

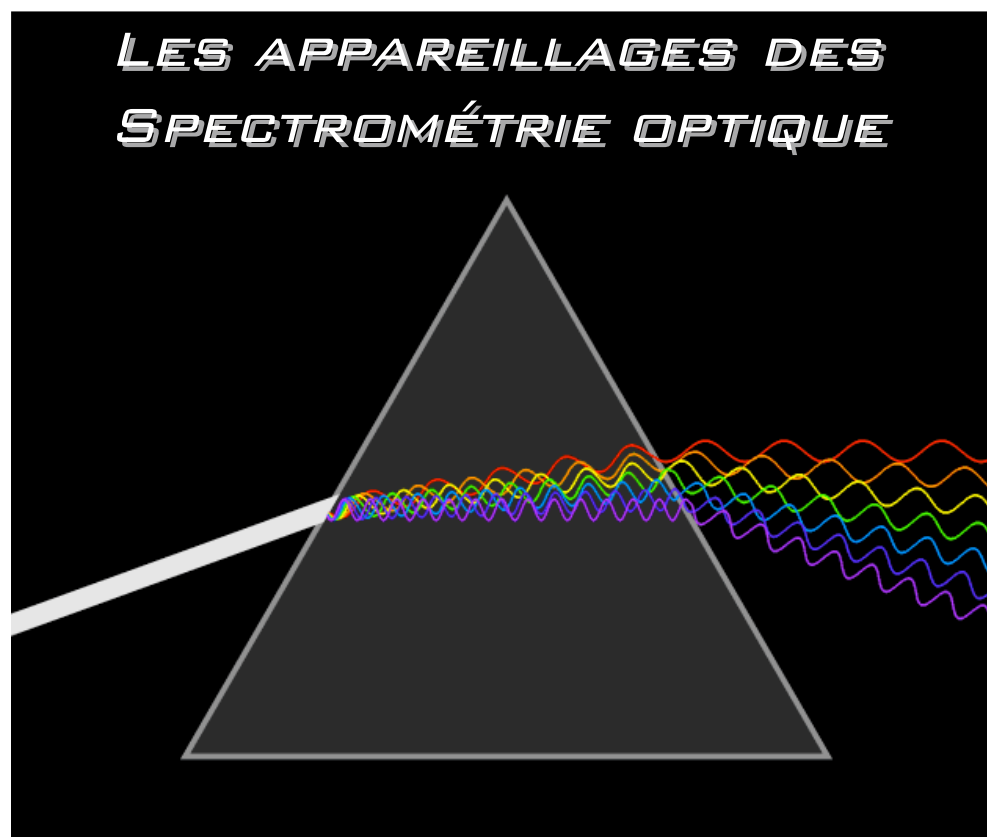


# ATELIERS DE BIOPHOTONIQUE

Acides Nucléiques & Biophotonique



Université Pierre & Marie Curie / C.N.R.S.



# **1. SPECTROSCOPIES OPTIQUES CONVENTIONNELLES**

*SPECTROPHOTOMÈTRE, SPECTROFLUORIMÈTRE,*

# **2. ANALYSE SPECTRALE EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE**

*PRINCIPE EXPÉRIMENTALE*

*APPORT DE L'ANALYSE SPECTRALE*

# **3. MESURES DES DURÉES DE VIE EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE**

*PRINCIPE EXPÉRIMENTAL*

*APPORT DE L'ANALYSE TEMPORELLE*

# **4. FRET INTRACELLULAIRE**

*PRINCIPE ET ILLUSTRATION*

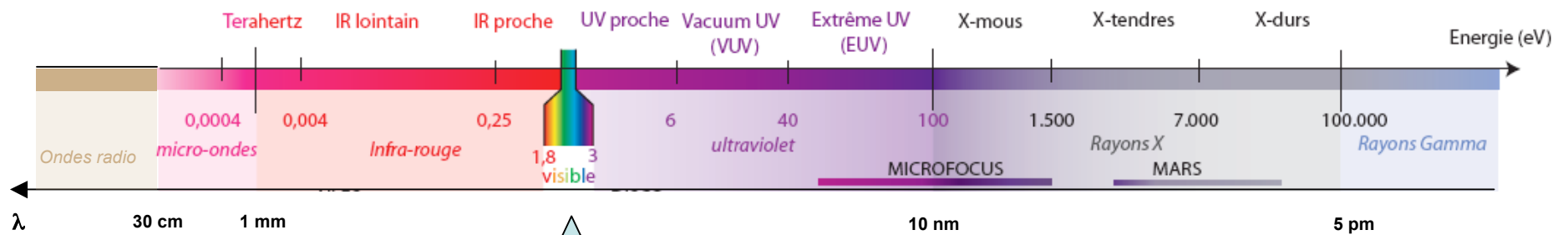
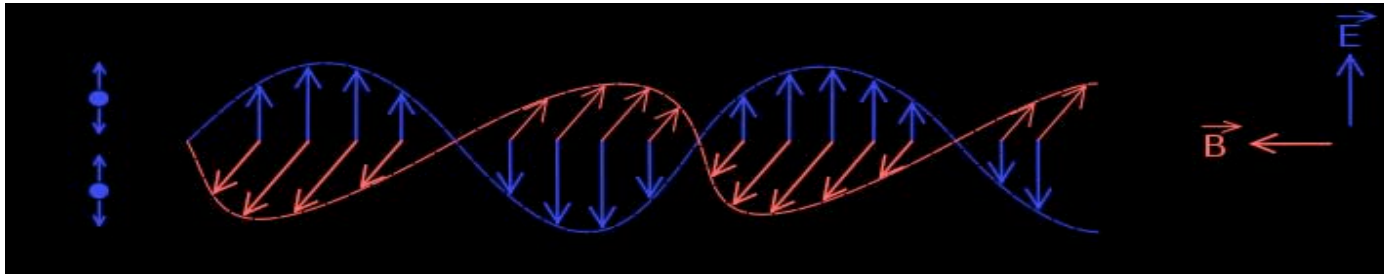
# SPECTROSCOPIES OPTIQUES CONVENTIONNELLES

*SPECTROPHOTOMÉTRIE, SPECTROFLUORIMÉTRIE,*

*ANALYSE MACROSCOPIQUE EN SOLUTION*

*CARACTÉRISE L'INTERACTION DU RAYONNEMENT ELECTROMAGNÉTIQUE  
DU DOMAINE UV-VISIBLE AVEC LA MATIÈRE*

# SPECTRE DES ONDES ÉLECTROMAGNÉTIQUES



SPECTRE VISIBLE:  $400 < \lambda < 745 \text{ nm}$

$$E = h \cdot C / \lambda$$

$h = 6,626069 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$   
(constante de Planck)

$C = 299\,792\,458 \text{ m/s}$   
(vitesse de la lumière dans le vide)

Donc  $E = f(1/\lambda)$

# DENSITÉ OPTIQUE ET SPECTRE D'ABSORPTION

Le phénomène d'absorption par une molécule de l'énergie  $E=hC/\lambda$  caractéristique d'une onde électromagnétique dans le domaine UV-visible correspond à la transition d'un électron de son état électronique fondamentale vers un état électronique excité.

Expérimentalement, pour caractériser l'absorption d'une molécule à la longueur d'onde  $\lambda$ , on mesure l'intensité  $I_t$  de la lumière transmise par rapport à l'intensité  $I_0$  de la lumière incidente

On définit alors la densité optique (d.o.) de la solution comme suit:  $d.o = -\log(I_t/I_0)$

La spectroscopie d'absorption consiste à mesurer cette d.o en fonction de la longueur d'onde  $\lambda$  du rayonnement incident.

L'absorption d'une lumière de longueur d'onde  $\lambda$  par une solution d'une molécule donnée dépend :

- du coefficient d'absorption  $\epsilon_\lambda$  caractéristique de l'efficacité d'absorption de cette molécule à la longueur d'onde  $\lambda$
- de la longueur  $l$  du parcours traversé par la lumière (en cm)
- de la concentration de la solution en molécules (en Moles/litre)

on définit alors la relation suivante:  $d.o = -\log(I_t/I_0) = \epsilon_\lambda \cdot C \cdot l$

avec  $I_0$  correspondant à l'intensité de la lumière incidente et  $I_t$  correspondant à l'intensité de la lumière transmise

Ainsi si l'on connaît la valeur  $\epsilon_\lambda$  de la molécule étudiée, on a une relation directe entre la mesure expérimentale de la d.o et la concentration  $C$  de la solution.

*Rq.1 : les valeurs de  $\epsilon_\lambda$  caractéristiques des molécules utilisées pour des marquage en fluorescence sont généralement de l'ordre de 10.000 pour la longueur d'onde d'absorption maximale. Ainsi pour une solution de ce type de molécule, une d.o. égale à 0,1 (soit 1% d'absorption de la lumière incidente) mesurées sur une cuve de parcours 1cm correspond à une concentration de la solution de l'ordre de (0,1/10.000) soit  $10^{-5}$  M.*

# RENDEMENT QUANTIQUE, SPECTRE DE FLUORESCENCE ET DURÉE DE VIE DE FLUORESCENCE

Les molécules qui ont absorbé l'énergie de la lumière d'excitation retournent rapidement dans leur état fondamental en dissipant leur excès d'énergie.

L'une des voies de désexcitation correspond à l'émission de la fluorescence.

L'énergie dissipée par émission de fluorescence peut varier d'une molécule à l'autre ce qui se traduit par des émissions à différentes longueurs d'ondes. L'énergie restituée est toujours  $\leq$  à l'énergie absorbée. Donc  $\lambda_{em} > \lambda_{abs}$ .

L'analyse de l'intensité de la fluorescence réémise aux différentes longueurs d'onde correspond au spectre d'émission de fluorescence:  $I_{flu} = f(\lambda)$

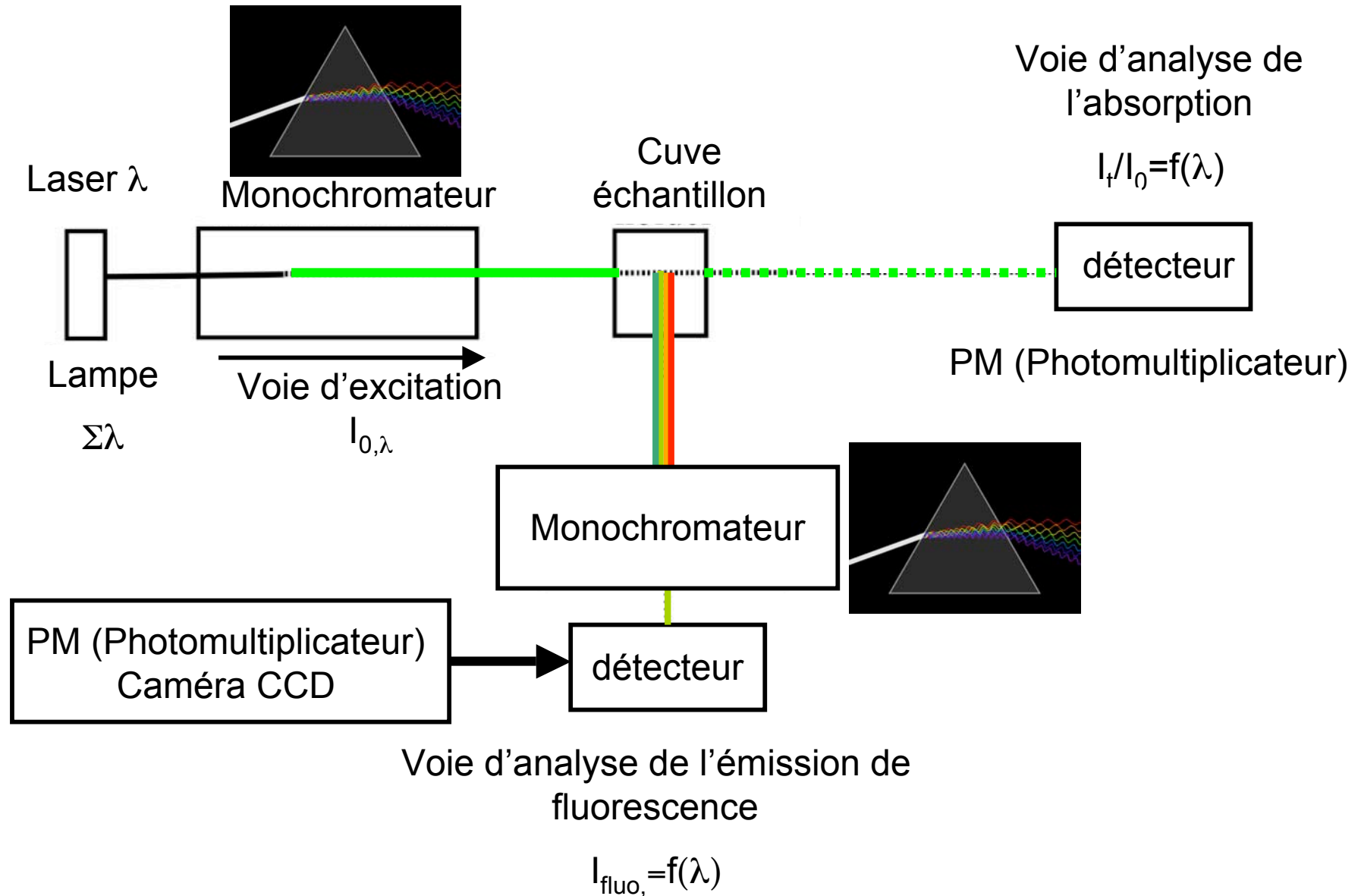
Le rendement quantique de fluorescence  $\Phi_f$  est défini comme le rapport de l'intensité de la lumière de fluorescence réémise par rapport à l'intensité de la lumière incidente absorbée. Plus ce rendement est élevé plus la molécule est fluorescente.  $\Phi_f = I_{flu} / I_{abs}$

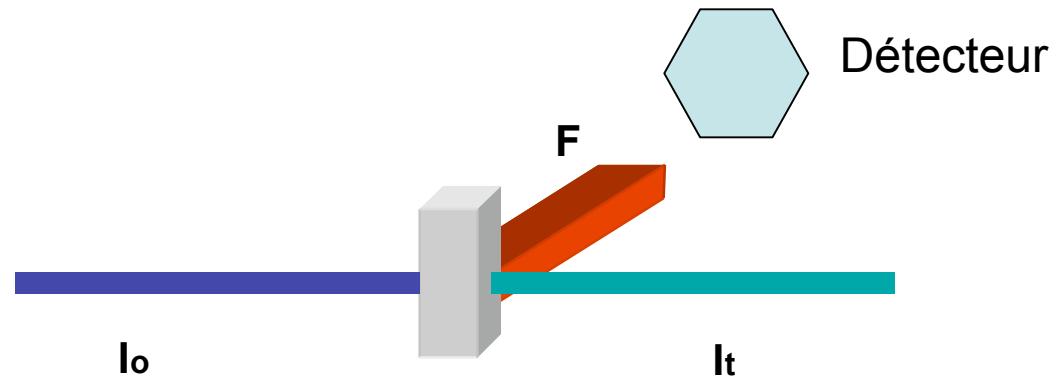
La durée de vie de fluorescence  $\tau_f$  correspond au temps moyen qui s'écoule entre l'absorption de l'énergie de la lumière incidente et le retour à l'état fondamental par émission de fluorescence.

