

CYTOMÉTRIE EN FLUX ET MICROSCOPIE CONFOCALE:

2 TECHNIQUES COMPLÉMENTAIRES
POUR L'EXPLORATION DU FONCTIONNEMENT
CELLULAIRE

FORMATION pour le LBFA

3 sessions :

I - Pré requis communs aux 2 techniques

- La fluorescence
- Les sources lumineuses
- Filtres et PMT
- Fluorochromes

II - Cytométrie en flux

- Principe & Applications

III - Microscopie confocale

- Principe & applications

LA FLUORESCENCE

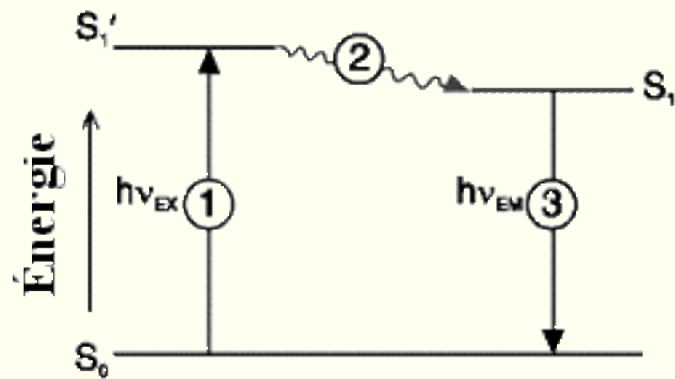
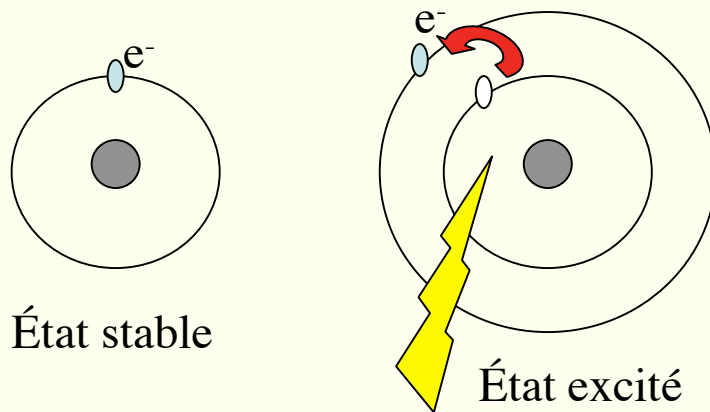


Diagramme de Jablonski

1- émission d'un photon d'énergie $h\nu_{ex}$ fourni par la source d'excitation; absorbé par le fluorochrome : passage à un état excité de doublets électroniques $S'1$ (dure qqes nanosec)

2-changements conformationnels du fluorochrome et interactions avec son environnement;

L'énergie de $S'1$ est partiellement dissipée sous forme de chaleur ou transfert d'énergie;

Le fluorochrome possède une énergie $S1 < S'1$

3- émission d'un photon $h\nu_{em}$ permettant au fluorochrome de retourner à son état énergétique basal;

La différence d'énergie ($h\nu_{ex} - h\nu_{em}$) représente le déplacement de Stokes.

DETECTION DE LA FLUORESCENCE

4 éléments essentiels :

