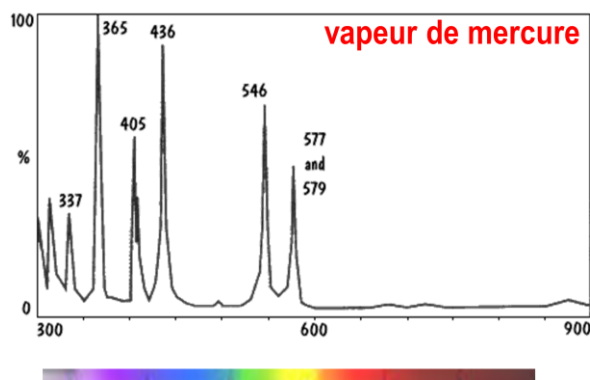
Ces spectres sont définis par plusieurs caractéristiques :

- une longueur d'onde d'absorption (excitation) et une longueur d'onde d'émission (fluorescence) maximales, spécifiques pour chaque fluorochrome.
- la longueur d'onde d'excitation est plus faible que la longueur d'onde de fluorescence (en fluorescence monophoton)
- une symétrie des spectres d'excitation et d'émission.
- L'écart de Stokes = écart entre les valeurs maximales d'excitation et d'émission. Plus l'écart de Stokes est grand, plus simple est la discrimination de la fluorescence.



Lorsqu'on illumine (excite) le fluorochrome à une longueur d'onde correspondant à son maximum d'absorption, le fluorochrome émet sous tout son spectre d'émission, la longueur d'onde pour laquelle l'émission est maximale reste la même et on a en retour une intensité de fluorescence maximale. Si par contre on l'excite à une longueur d'onde différente de son maximum d'absorption, le fluorochrome émet aussi sous tout son spectre d'émission, le maximum d'émission ne change pas, par contre l'intensité de fluorescence est plus faible. Il est donc important d'optimiser le choix des filtres d'excitation et d'émission afin de récupérer le plus possible de fluorescence.

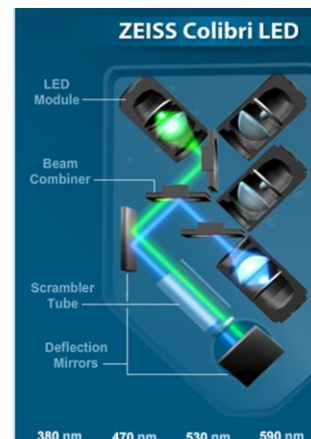
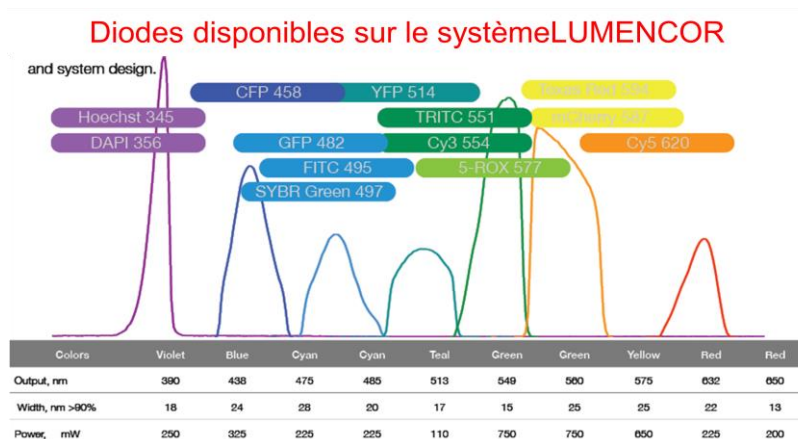
Pour fournir l'énergie nécessaire à l'excitation d'un fluorochrome on peut utiliser différentes sources de lumière. La plus répandue est la lampe à vapeur de mercure qui émet de la lumière allant de l'UV au proche infrarouge, avec des intensités très hétérogènes et notamment des pics de forte intensité pour certaines longueurs d'onde. Selon le fluorochrome à observer on a peu ou énormément de photons pour l'exciter. Outre certaines contraintes d'utilisation, ces types de lampes nécessitent d'être alignées dans le microscope, elles ont une faible durée de vie (400h) et le mercure libéré en cas de casse de l'ampoule est très toxique.