Pour les marqueurs fluorescents, l'ordre de grandeur de  $\tau_f$  est de quelques nanosecondes ( $10^{-9}$  seconde)

Rq.2 : Le spectre d'émission et la durée de vie de l'état excité sont des caractéristiques spécifiques de chaque molécule fluorescente et ne dépendent pas de sa concentration. Ces paramètres sont par contre extrêmement sensibles à l'environnement (nature du solvant, interaction avec d'autres molécules, température, pH, polarité, ...).

# SPECTROPHOTOMÈTRE, SPECTROFLUORIMÈTRE





$$I_A = I_0 - I_T = I_0(1 - 10^{-\epsilon c l})$$

$$(1 - e^{-x}) \approx_0 x$$

$$I_A = I_0(1 - e^{-2,3\epsilon c l})$$

$$(1 - e^{-2,3\epsilon c l}) \approx 2,3\epsilon c l$$

$$F = I_0 \cdot (2.3 \cdot \epsilon_\lambda \cdot c \cdot l) \cdot \phi_F \cdot \Omega \cdot T_\lambda \cdot S_\lambda$$

Instrument

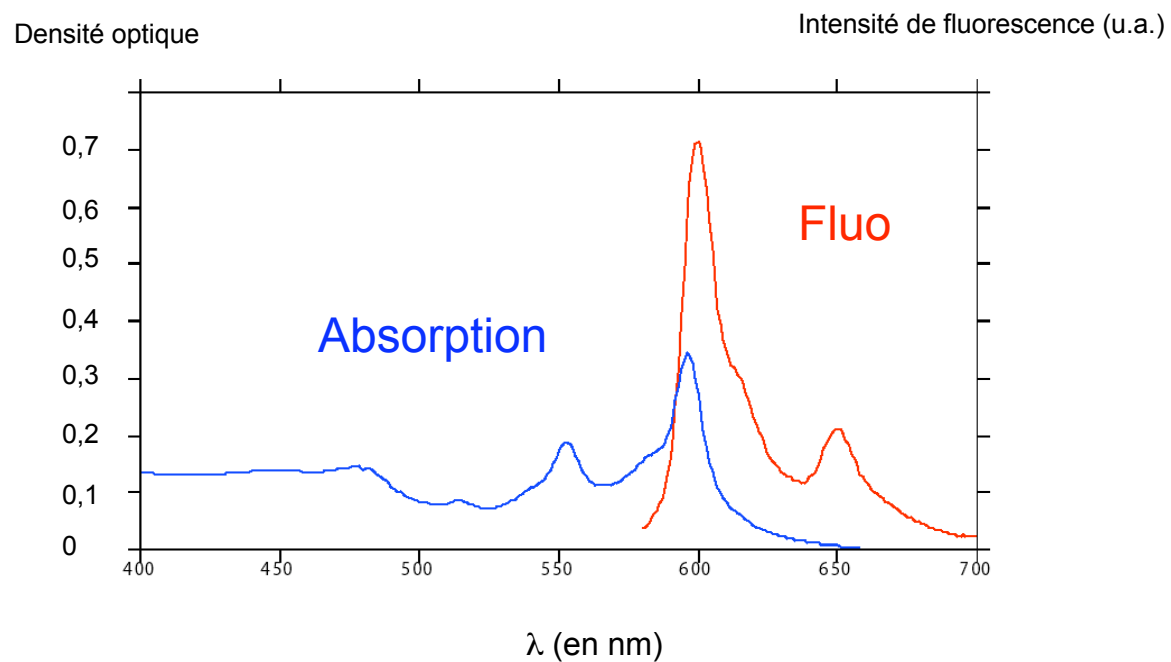
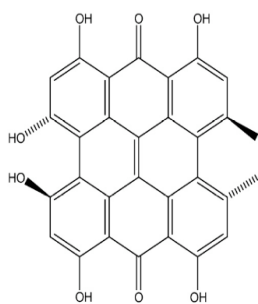
Molécule

$\Omega$  : angle solide de collection de la voie d'analyse

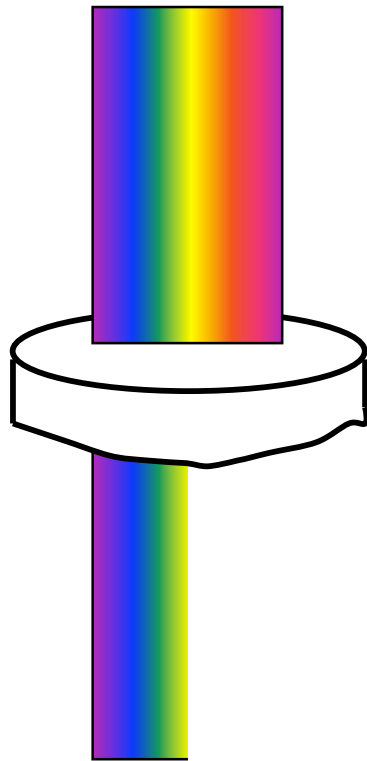
$T_\lambda$  : facteur de transmission de la voie d'analyse

$S_\lambda$  : sensibilité du détecteur de signal

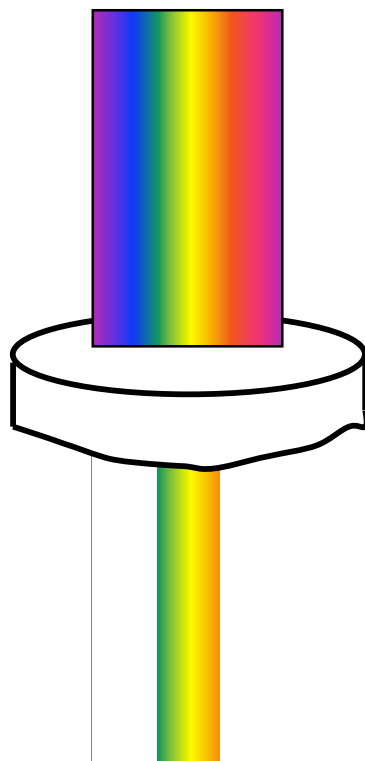
# *SPECTRE D'ABSORPTION ET DE FLUORESCENCE DE L'HYPÉRICINE EN SOLUTION DANS LE DMSO*