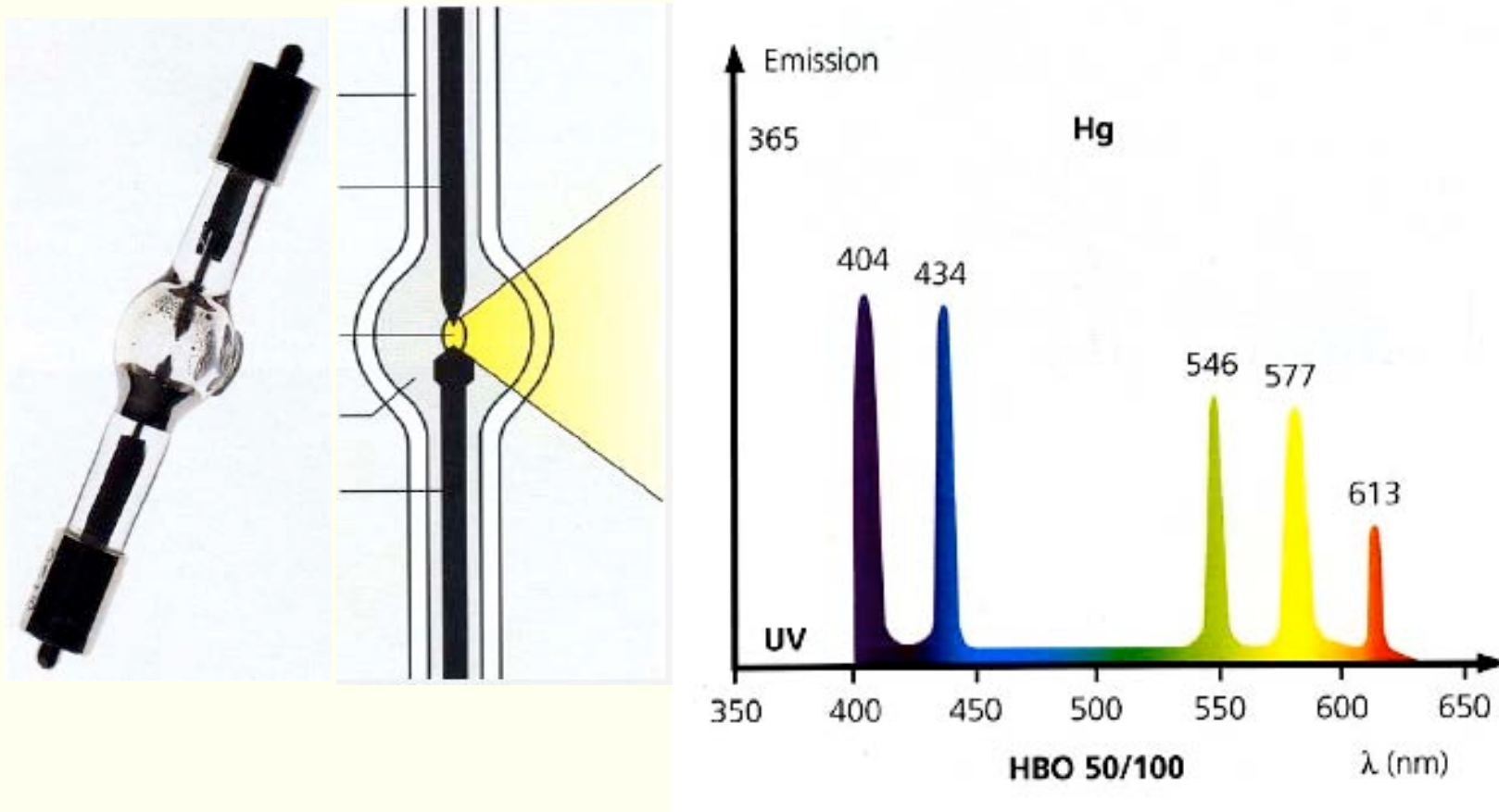
- sources d'excitations
- fluorochromes
- filtres d'excitation et d'émission
- photodétecteurs convertissant les photons en e-

Instruments

- Spectrofluoromètres ou lecteurs de plaques (μ l à ml)
- Systèmes macroscopiques (microarrays, gels électrophorèse...)
- Microscopes à épifluorescence/confocaux
- Cytomètres en flux

LES SOURCES LUMINEUSES

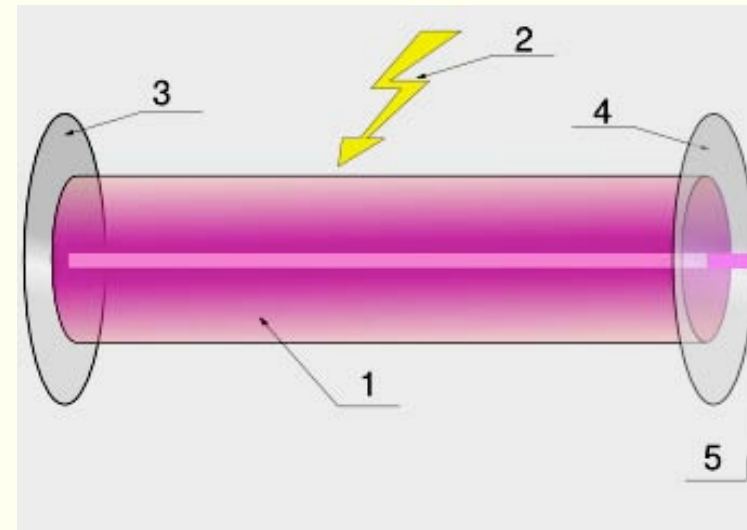
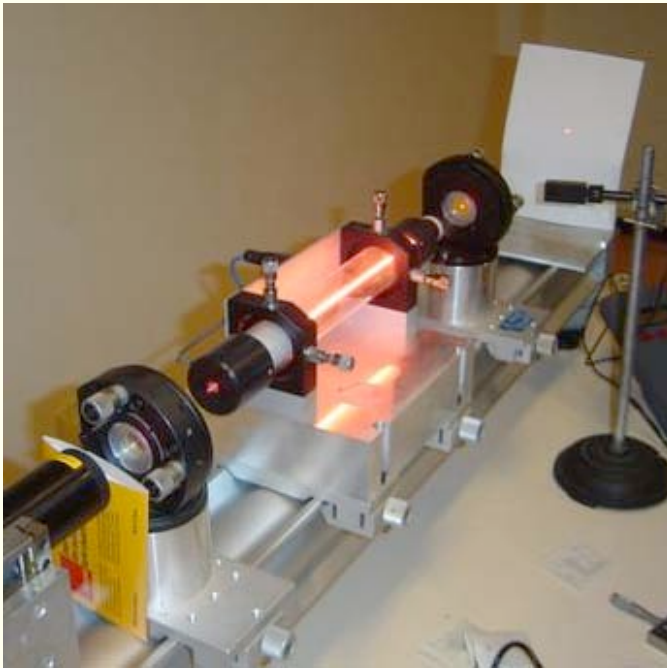
Lampe arc à vapeur de mercure (lampe fluo)