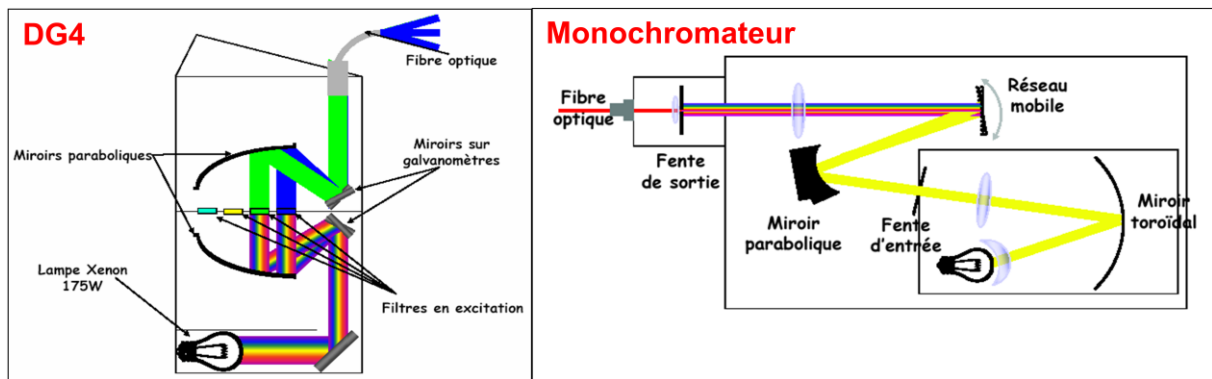
Elles sont donc peu à peu remplacées par des boîtiers moins contraignants : une ampoule xénon est disposée dans un boîtier déporté du microscope et la lumière émise est guidée via une fibre optique. La durée de vie d'environ 5000 à 10000 heures et il n'y a pas besoin d'aligner la lampe pour avoir une illumination homogène. La lampe au xénon a un spectre beaucoup plus homogène que les lampes à vapeur de mercure mais présente des pics de forte intensité dans l'infrarouge (facilement éliminés).



Il existe aussi des systèmes basés sur des LED colorées. Des boîtiers pouvant contenir jusqu'à 7 diodes de couleurs différentes, peu consommatrices d'énergie, de grande durée de vie et libérant peu de chaleur. On allume ou éteint telle ou telle LED pour illuminer nos fluorochromes et une fibre optique amène la lumière au microscope. Il n'y a donc plus besoin de filtres d'excitations ce qui peut apporter un peu de souplesse et de rapidité pour certaines applications. La contrainte est que même s'il existe déjà beaucoup de LED disponibles pour exciter les plus courants des fluorochromes, on dépend des LED existantes.



Pour la vidéo-microscopie, il existe des systèmes dédiés permettant un changement très rapide de longueur d'onde. L'un d'eux est le système DG4 qui est aussi basé sur une lampe xénon dont la lumière est très rapidement (1.4ms) orientée vers différents filtres grâce à des miroirs galvanométriques ce qui permet d'exciter séquentiellement plusieurs fluorochromes. Le monochromateur est un système similaire, mais un peu plus souple. La lumière de la lampe xénon est diffractée sur un réseau et une fente permet de sélectionner une gamme de longueur d'onde d'excitation. On peut changer ce spectre aussi rapidement que pour le DG4 et il n'y a donc plus besoin de filtres d'excitations.

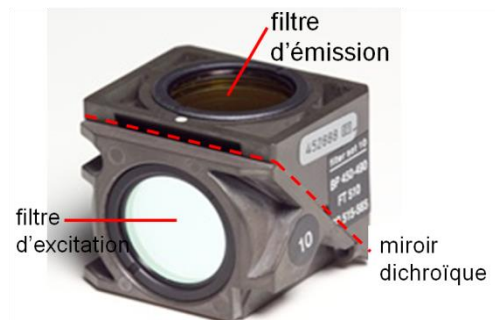


La plupart des systèmes d'illumination émettent de la lumière blanche. Cette lumière peut exciter n'importe quel fluorochrome mais également tous les fluorochromes en même temps, ce qui pose problème dans le cas d'un multimarquage. Afin d'exciter spécifiquement un fluorochrome de notre échantillon et de récupérer uniquement la lumière qu'il aura émise, on a besoin d'utiliser des filtres de fluorescence. Ils sont organisés dans un bloc filtre qui contient un filtre d'excitation qui sélectionne les longueurs d'onde qui exciteront notre fluorochrome, un filtre d'émission qui sélectionnera notre fluorescence spécifique et un miroir dichroïque entre les 2.