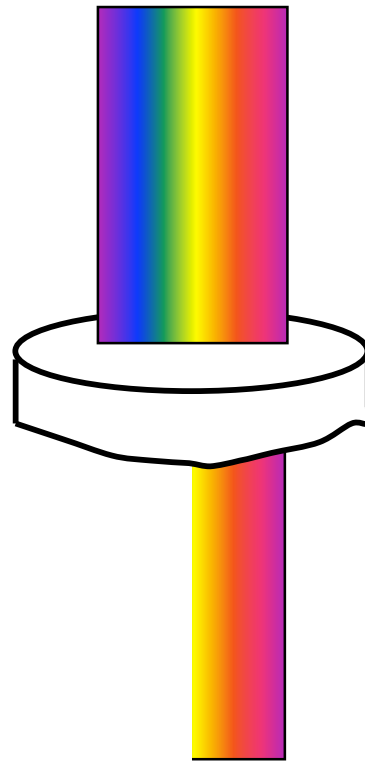
# FILTRES



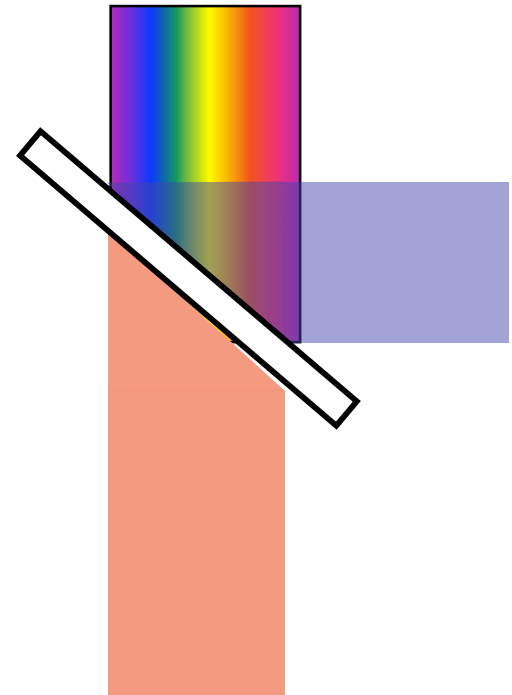
Passe bas



Passe bande  
BP



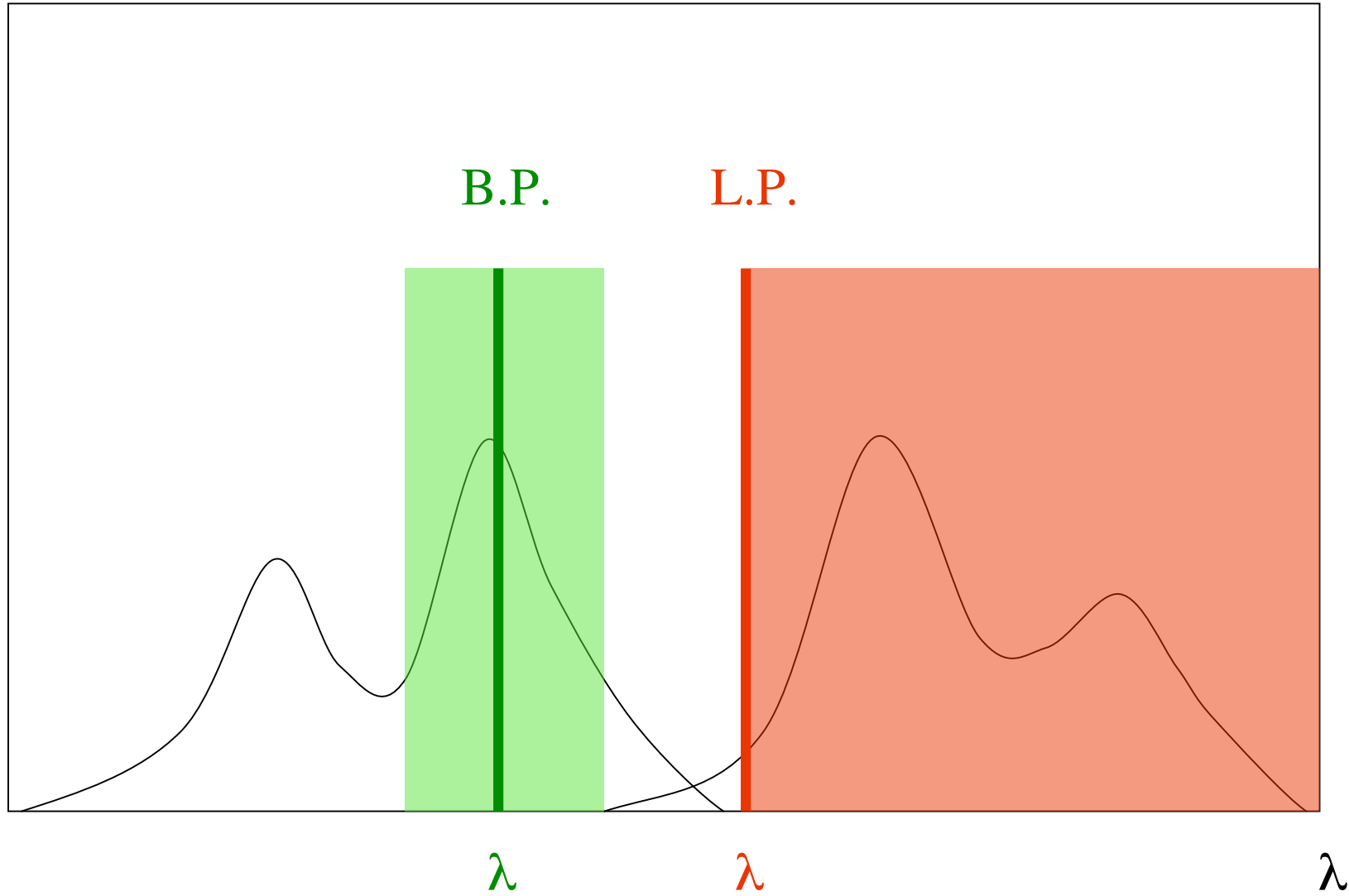
Passe haut  
Long Pass : LP



Miroir  
Dichroïque : DM

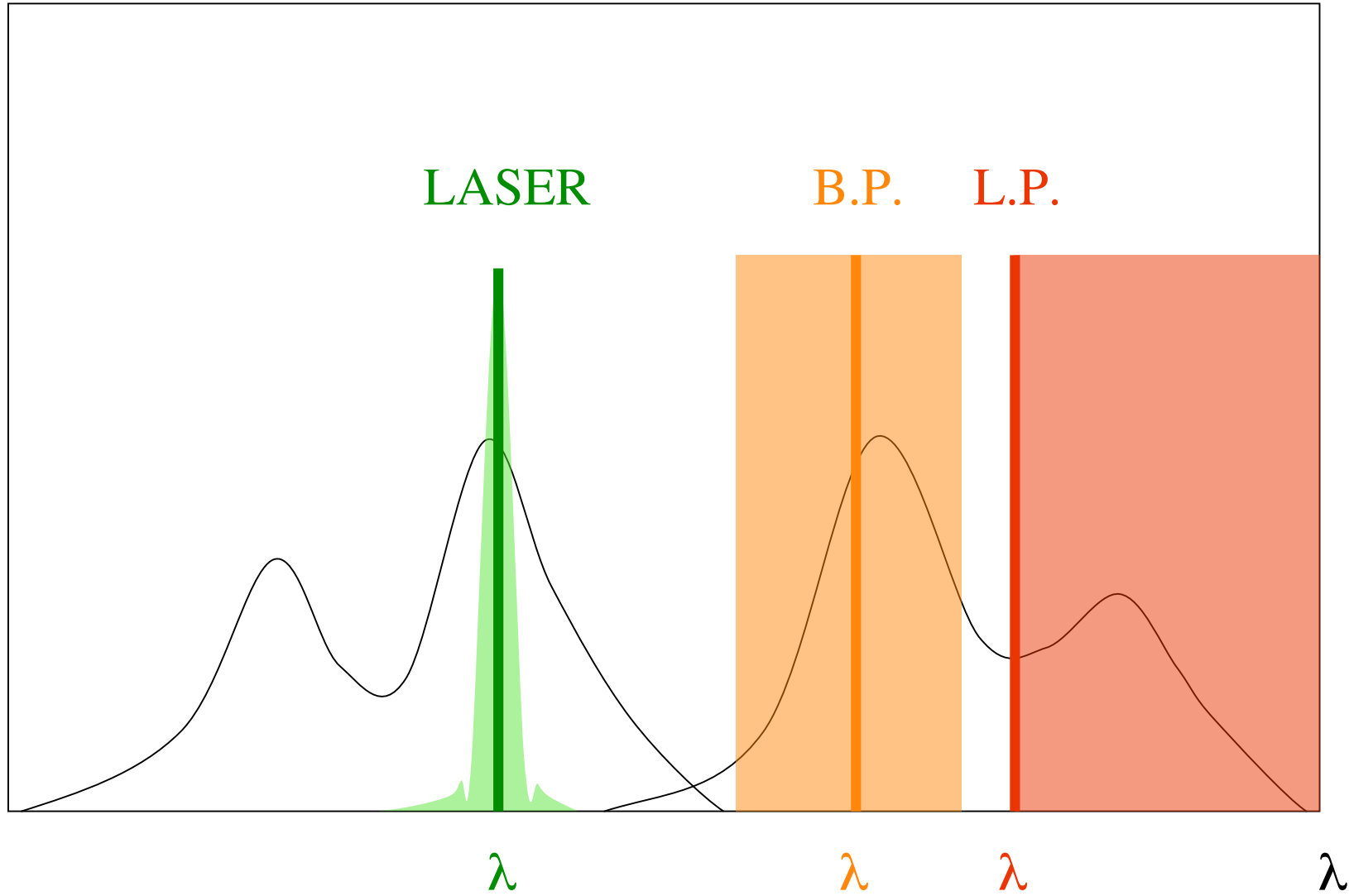
# IMAGERIE DE FLUORESCENCE

If



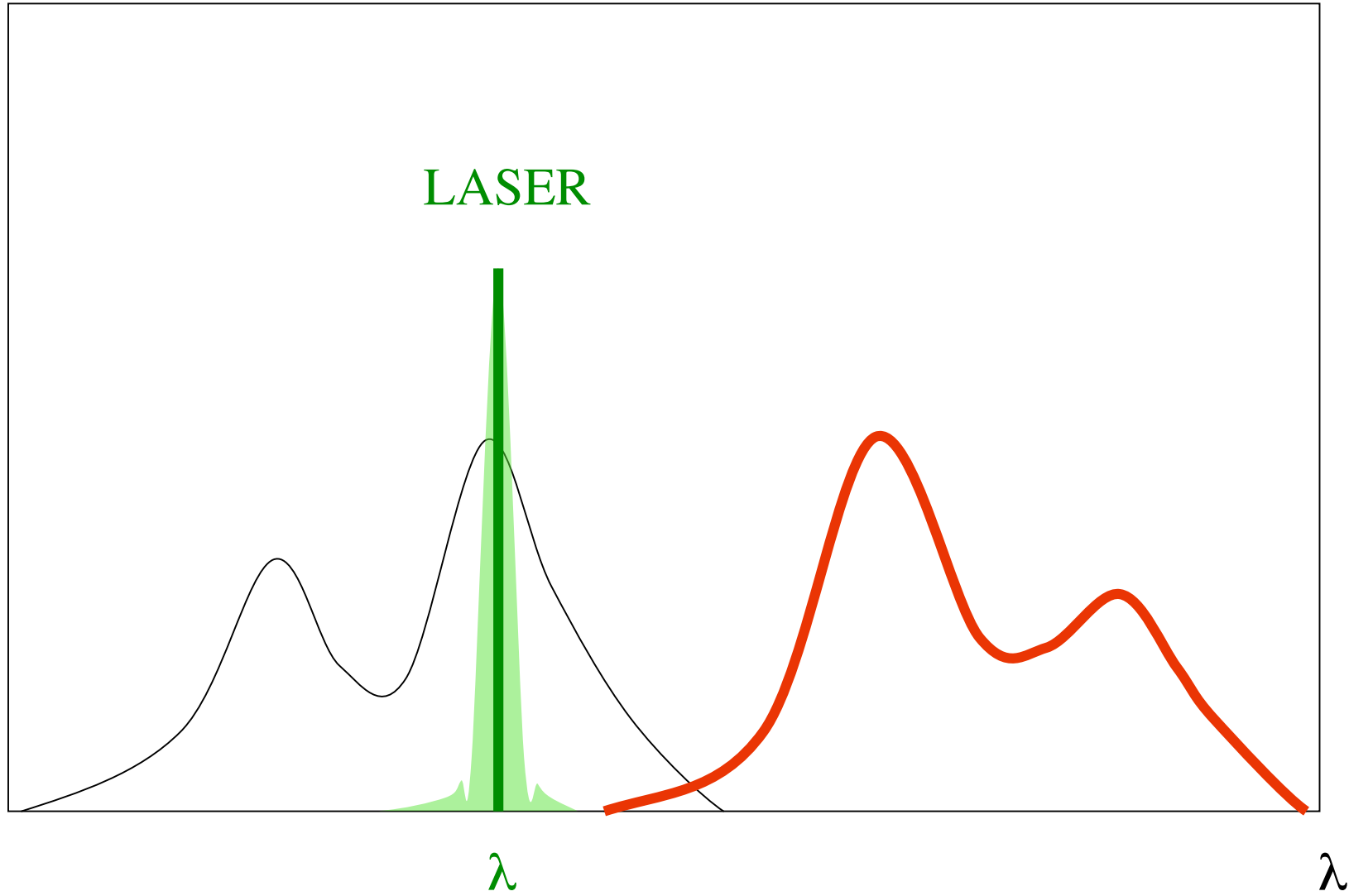
# AVEC EXCITATION LASER

If

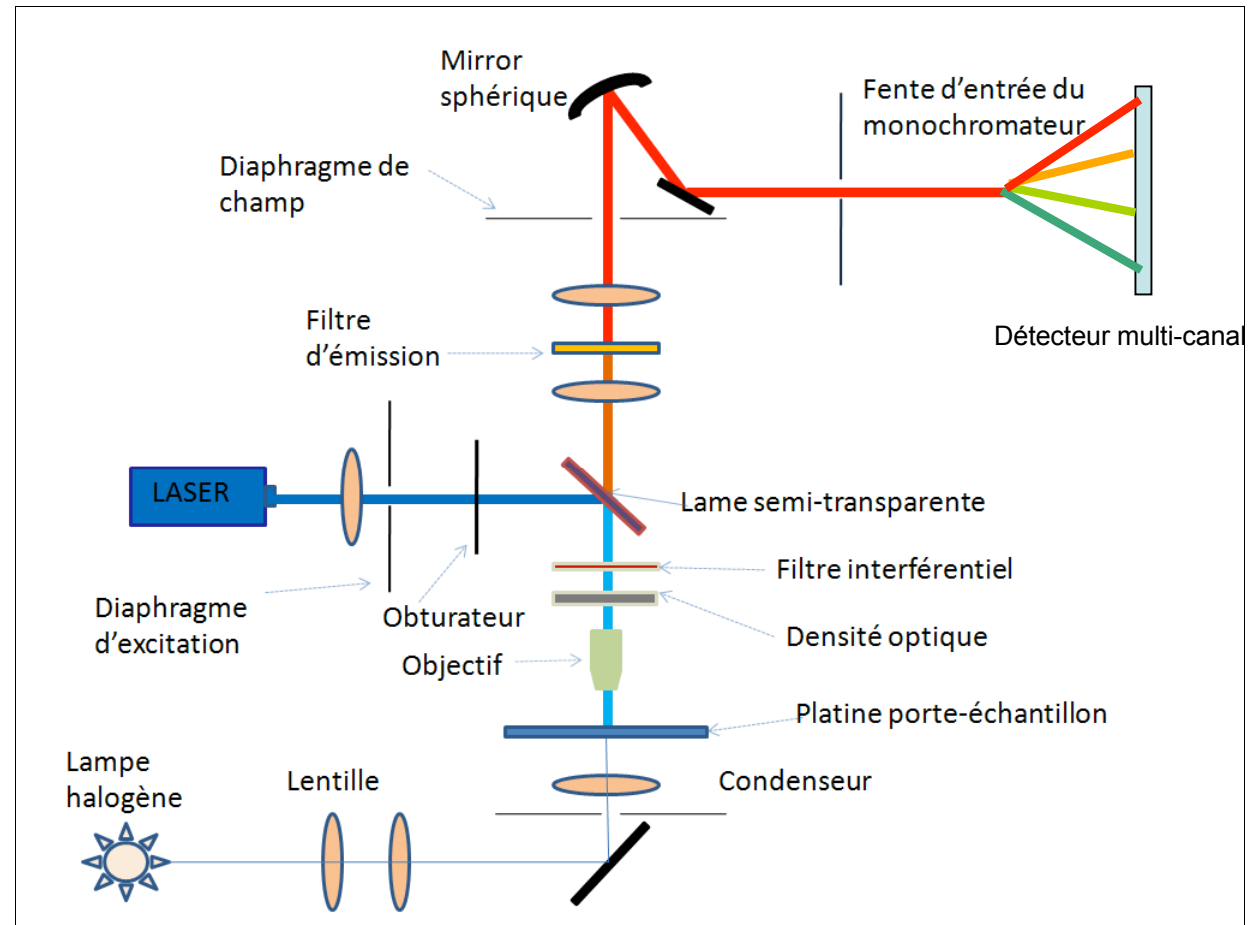


# MICROSPECTROFLUORIMÉTRIE

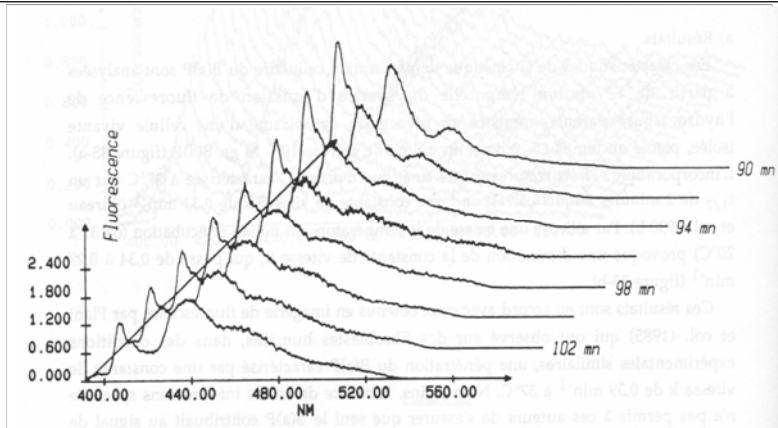
If



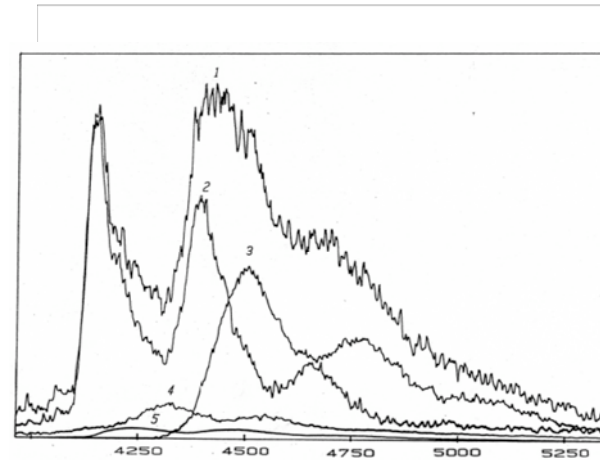
# ANALYSE SPECTRALE EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE



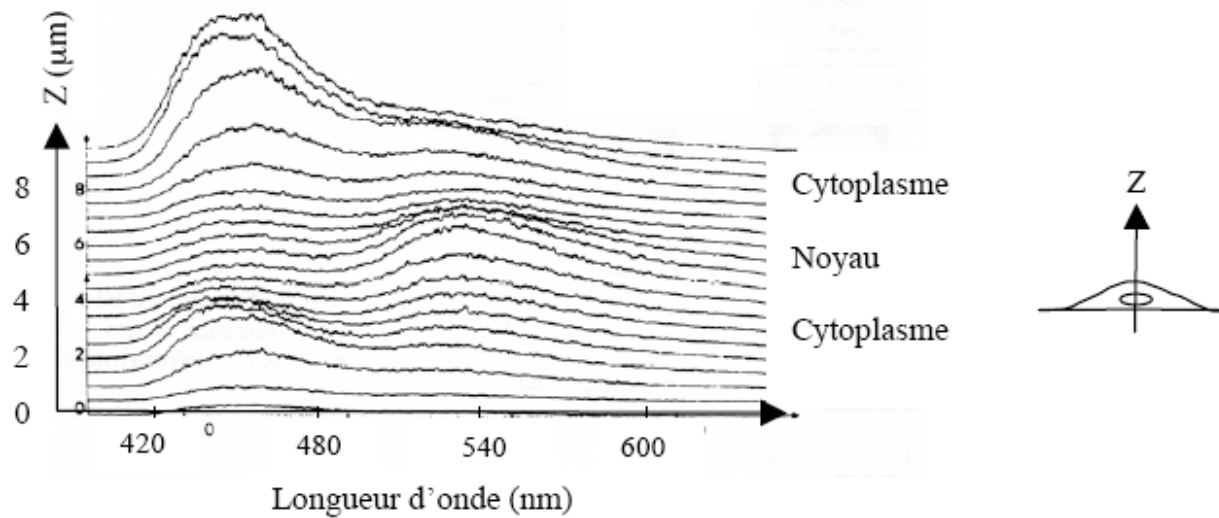
*Évolution temporelle du spectre de fluorescence intracellulaire au cours de la métabolisation du Benzo[a]Pyrène*



*Décomposition du spectre expérimental à partir du spectre du B[a]P et des spectres des différents métabolites isolés par HPLC.*