LES SOURCES LUMINEUSES

LASER

Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

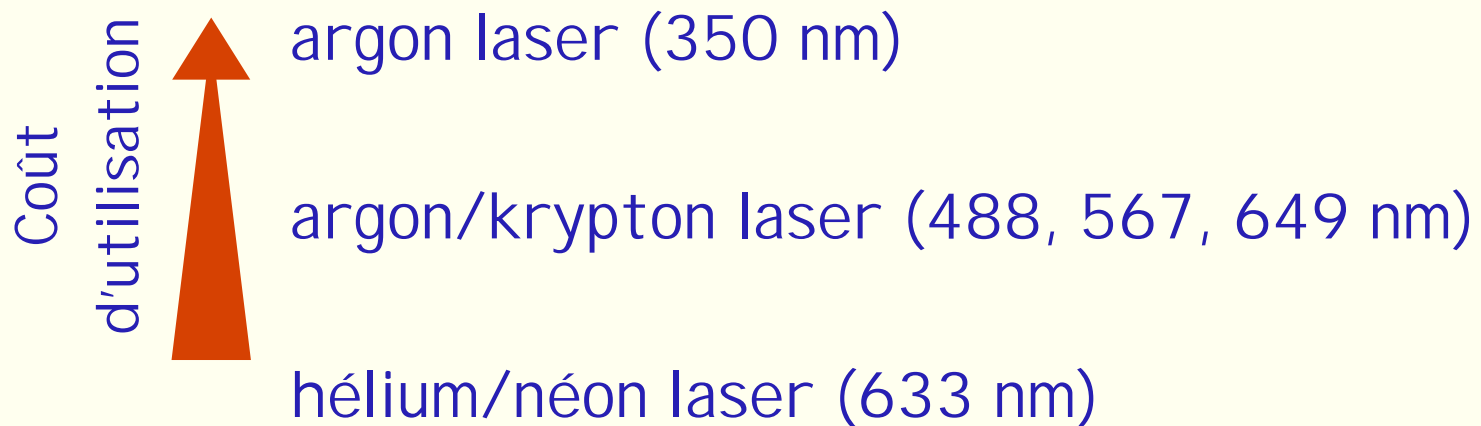


- 1 Milieu excitable (gaz)
- 2 énergie de pompage
- 3 miroir réfléchissant 100%
- 4 miroir semi-réfléchissant
- 5 faisceau laser

CARACTÉRISTIQUES DU LASER

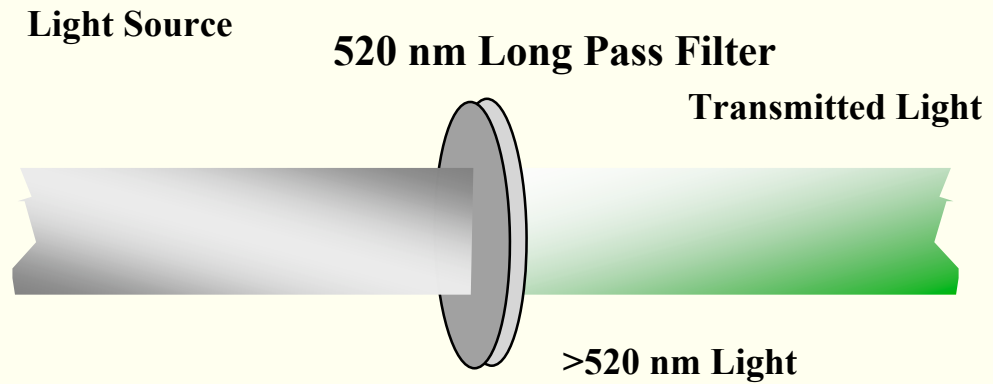
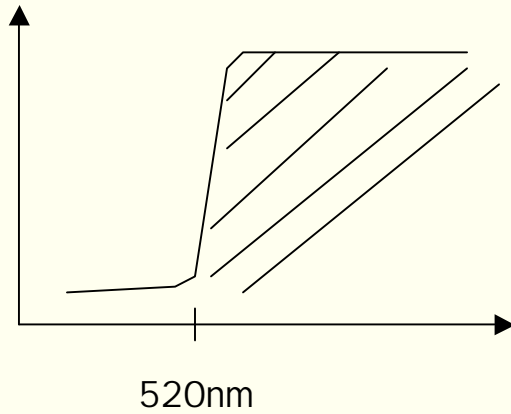
- lumière cohérente, monochromatique
- composition du gaz influence la λ des raies d'émission