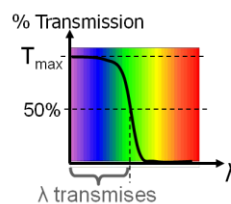
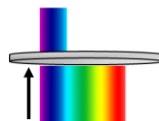
Pour les filtres d'excitation/émission, nous avons le choix entre 3 configurations : les short pass (passe bas), les long pass (passe haut) et le combo des 2, le band pass. Ils permettent respectivement de laisser passer toutes la lumière de longueur d'onde inférieure, supérieure ou entre 2 valeurs.

Le miroir dichroïque et un peu comme un filtre long pass sauf qu'au lieu de bloquer la lumière inférieure à une certaine valeur, il la réfléchit. En mettant ce dichroïque à 45° dans le bloc filtre, on réfléchit la lumière reçue avec un angle de 90° entre la source et la sortie.

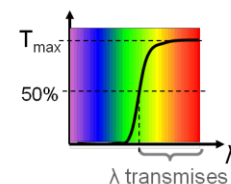
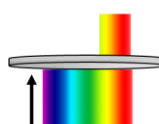
On peut ainsi avoir par exemple un bloc filtre avec un filtre d'excitation band pass, un miroir dichroïque et un filtre d'émission long pass. Il faut un bloc filtre par fluorochrome.



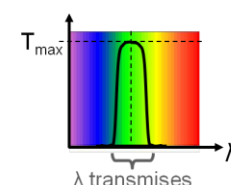
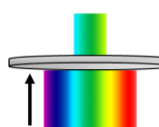
Short pass (passe bas): laisse passer les $\lambda <$ à une valeur et bloque les autres
Un filtre SP500: laisse passer les $\lambda < 500$



Long pass (passe haut): laisse passer les $\lambda >$ à une valeur et bloque les autres
Un filtre LP500: laisse passer les $\lambda > 500$



Band pass (passe bande): laisse passer les λ comprise entre 2 valeurs et bloque les autres
Un filtre AF500/30: laisse passer les λ comprises dans une bande de 30 nm centrée sur 500nm soit de 485 à 515nm.
500+/- (30/2)



Concernant les systèmes d'illumination particuliers (DG4, monochromateur, LED) on mettra dans le microscope un bloc filtre qui contiendra uniquement un miroir dichroïque et un filtre d'émission. On pourra dans ce cas utiliser des filtres et dichroïques multi-bandes c'est-à-dire qui auront plusieurs bandes passantes