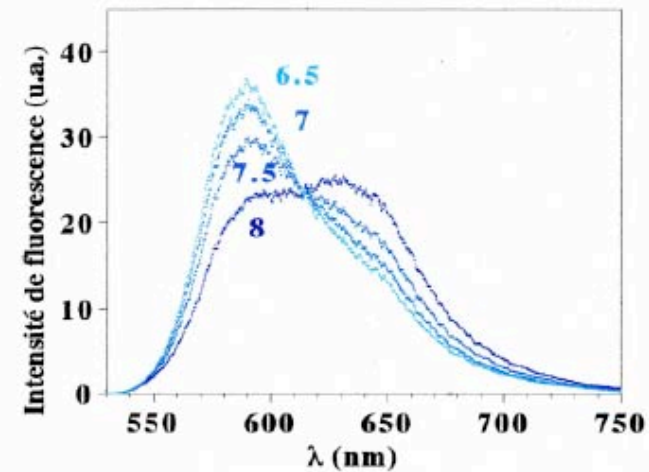
**L'analyse spectrale permet ici de mettre en évidence la modification chimique du composé fluorescent et d'identifier les produits issus de la réaction.**



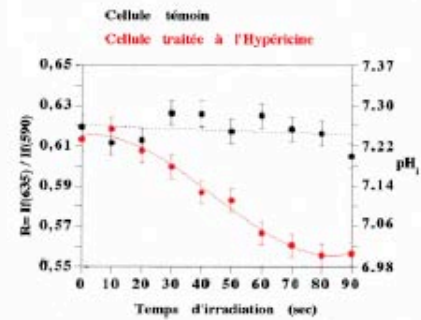
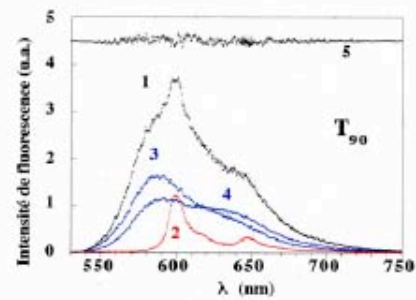
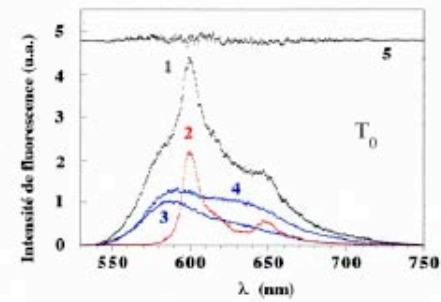
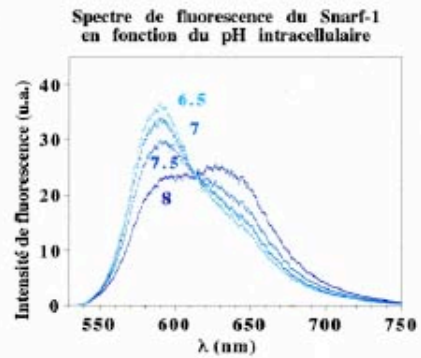
*Spectres de fluorescences intracellulaires de l'ellipticine en fonction du plan de mise au point  
( $\Delta Z=0,5\mu\text{m}$  entre chaque spectre)*

**L'analyse spectrale en mode confocale permet ici de mettre en évidence l'hétérogénéité de l'environnement local du composé fluorescent.**

*Spectres intracellulaires de la sonde  
fluorescente Snarf-1 en fonction du pH.*



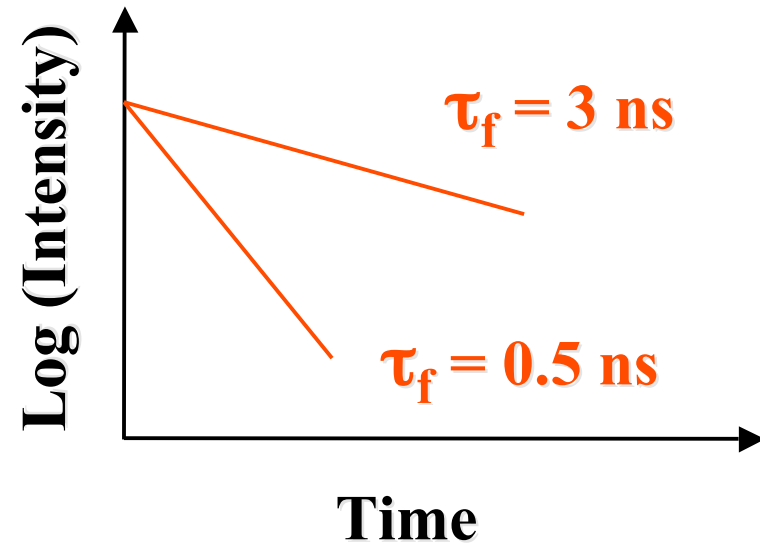
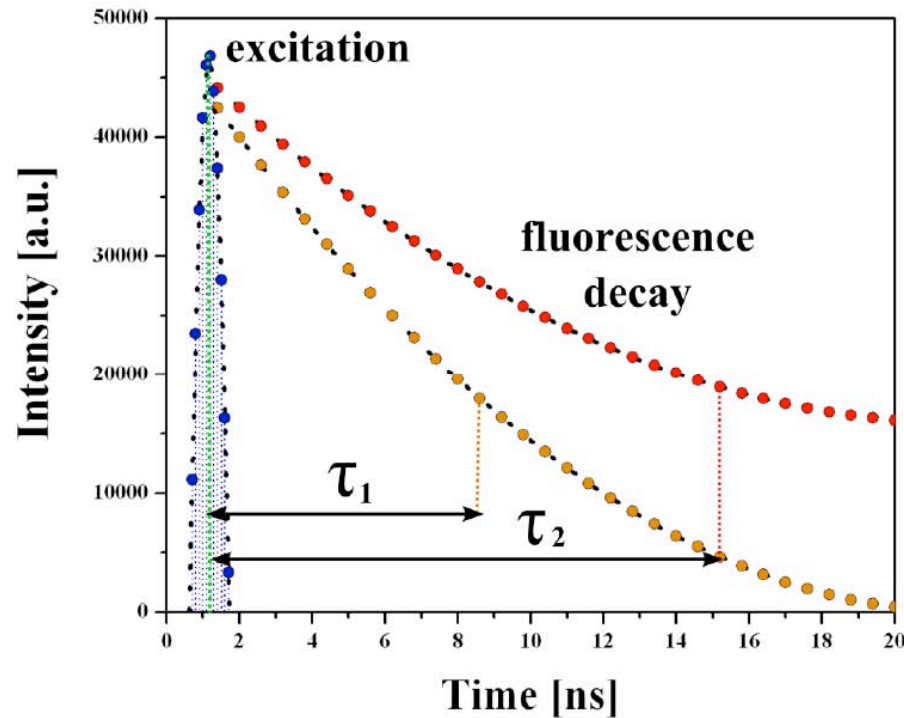
**L'analyse spectrale permet ici de mesurer l'équilibre entre la forme neutre et protonnée de la sonde afin de calculer la valeur intracellulaire du pH. D'autres sondes ratiométrique ont été développées notamment pour la mesure de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$ , en  $\text{Mg}^{++}$ , des potentiels transmembranaires des cellules et des mitochondries.**



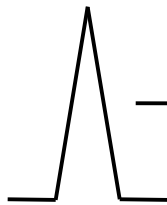
*Mise en évidence de la chute locale du pH intracellulaire photo-induite par l'hypericine.*

**MESURES DES DURÉES DE VIE  
EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE**

## ANALYSE DANS LE DOMAINE TEMPORELLE



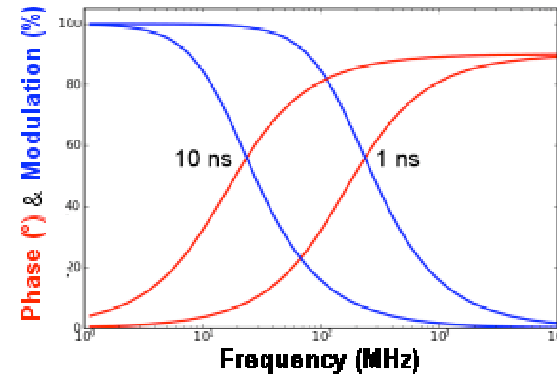
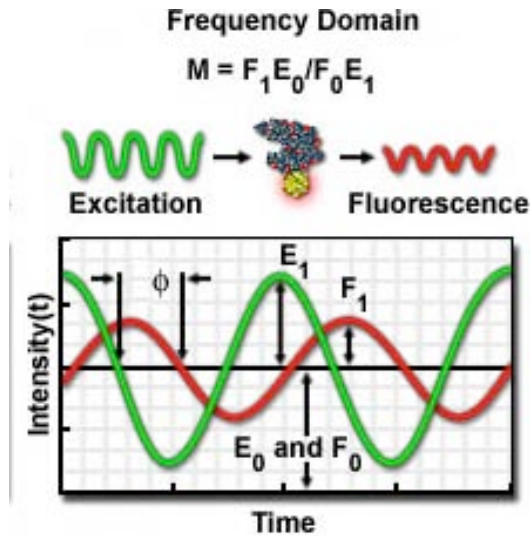
**Fluorescence response to single pulse excitation**



$$R(t) = \sum \alpha_q \cdot \exp(-t/\tau_q)$$

**Mono or multi-exponential decay**

# ANALYSE DANS LE DOMAINE FRÉQUENTIELLE

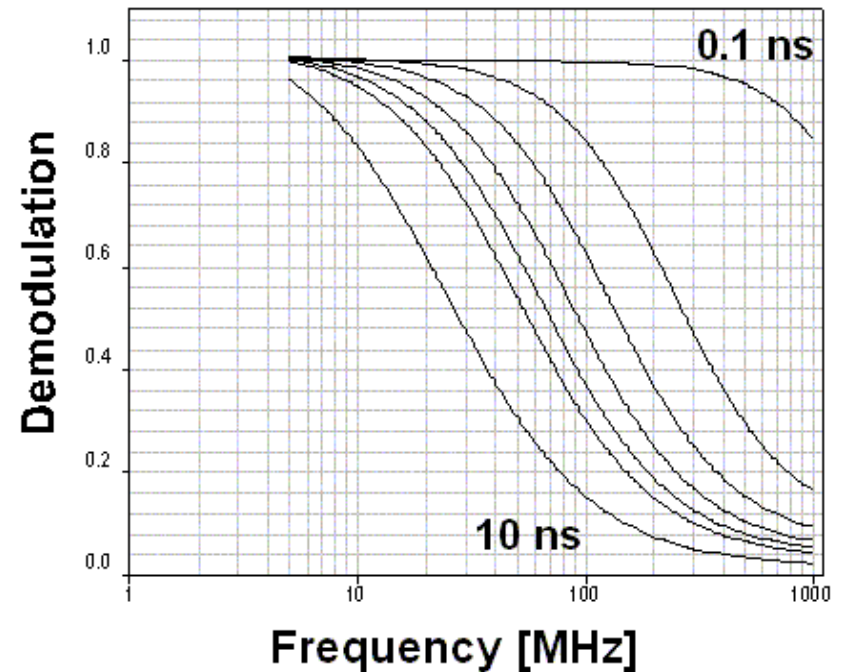
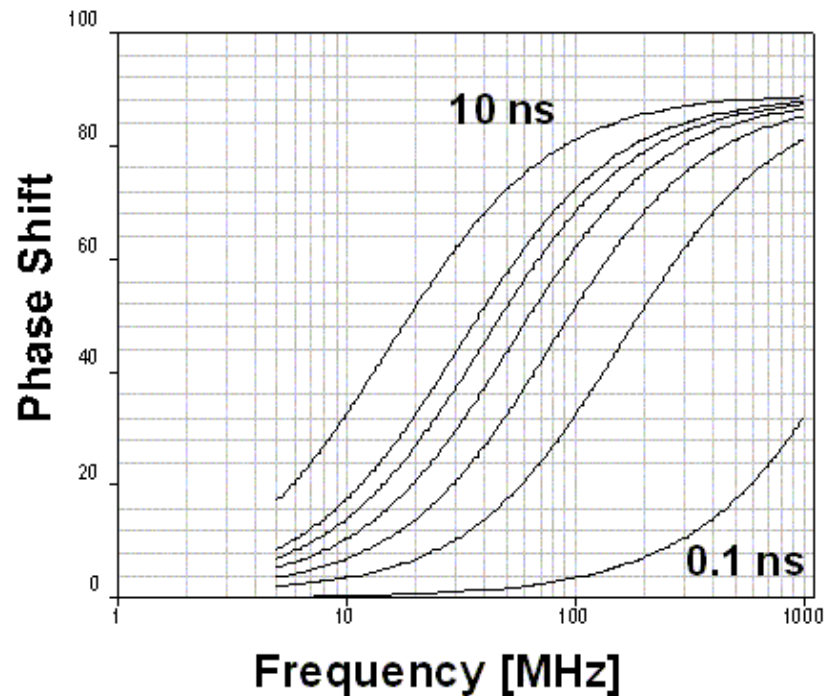


déphase et démodulation de l'émission fluorescente par rapport à l'excitation dans une mesure de la durée de vie de fluorescence dans le domaine fréquentiel