Exemples de lasers

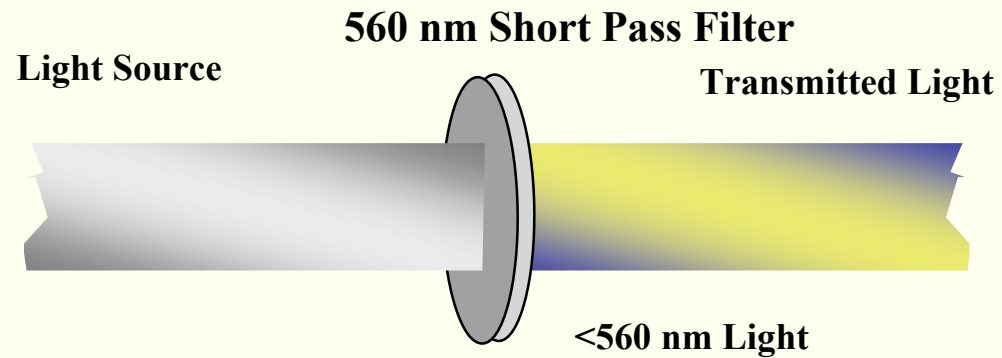
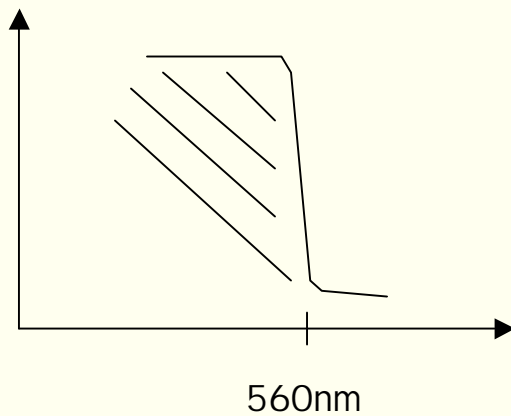