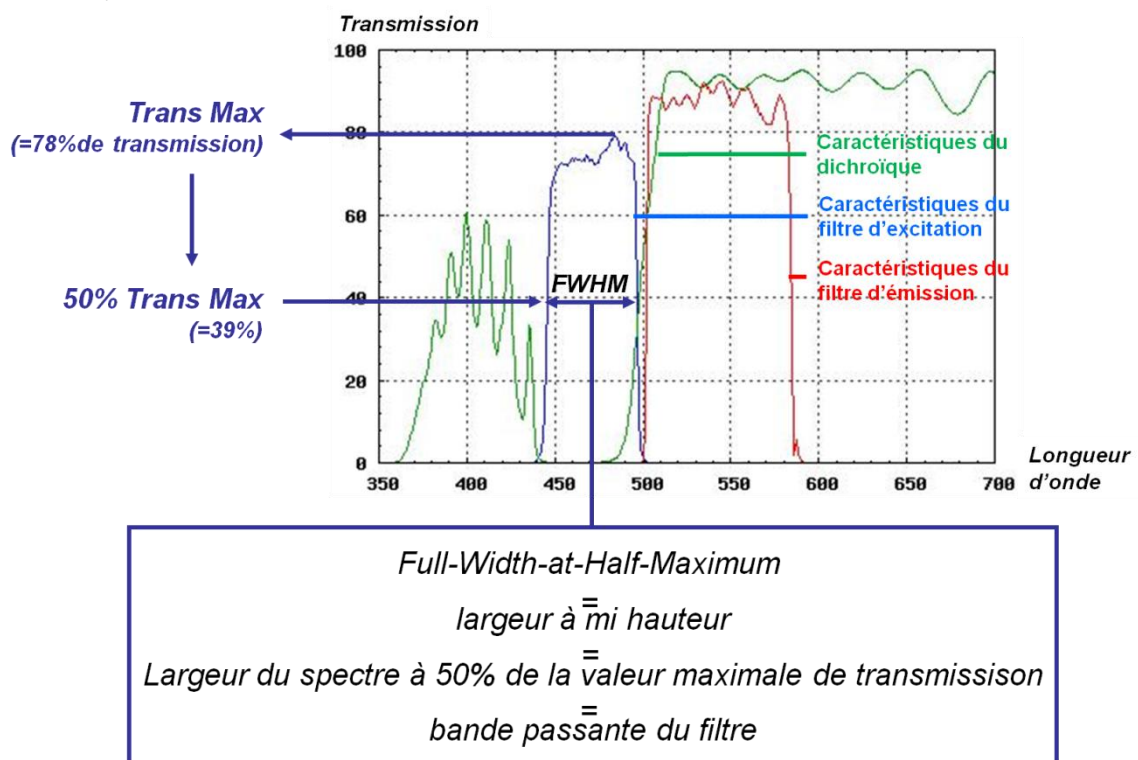
ou qui auront alternativement des bandes réfléchissantes et des bandes passantes. Le dichroïque sera tel qu'il réfléchira les longueurs d'onde d'excitation des fluorochromes et sera transparent pour

le reste. Le filtre de fluorescence aura autant de band pass que de fluorochromes. L'idée est de gagner en vitesse en ne changeant pas le filtre du microscope et de visualiser les fluorochromes l'un après l'autre seulement en changeant l'excitation. Le risque est cependant d'avoir des problèmes de bavage, nous le verrons plus bas.

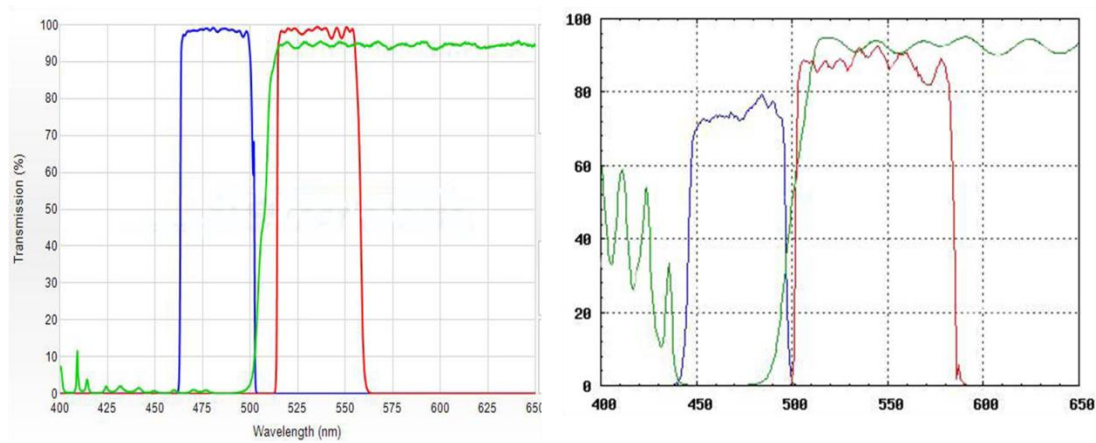
Les filtres et des blocs filtres sont vendus avec une courbe de leurs caractéristiques nomenclaturées comme suit :

Les long pass, short pass et miroirs dichroïques sont définis par une valeur. Cette valeur correspond à la demi-transmission du filtre : on prend la plus grande valeur de transmission, on la divise par 2 et la longueur d'onde où coupe le graphe correspond à la valeur seuil du filtre. Par exemple le filtre 450LP est un long pass qui bloque les longueurs d'onde inférieures à 450 nm et laisse passer la lumière au dessus de 450nm.