La phase et la modulation en fonction de la fréquence de modulation. La phase croît avec la fréquence pendant que la modulation décroît. Les deux paramètres sont tracés pour une durée de vie de 10ns et 1ns

$$\langle \tau \rangle = (1/2\pi\omega) \cdot \text{Tang} (\Delta\phi)$$

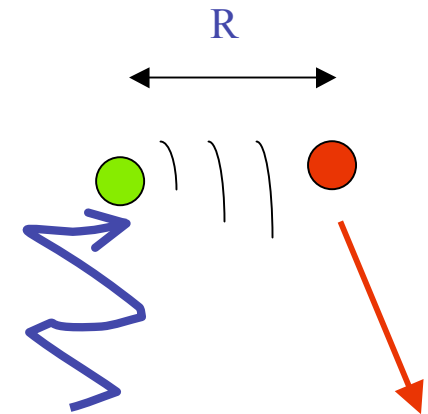
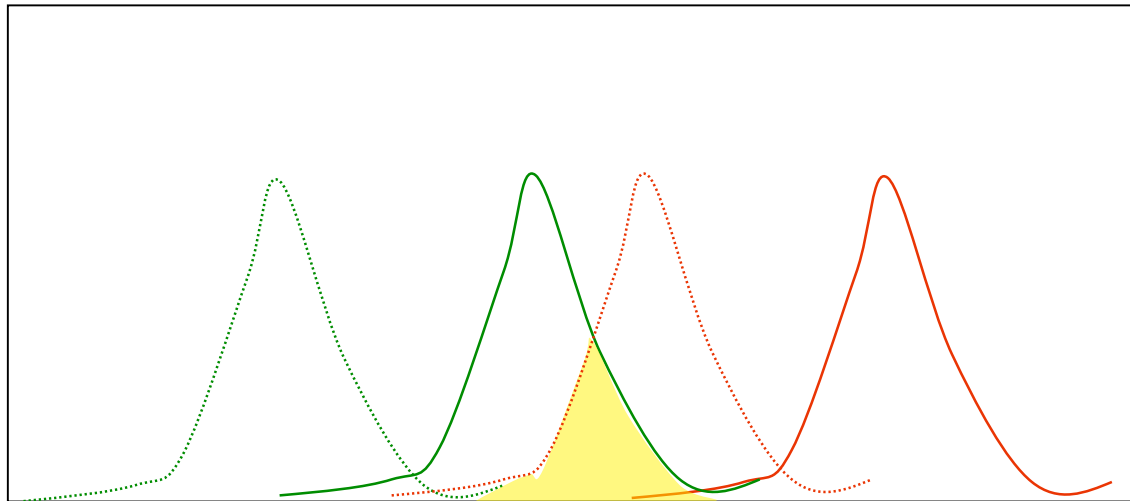
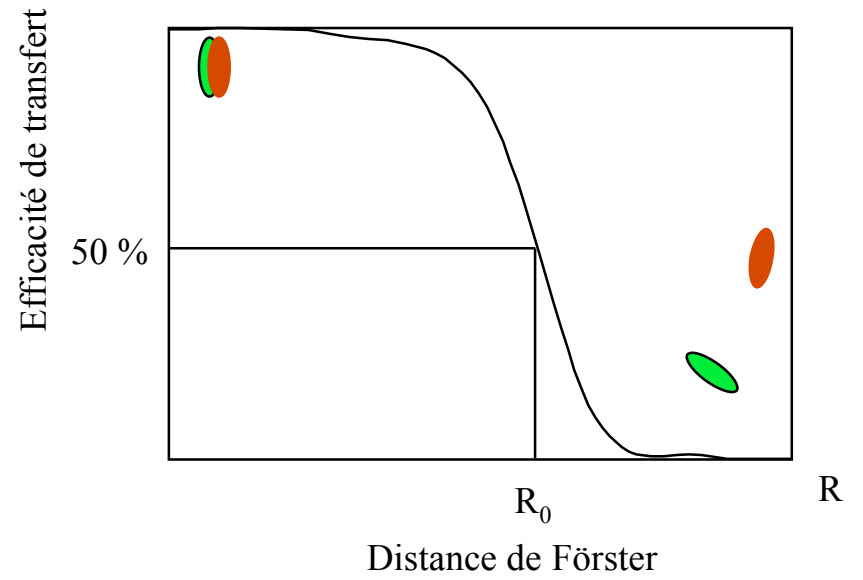
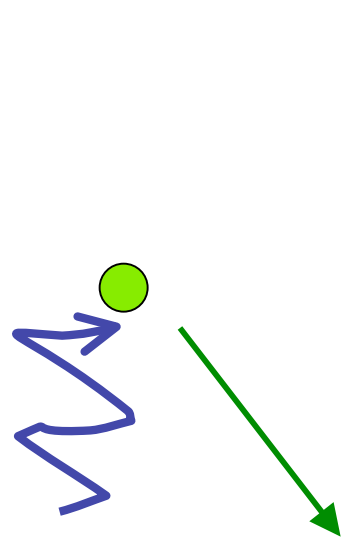
$$\langle \tau \rangle = (1/2\pi\omega) \cdot [(1/m^2) - 1]^{1/2}$$



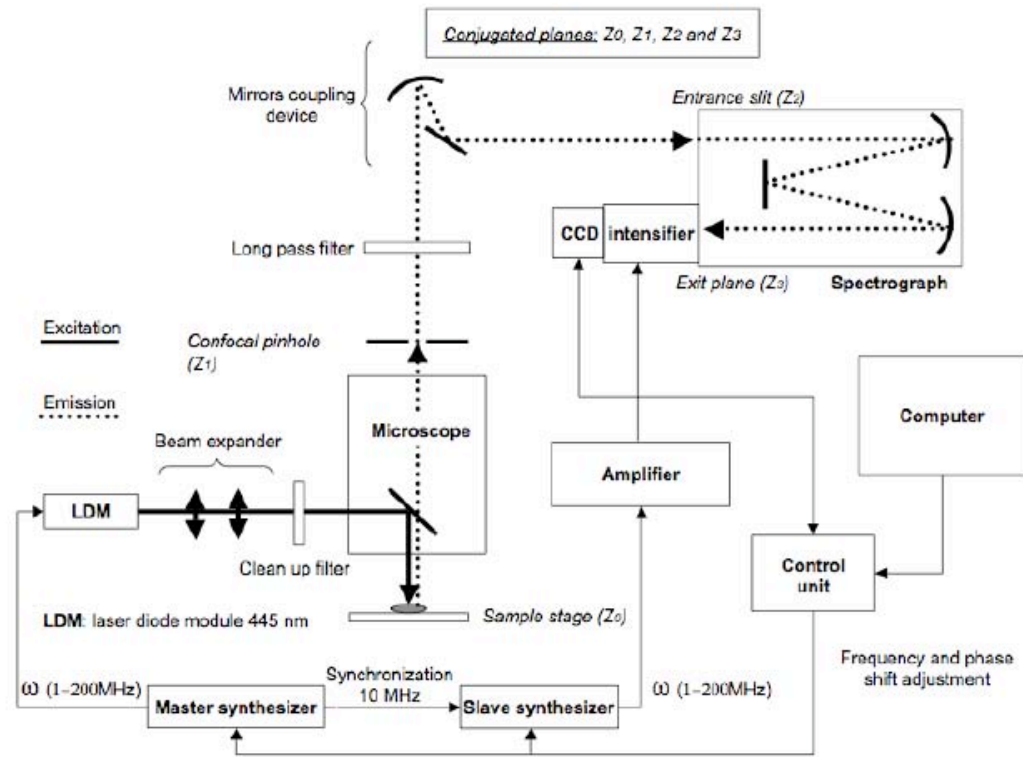
Theoretical dependence of the fluorescence phase shift and the demodulation versus modulation frequency of the excitation in the case of a single-exponential decay. Lifetimes (from down to up in the left graph and from up to down in the right one): 0.1, 1, 2, 3, 4, 5 and 10ns.

# FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER

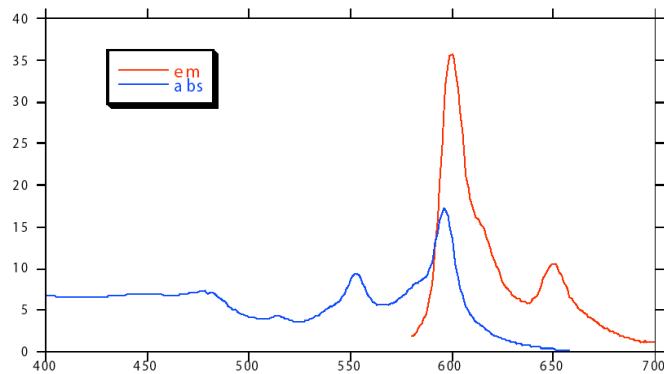
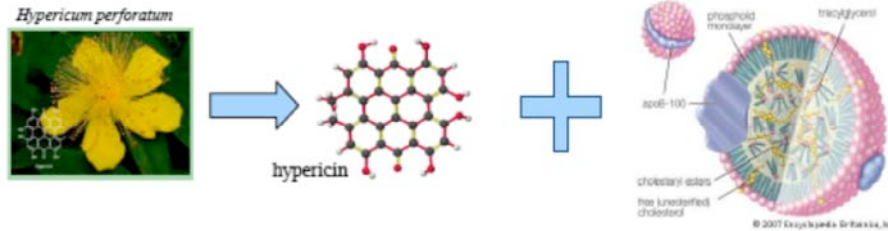
Interaction dipolaire, transfert d'énergie non radiatif



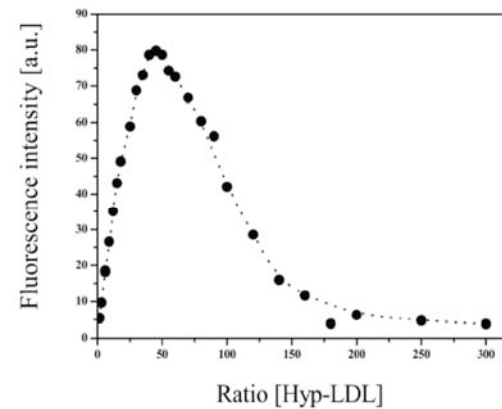
# DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL



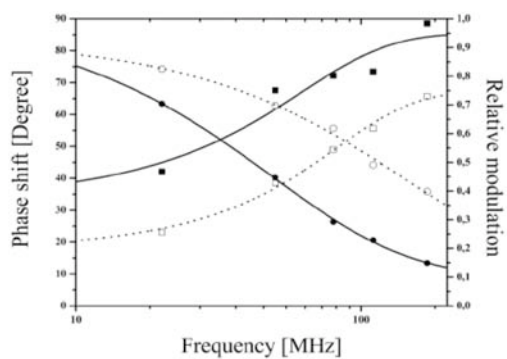
# APPORT DE L'ANALYSE TEMPORELLE



*Spectre d'absorption et de fluorescence de l'Hypéricine en solution dans le DMSO*

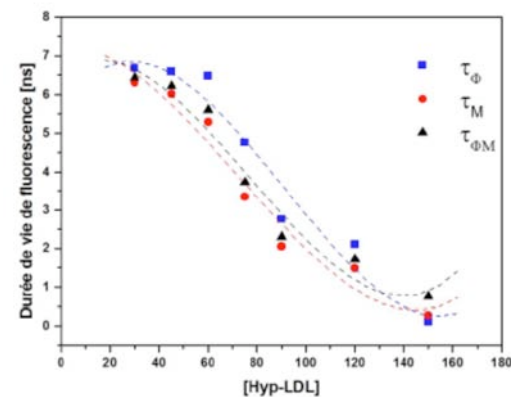


*Évolution de l'intensité de fluorescence de l'Hypéricine en fonction du nombre moyen de molécules solubilisées par LDL*

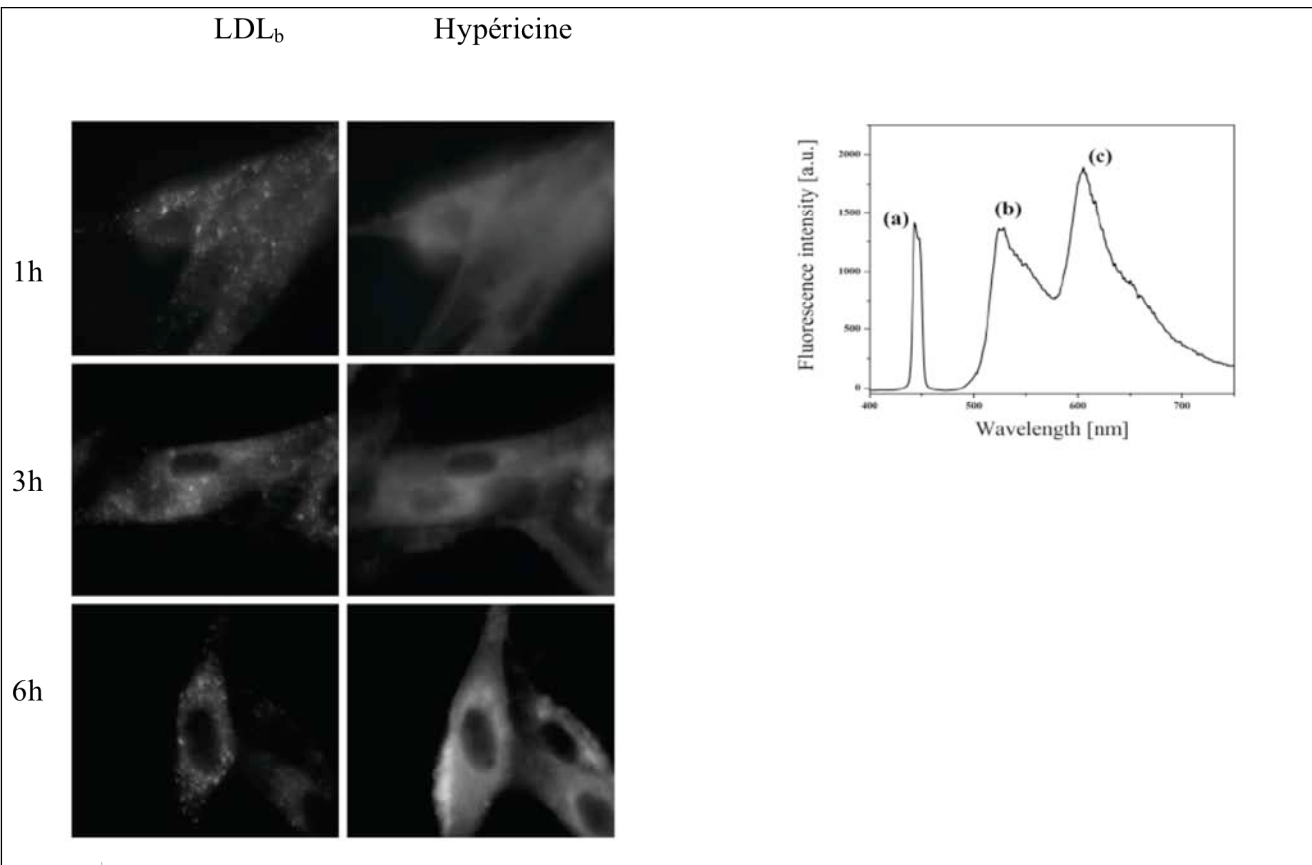


Mesure des durées de vies de l'état excité de l'hypéricine par analyse du déphasage et de la démodulation du signal de fluorescence  
 Induit par une excitation modulée à haute fréquence de 1 à 150 MHz

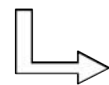
..... Hyp/LDL= 30       $\tau_f = 3 \text{ nsec}$   
 ——— Hyp/LDL= 90       $\tau_f = 7,5 \text{ nsec}$



Évolution de la durée de vie de fluorescence de la forme monomère de l'hypéricine solubilisée par les LDLs en fonction du rapport moléculaire hypericine/LDL