FILTRES

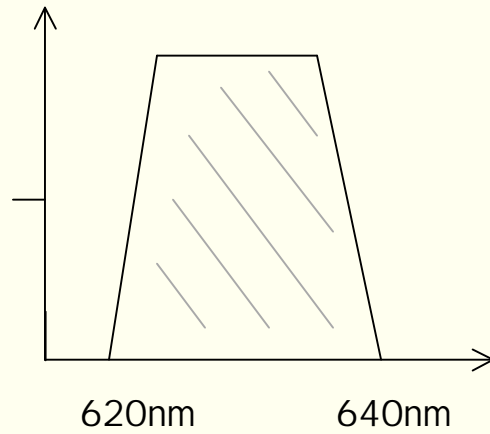
Standard Long Pass Filters



Standard Short Pass Filters



FILTRES



630 nm BandPass Filter

White Light Source



Transmitted Light



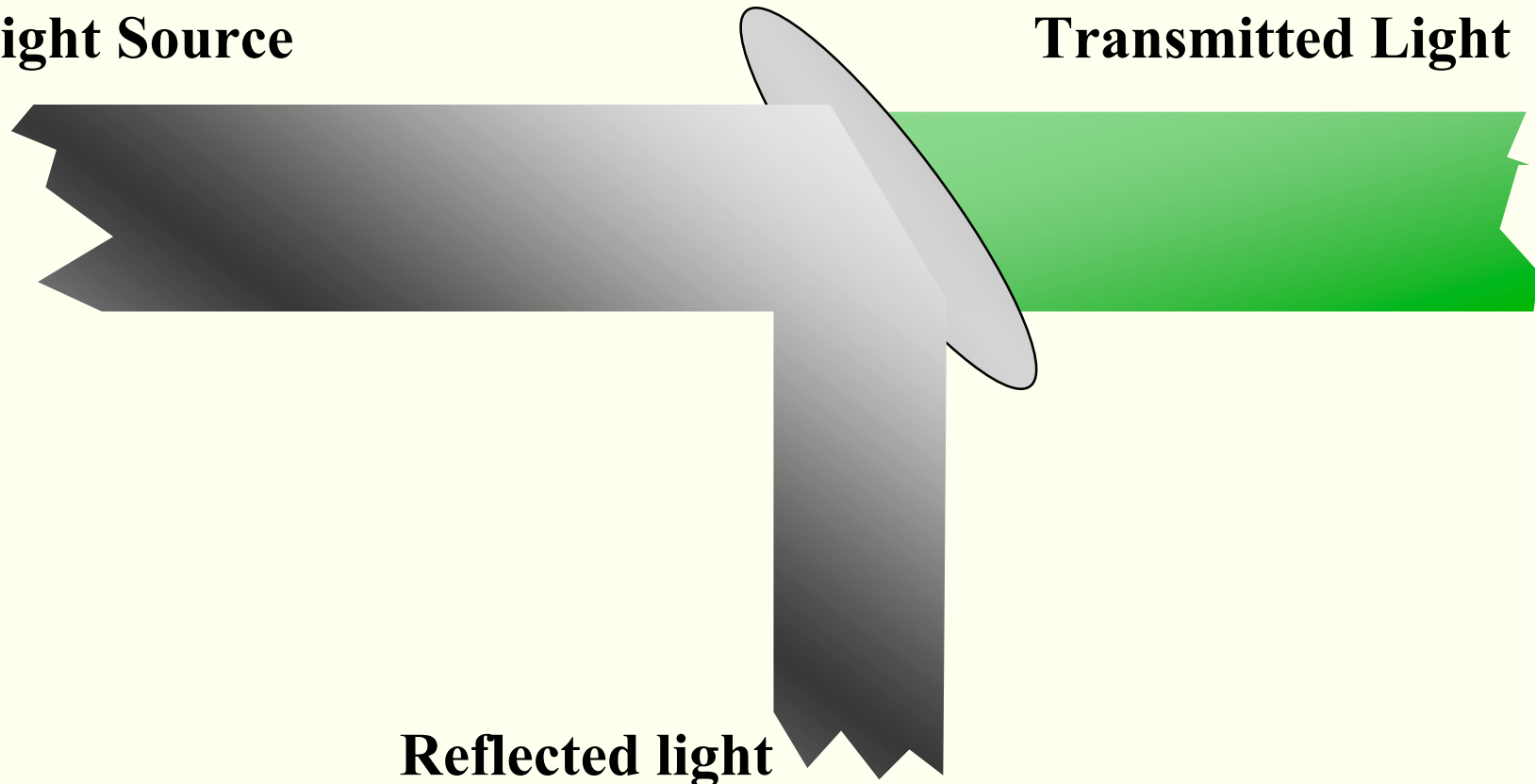
620 -640 nm Light

FILTRES

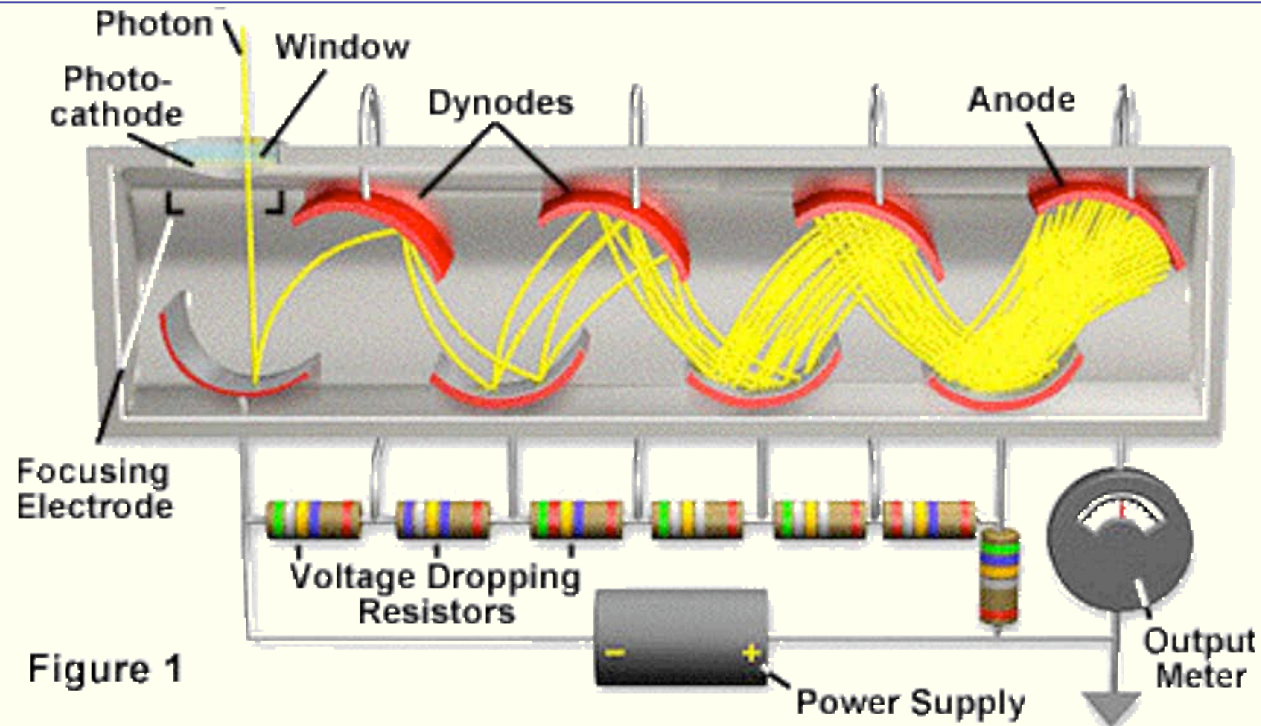
Dichroic Filter/Mirror at 45 deg

Light Source

Transmitted Light



PHOTOMULTIPLI CATEUR OU PMT



Cathode : transformation des photons en électrons

Dynodes : amplification du nombre d'électrons

Voltage ou gain : accélération des électrons

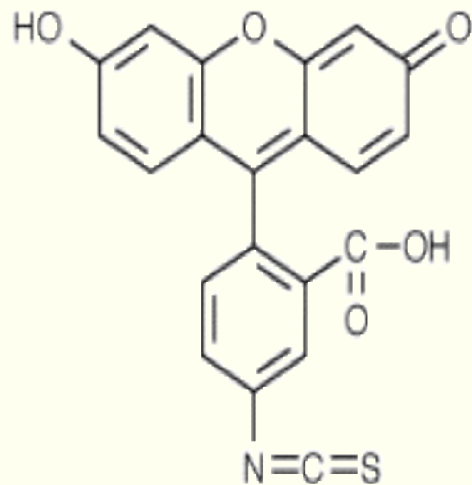