Les bands pass sont définis par une valeur centrale et une bande passante (=FWHM, largeur à mi hauteur). On prend la transmission maximale, on divise par 2 et les 2 longueurs d'onde d'intersection avec la courbe de transmission sont le minima et le maxima du spectre de lumière que laissera passer le filtre. La valeur médiane de cette fourchette est la valeur de référence. Par exemple si les longueurs d'onde de FWHM d'une courbe de transmission sont 425nm et 475nm, la bande passante est de 475-425=50nm et la valeur médiane est 450nm. La nomenclature correspondante sera 450/50 ou 450AF50,...

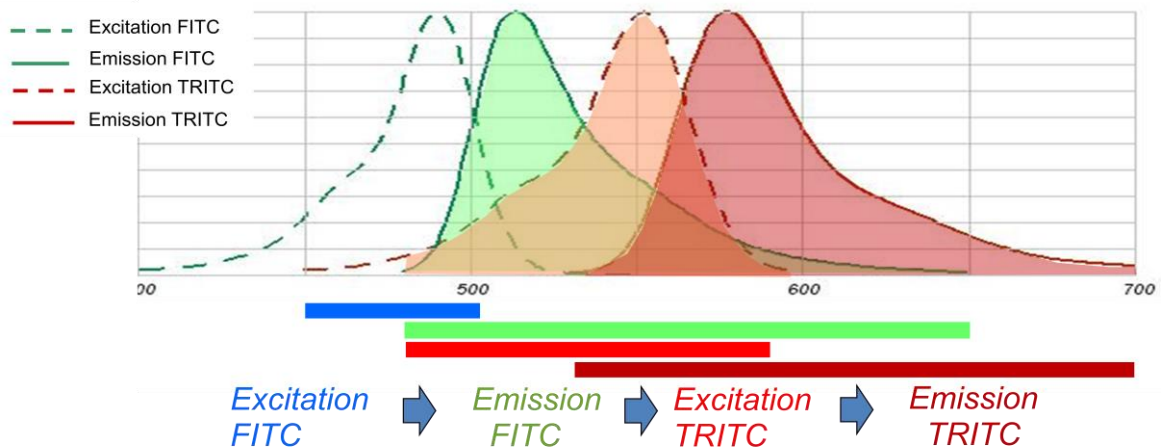


Il faut noter que les nomenclatures telles que 450AF50 ou 450LP ne donnent aucune indication sur la qualité du filtre c'est-à-dire sur la transmission maximale ou sur la propreté du spectre. Selon la qualité du filtre on peut frôler les 100% de transmission ou n'avoir de 40% de la lumière qui pourra passer le filtre, avoir des doubles pics ou des variations de transmission plus ou moins franches.



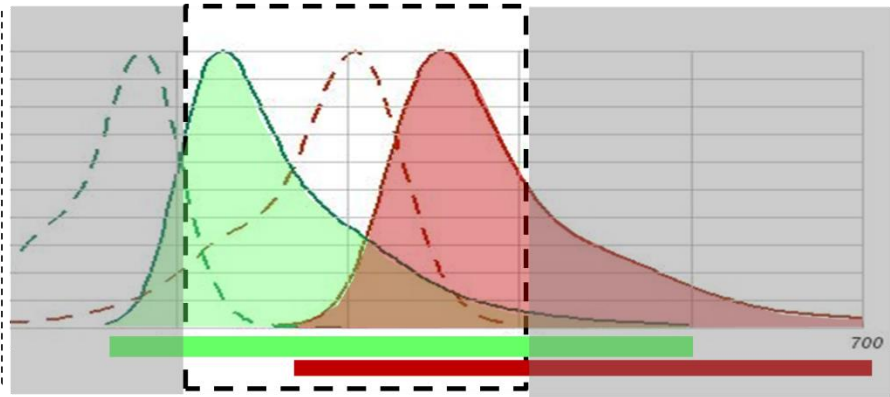
Le choix d'un filtre est très important dans la véracité d'une image. Une mauvaise configuration, notamment un filtre avec une bande passante trop large peut impliquer une mauvaise analyse de l'image. Prenons l'exemple classique d'une cellule avec un double marquage de type GFP/TRITC pour 2 protéines en vue de comparer leur localisation.