Cellules U87 incubée avec le complexe [LDL<sub>b</sub>-Hyp] 20:1

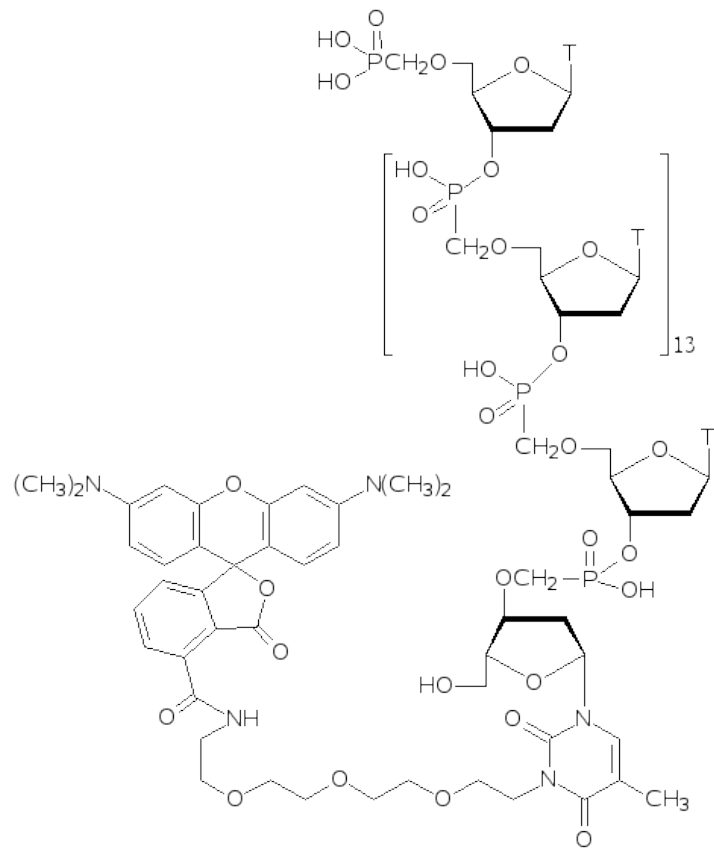


la localisation intracellulaire de s LDLs apparait clairement distincte de celle de l'hypéricine

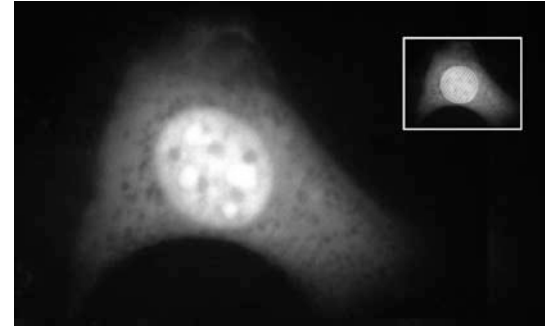
Durée de vies de fluorescence de l'émission des LDL<sub>b</sub>:

Fluorescence lifetime of LDL <sub>b</sub>	in the solution	in the cells
LDL <sub>b</sub> in the absence of Hypericin	2,3 ± 0,1 ns	3,3 ± 0,2 ns
LDL <sub>b</sub> in the presence of Hypericin	1,1 ± 0,1 ns	3,6 ± 0,2 ns

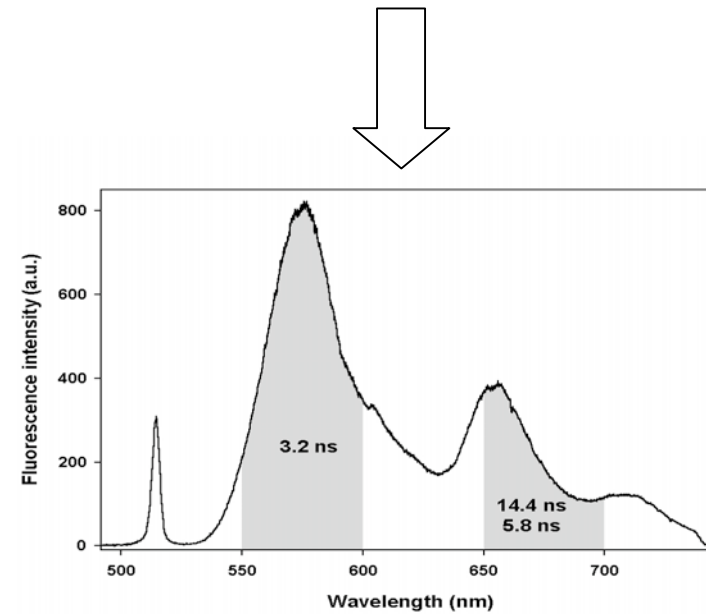
# APPLICATION À L'ÉTUDE DE LA VECTORISATION CELLULAIRE D'UN OLIGONUCLÉTIDE PAR UNE PORPHYRINE CATIONIQUE



ANALOGUE SYNTHÉTIQUE D'UN OLIGONUCLÉTIDE  
MARQUÉ PAR UNE SONDE FLUORESCENTE  
(POLY-DT15-RHODAMINE)

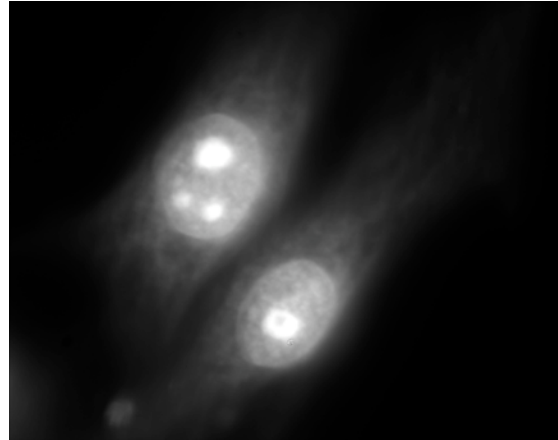


IMAGERIE DE FLUORESCENCE DE CELLULES B16 APRÈS 3 H  
D'INCUBATION AVEC LE COMPLEXE OLIGONUCLÉOTIDE-PORPHYRINE

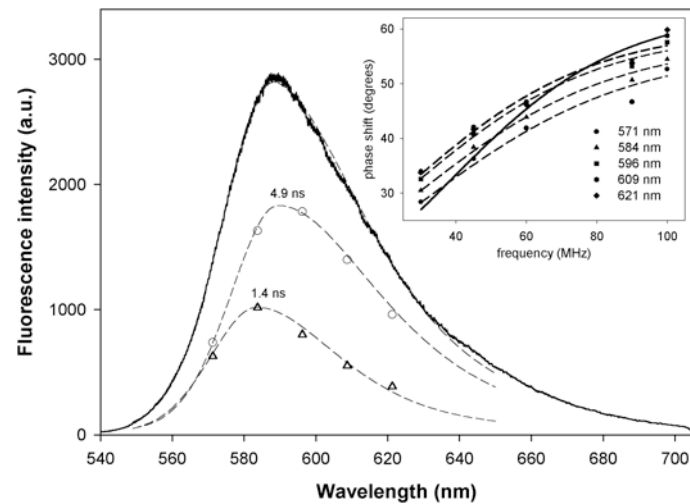
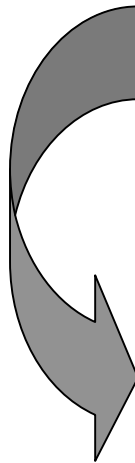


ANALYSE SPECTRALE ET DES DURÉES DE VIES  
DU MÊME ÉCHANTILLON

# CONTRÔLE DE L'INTÉGRITÉ D'UN OLIGONUCLÉOTIDE MODIFIÉ APRÈS INTERNALISATION CELLULAIRE



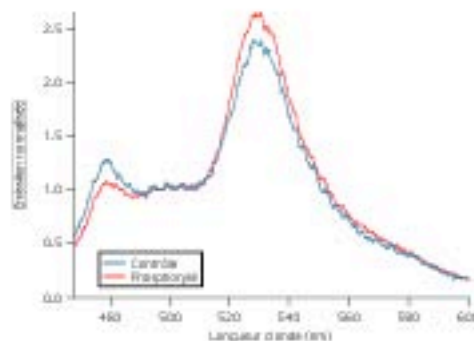
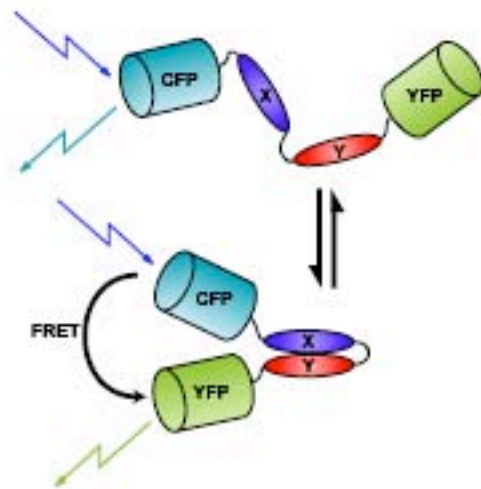
IMAGERIE DE FLUORESCENCE DE CELLULES B16 APRÈS VECTORISATION DE L'OLIGONUCLÉOTIDE MARQUÉ



ANALYSE SPECTRALE ET DES DURÉES DE VIES DU MÊME ÉCHANTILLON

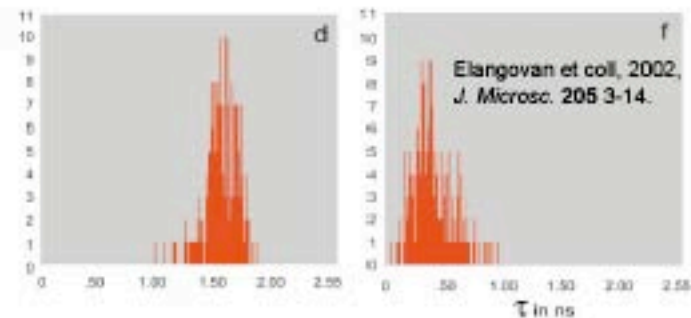
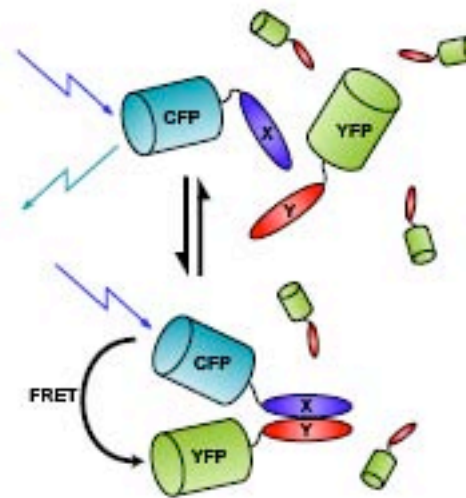
PROTEINS CONFORMATION  
CHANGES  
IN LIVING CELLS

## FRET intramoléculaire



Mesure des variations d'intensité d'émission:  
Imagerie ratiométrique.

## FRET intermoléculaire

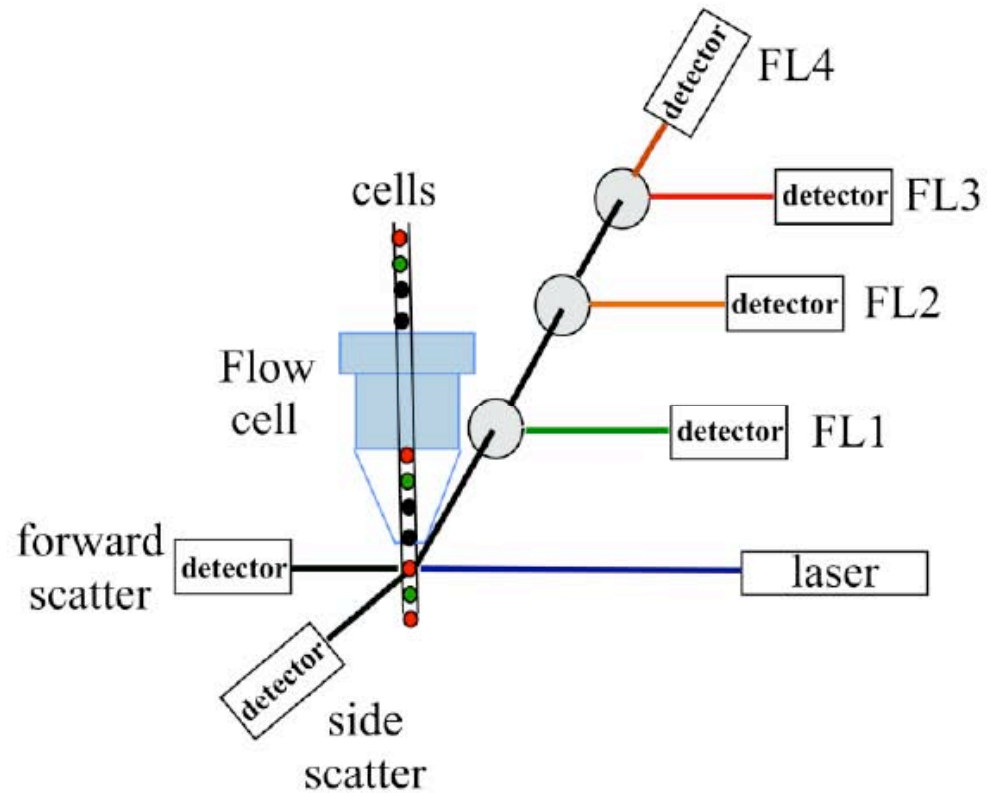


Mesure de durée de vie de fluorescence:  
FLIM.

Figure 1: transfert d'énergie intra ou inter-moléculaire. Une sonde à FRET intramoléculaire (à gauche) est constituée d'une seule protéine chimère comportant les domaines fluorescents CFP et YFP(citrine) séparés par une région dont la conformation change en fonction du signal cellulaire d'intérêt; ce changement de conformation module l'efficacité du FRET entre CFP et YFP(citrine). En bas, le spectre d'émission de la sonde AKAR, une sonde FRET sensible à l'activité Protéine Kinase A. Le spectre, obtenu avec le microspectrofluorimètre du BioMoCeTi, est mesuré sur une cellule unique avant et après activation de la PKA par la forskoline.