Offset : seuillage pour supprimer le bruit de l'image

Intensité du pixel : proportionnelle au nombre d'électrons produits

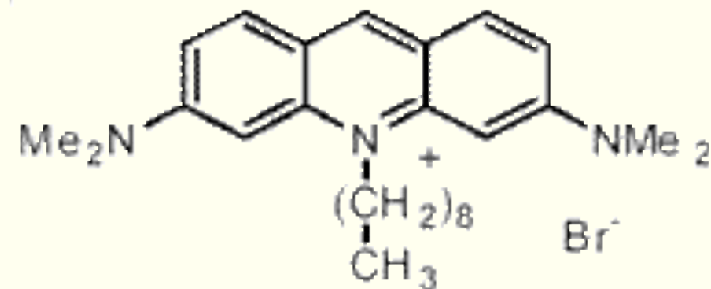
FLUOROCHROMES

Structure chimique

Les molécules fluorescentes incluent dans leur structure des groupements chimiques appelés « chromophore »



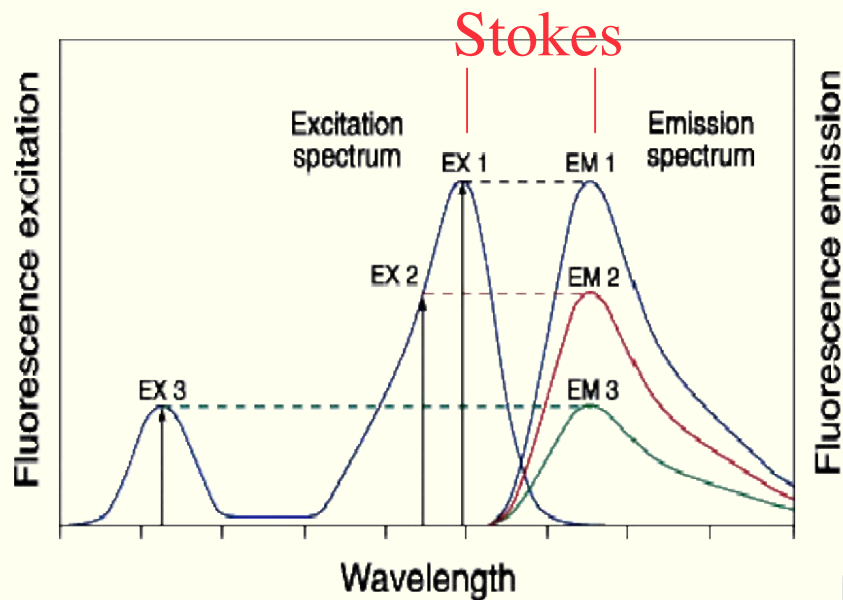
FITC



Acridine orange

FLUOROCHROMES

Substance fluorescente = sonde fluorescente :
Substance chimique définie par différentes propriétés
dont le spectre d'excitation, le spectre d'émission.