En regardant les spectres d'excitation et de fluorescence de ces 2 fluorochromes on voit qu'il y a chevauchement : le spectre d'émission de la GFP recouvre le spectre d'émission du TRITC. L'image de fluorescence de la GFP peut donc inclure de la fluorescence du TRITC.

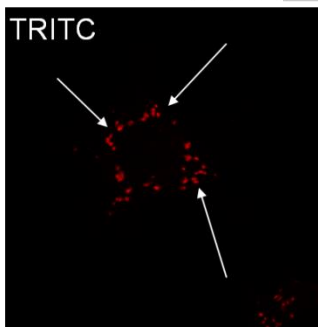
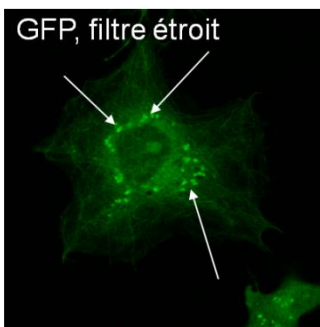
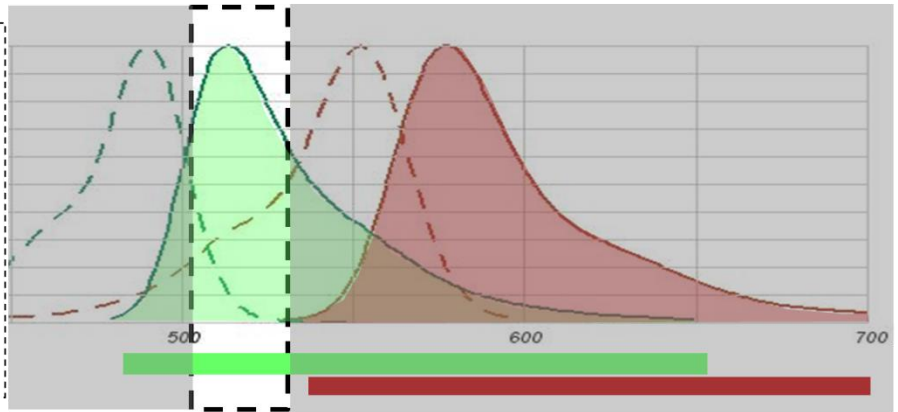


Si on fait une image GFP avec un filtre long pass ou avec un band pass trop large on verra la fluorescence de la GFP ainsi que la fluorescence de la TRITC (le bavage). En comparant cette image avec l'image TRITC seule on aura l'impression que les 2 protéines sont au même endroit alors qu'il s'agit juste d'une erreur. Un filtre d'émission plus étroit évitera le problème.

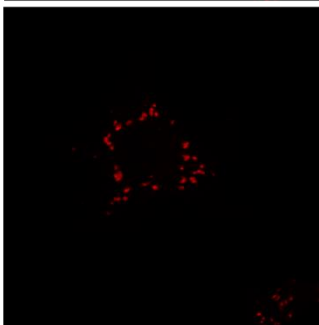
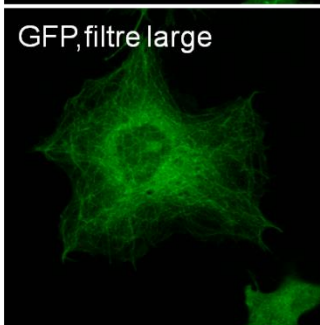
Filtre d'émission FITC trop large
>> récupère aussi la fluorescence TRITC



Filtre d'émission FITC restreint >> ne récupère que l'émission du FITC (même si le TRITC émet aussi de la fluorescence)



*Passage du TRITC dans le filtre FITC: on voit les spots
>> colocalisation*



*Plus de spots
>> aucune colocalisation*

En conclusion il est possible d'optimiser une manip rien qu'en optimisant le choix du matériel utilisé notamment des filtres. Il est généralement plus simple de se renseigner sur le matériel disponible (filtre, lasers de confocaux) et de choisir en conséquence, lorsque c'est possible, les fluorochromes adéquats. Connaître et comprendre les spécificités de ce matériel est aussi important pour éviter les erreurs d'analyse des résultats.