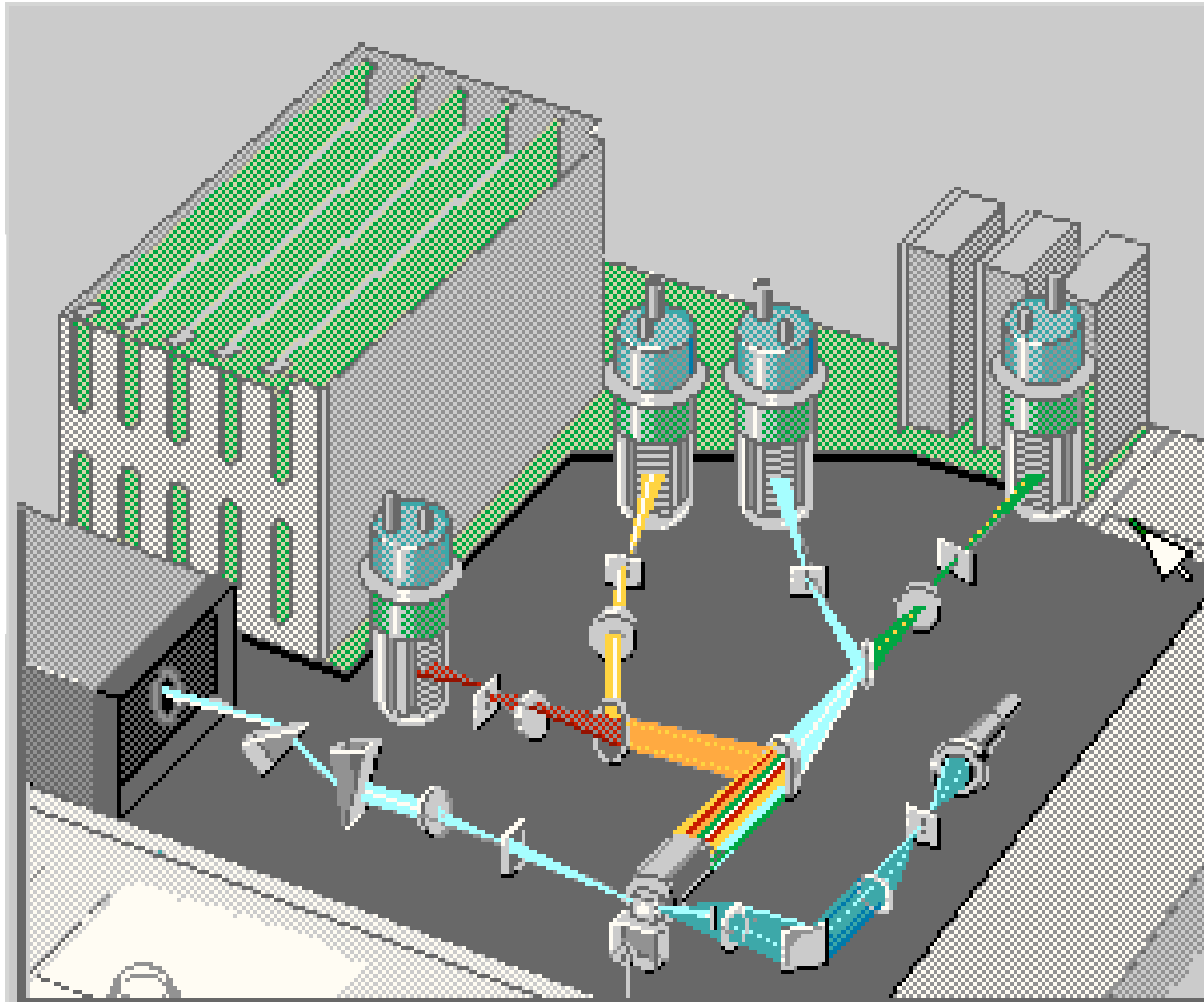
Le FRET inter-moléculaire permet de détecter l'interaction de deux protéines fusionnée chacune à un fluorophore. En bas, histogramme du déclin de fluorescence mesuré lorsque le donneur est exprimé seul (à gauche) ou en présence du partenaire accepteur (à droite).

# CYTOMÉTRIE EN FLUX

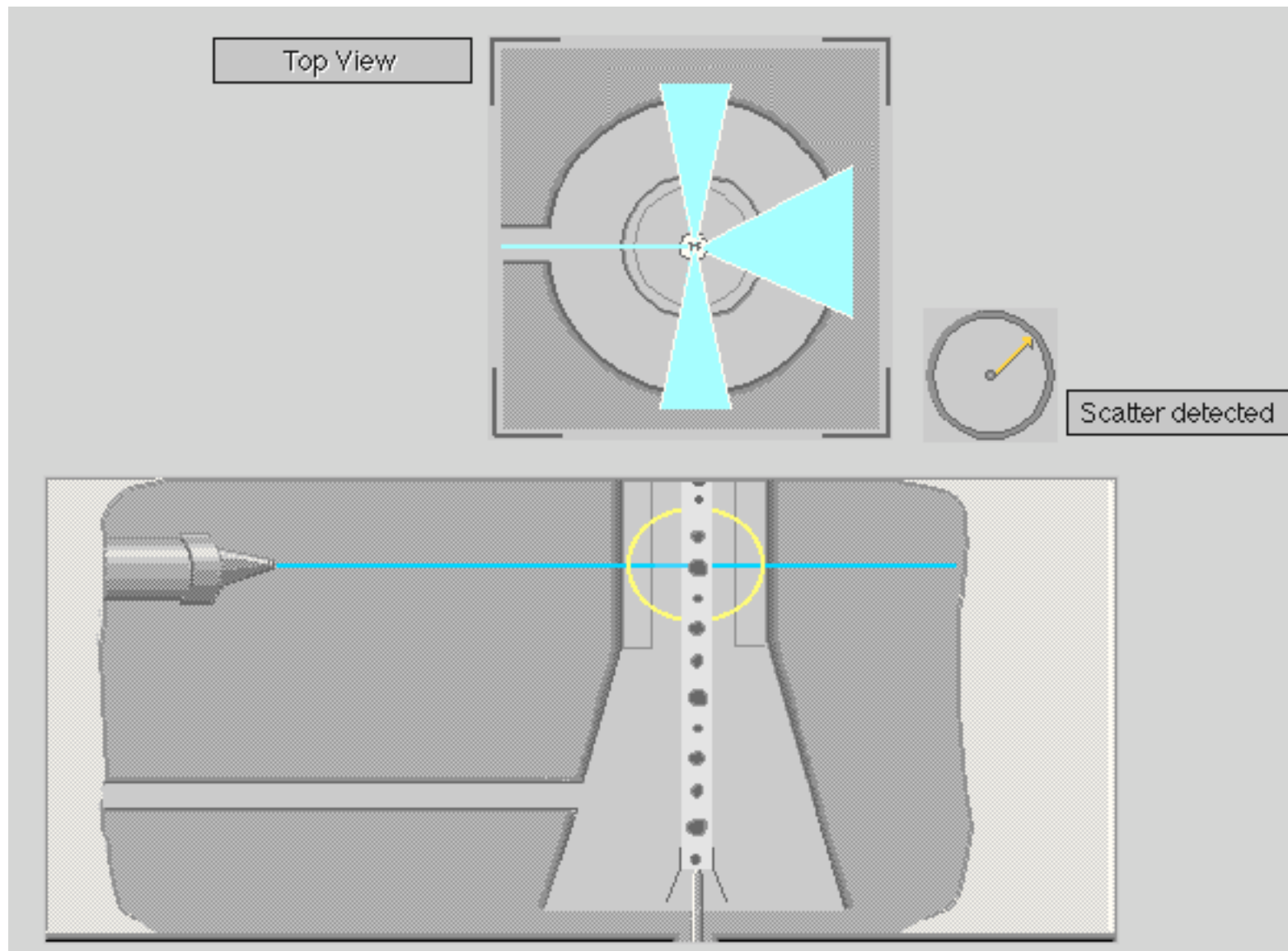


ANALYSE STATISTIQUE  
MULTIPARAMÉTRIQUE  
D'UNE POPULATION  
DE CELLULES

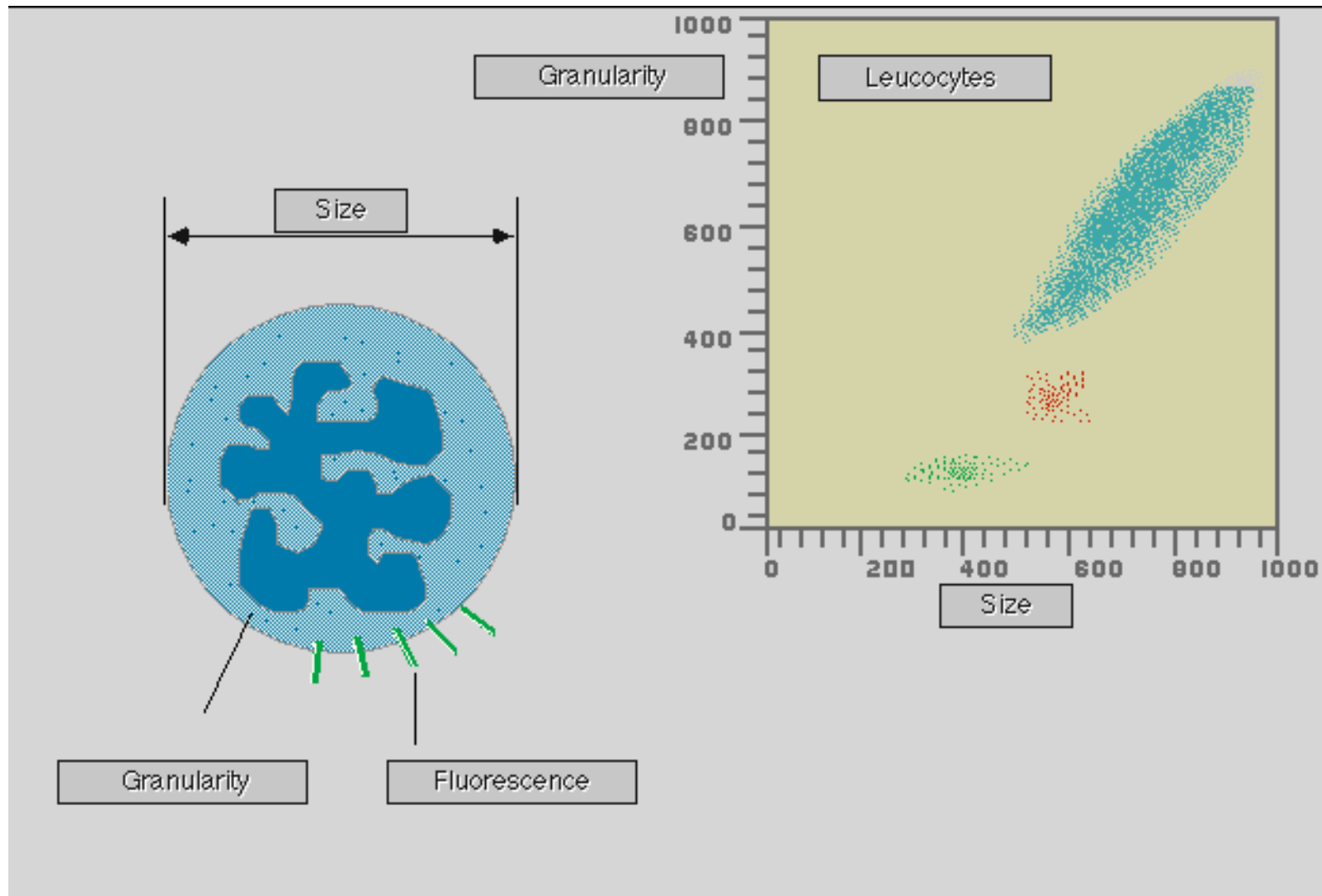
# CYTOMÉTRIE DE FLUX : VOIES DE DÉTECTION