λ_{exc} n'affecte pas le spectre
d'émission mais uniquement l'intensité
de l'émission de fluorescence

L'intensité de l'émission correspond à
L'amplitude du spectre d'absorption

SPECTRES ET « DÉPLACEMENT DE STOKES »

Longueur d'onde λ du maximum d'excitation $<$ λ du maximum d'émission

Déplacement de Stokes = la distance entre les maxima d'excitation et d'émission

Exemple: pour la fluorescéine, respectivement 495 nm et 521 nm,
déplacement de Stokes = 26 nm.

PROPRIÉTÉS DU SIGNAL DE FLUORESCENCE

L'intensité de fluorescence est quantitativement dépendante de :

-L'absorbance (loi de Beer Lambert) ou coefficient d'extinction molaire ϵ

-Le rendement quantique ϕ

-Durée de vie du singulet excité le plus bas

COEFFICIENT D'EXTINCTION, ϵ ,

ou absorbance spécifique = absorption molaire

Sa valeur peut constituer un critère pour le choix des colorants ;

plus ϵ est grand,

plus la fluorescence sera élevée à intensité lumineuse incidente égale.

(Pour la fluorescéine à 488 nm, $\epsilon = 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

$$I_f \approx 2,3 \phi_f \cdot I_o \cdot \epsilon \cdot C \cdot l$$

C, concentration du fluorophore

I_f , intensité d'émission

RENDEMENT QUANTIQUÉ Φ_f

= rapport du nombre total de photons émis dans tout le spectre d'émission de fluorescence au nombre de photons reçus et absorbés dans la zone spectrale d'excitation

rendement quantique, $I_f = \Phi_f * I_a$

Soit $\Phi_f = I_f / I_a$

I_f et I_a = nombre de quanta par unité de temps et de surface recevant (a) et émettant (f) la lumière

($\Phi_f \approx 0,85$ pour la fluorescéine)

DURÉE DE VIE

Durée de vie du singulet excité le plus bas

= la constante de temps de déclin de fluorescence, τ_f

$$\tau_f = \phi_f \cdot \tau_N$$

τ_N , constante de temps intrinsèque de l'état excité (en considérant seulement la fluorescence).

($\tau_f \approx 4$ ns pour la fluorescéine dans l'eau)

ϕ_f , rendement quantique

Application : Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM

" BRILLANCE "

La "brillance" est proportionnelle à ϵ et ϕ

	ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	ϕ	« brilliance » (unités arbitraires)
Fluorescéine	80 000	0,9	72 000
Cyanine5	200 000	0,35	70 000
EYFP	84 000	0,61	51 000
B-phycoérythrine	2 410 000	0,98	2 360 000
Tryptophan	6 000	0,1	600
Quantum Dot 605	1 000 000	0,55	550 000
Quantum Dot 655 (à 490 nm)	3 000 000	0,60	1 800 000

CRI TÈRES DE CHOIX D'UN FLUOROCHROME

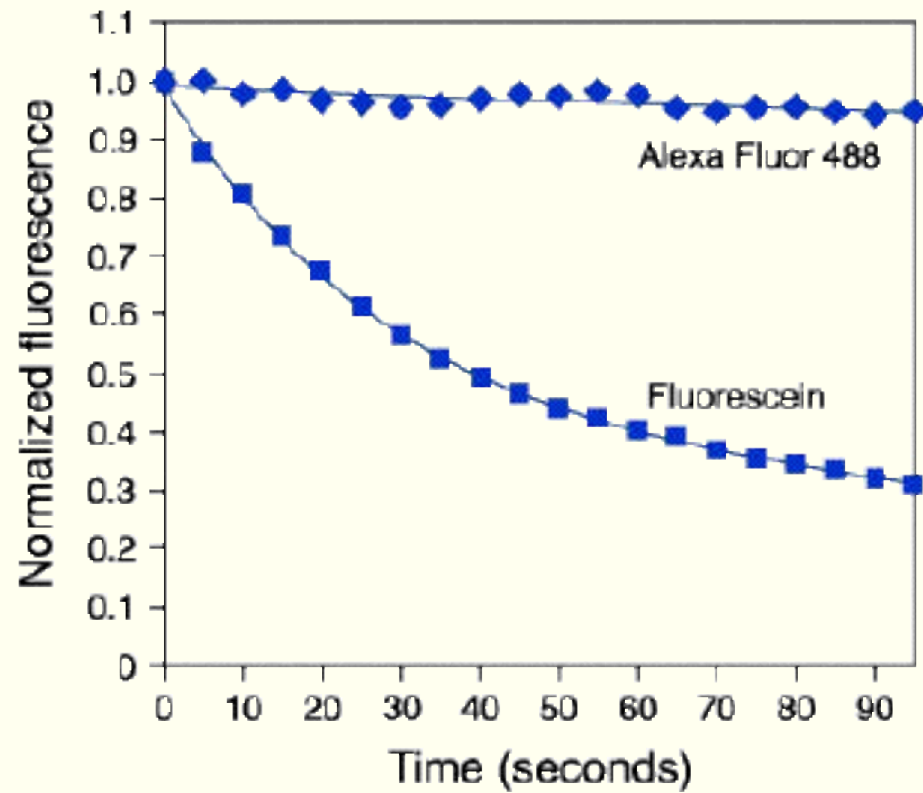
Le marquage des cellules par des fluorochromes permet d'accéder à des informations arbitrairement classées en deux catégories :