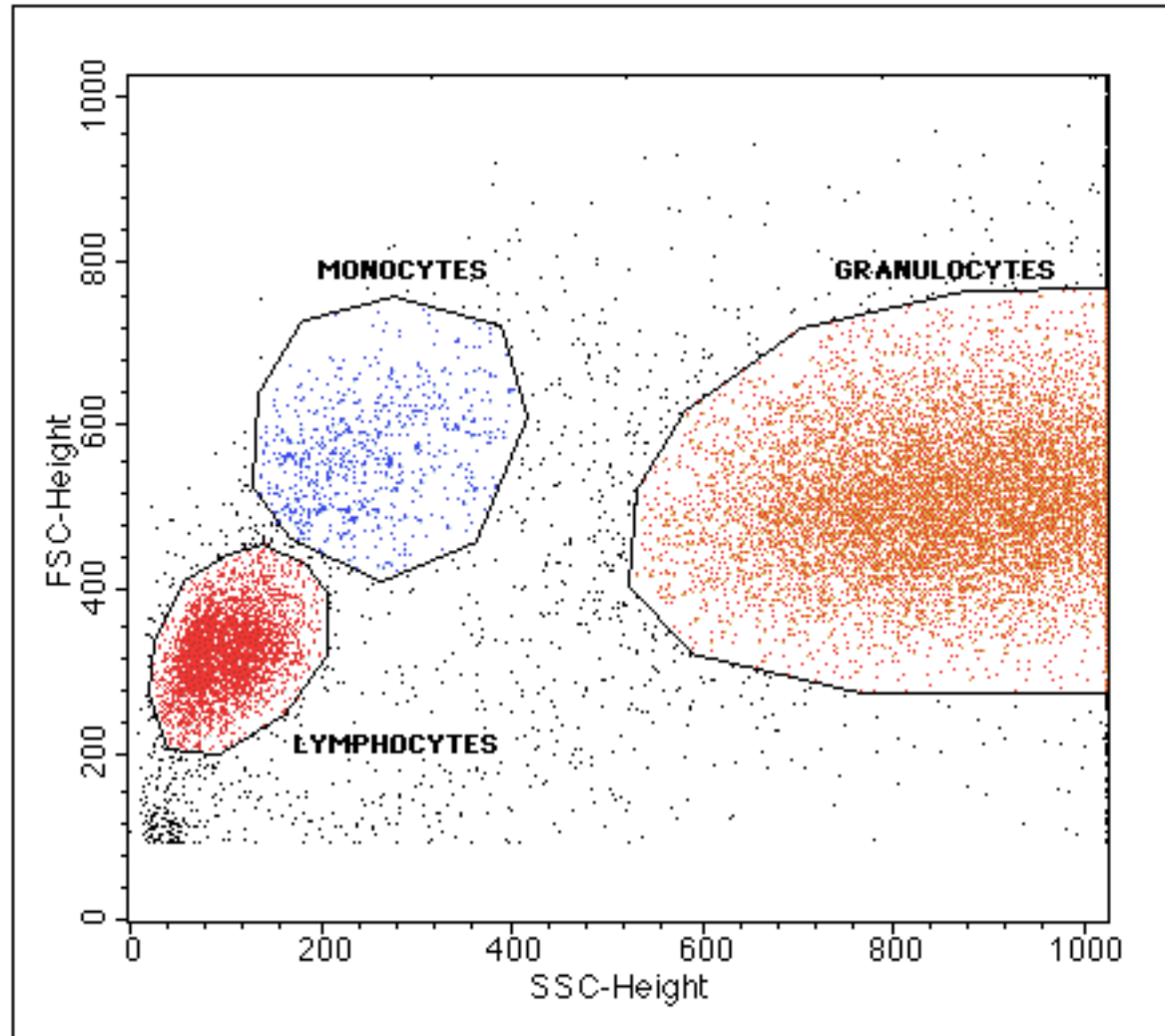
# DIFFUSION DE LA LUMIÈRE



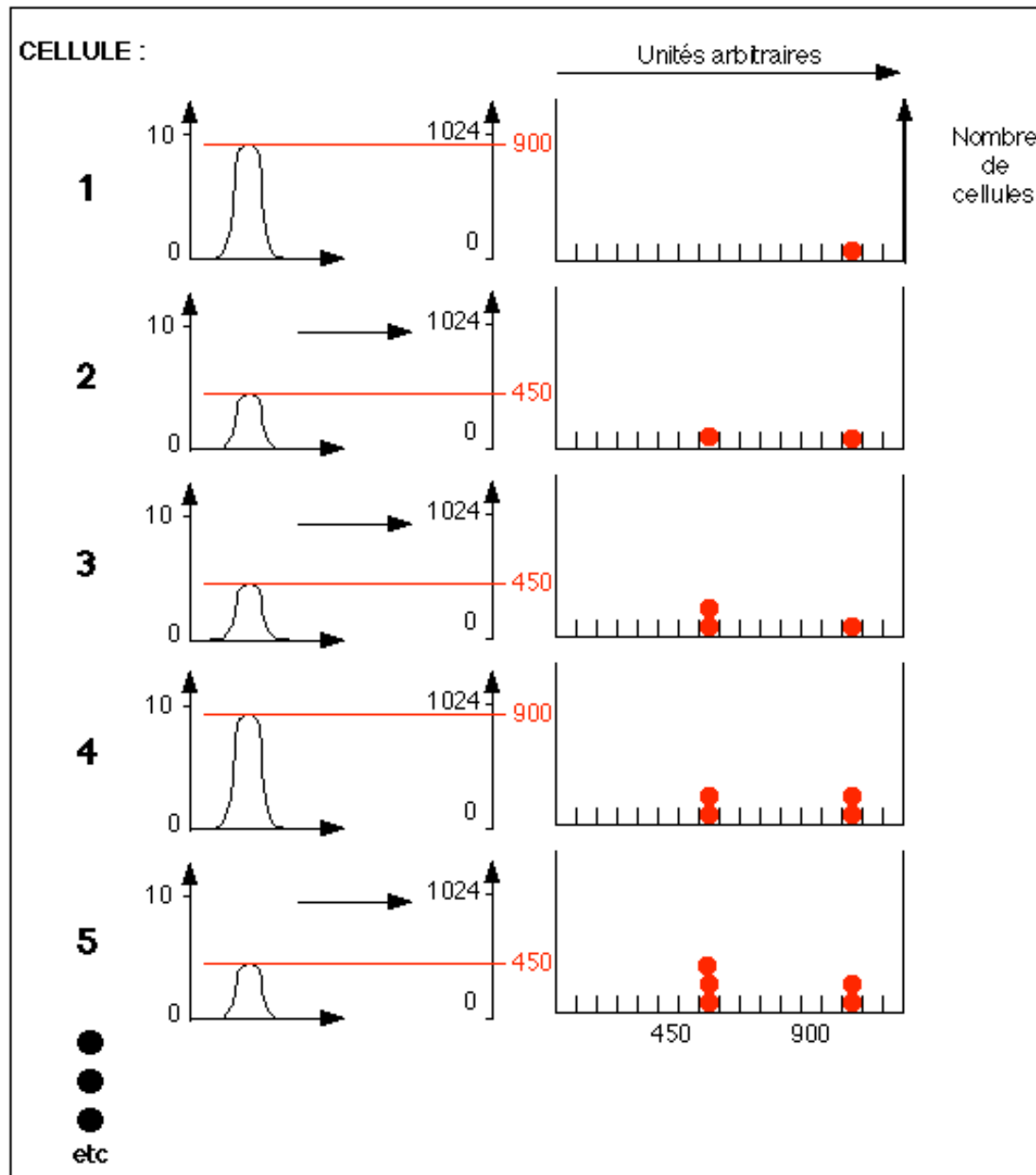
# REPRÉSENTATION DE LA POPULATION DANS UN ESPACE BI-DIMENSIONNEL



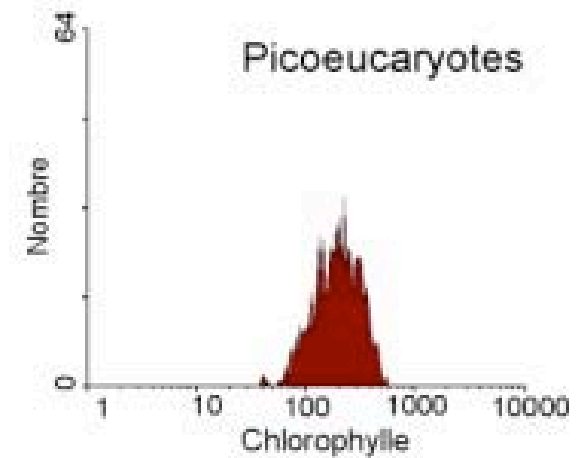
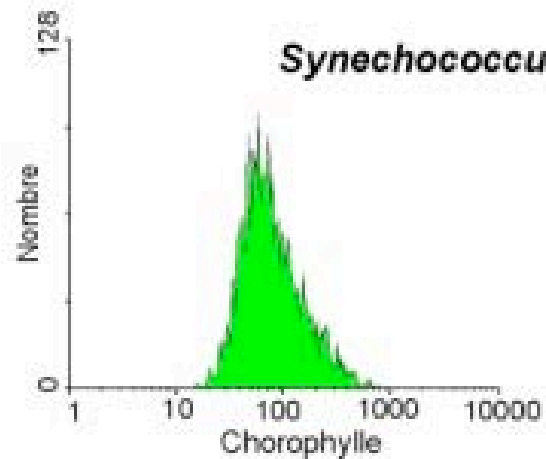
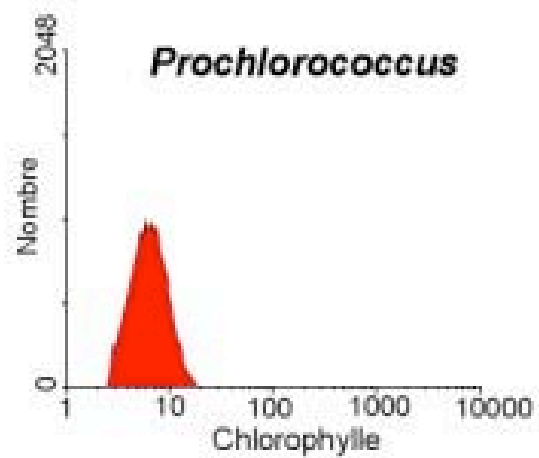
LA REPRÉSENTATION BI-DIMENSIONNELLE DE CES DEUX PARAMÈTRES PERMET PAR EXEMPLE DE DISTINGUER DANS UN SANG PÉRIPHÉRIQUE LES LYMPHOCYTES, LES MONOCYTES ET LES GRANULOCYTES



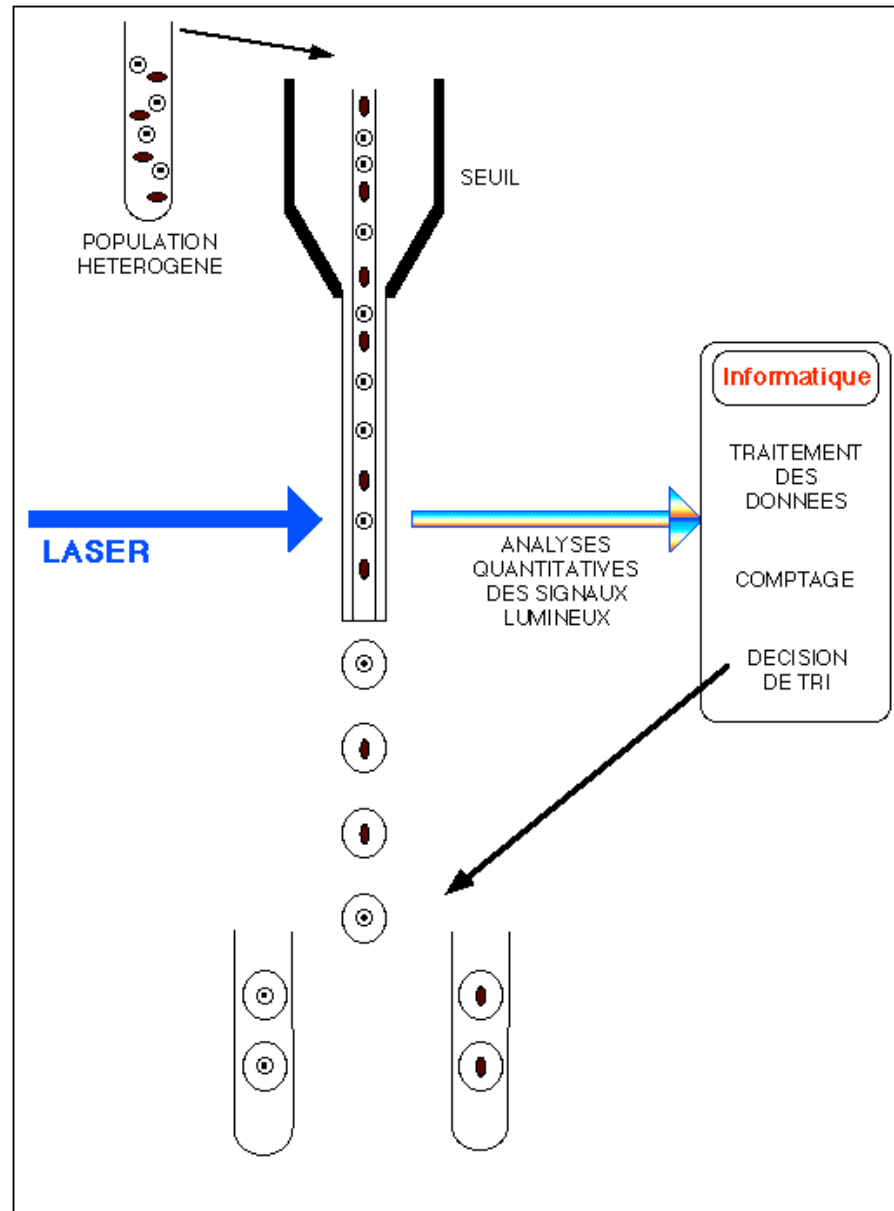
# REPRÉSENTATION EN HISTOGRAMME



## HISTOGRAMMES DES POPULATIONS DE DIFFÉRENTES CELLULES VÉGÉTALES

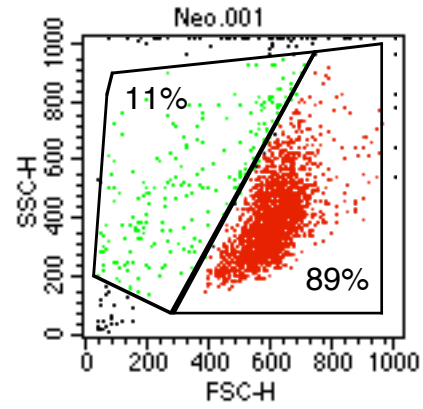


# TRI CELLULAIRE

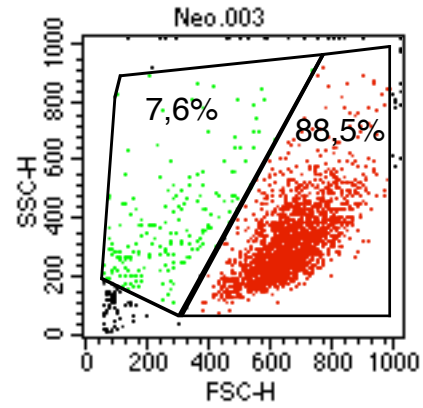
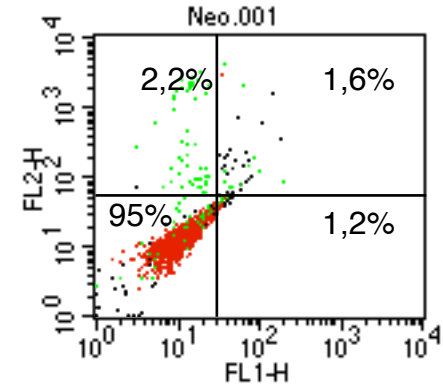


FL1 = Oligreen fluorescence

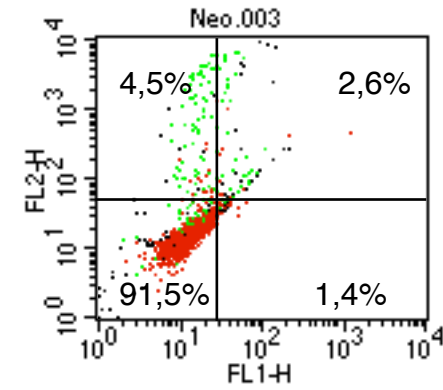
FL2 = Ong 153 fluorescence

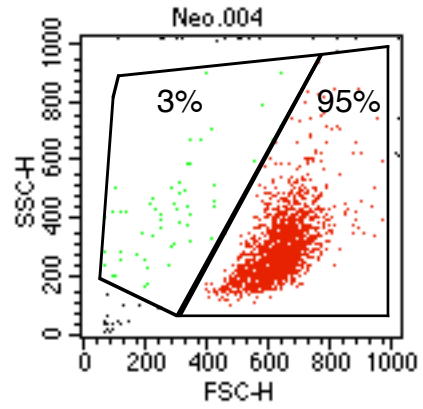


**Témoin**

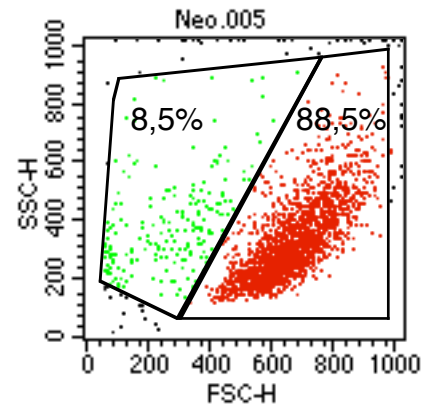
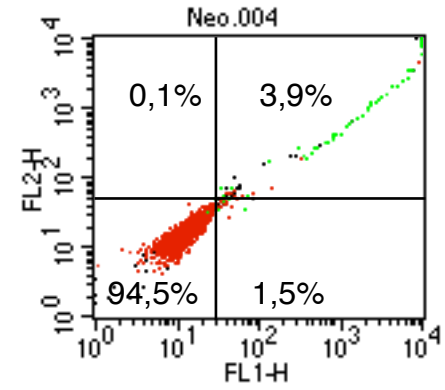


**Témoin E**





**Témoin  
+ Ong153  
+ Oligreen**



**Ong153  
+ E  
+ Oligreen**