- les paramètres fonctionnels
- les paramètres structuraux

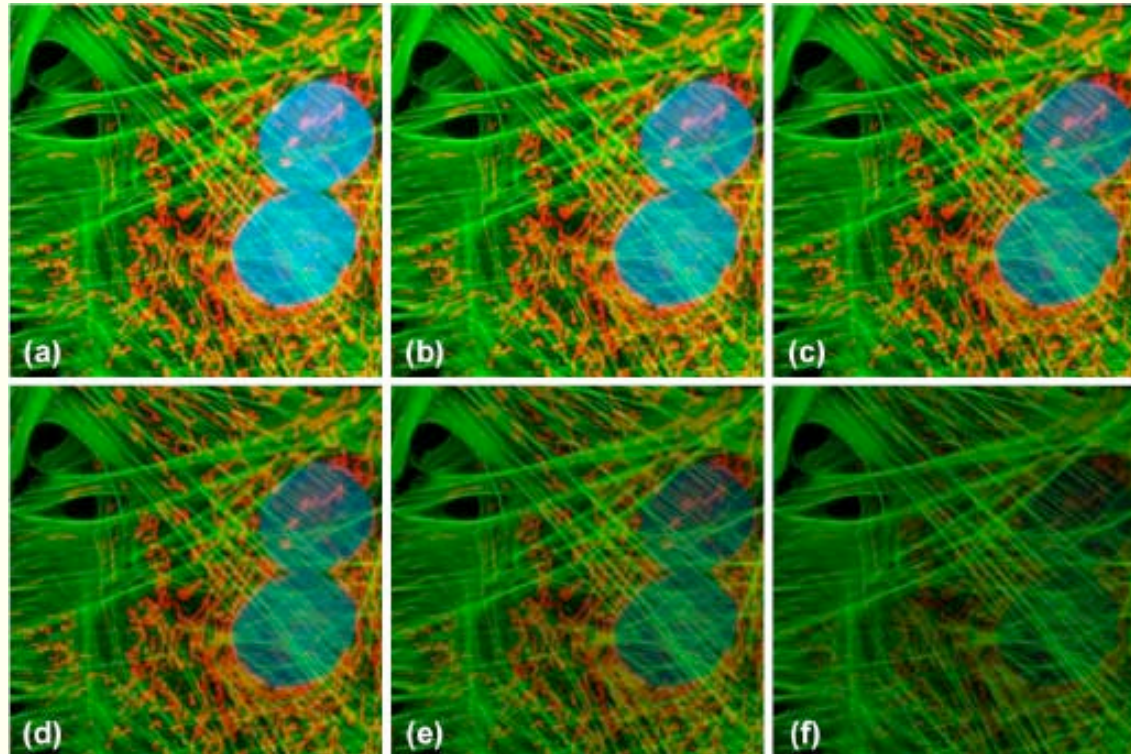
Le choix du (des) fluorochrome(s) sera fonction de :

- sa spécificité (ADN, protéines, organites...)
- son accessibilité (échantillons vivants ou non, perméabilisation...)
- sa toxicité (ou non)
- sa stabilité
- sa stoechiométrie
- des lasers et filtres dont on dispose
- éventuel multi-marquage : attention chevauchement des spectres

STABILITÉ D'UN FLUOROCHROME



PHOTOBLANCHIMENT = PHOTOBLEACHING



Quand on excite une solution de molécules fluorescentes, une partie d'entre elles est détruite à chaque instant : l'intensité de fluorescence décroît au cours du temps.

Application : FRAP

MARQUAGE DE CELLULES FIXÉES

Fixation :

assure une immobilisation des constituants cellulaires dans un état aussi proche possible de l'état vivant.

But :

préserver l'état structural des organites, leur distribution intracellulaire
Les interactions moléculaires.

Pas de fixateur universel

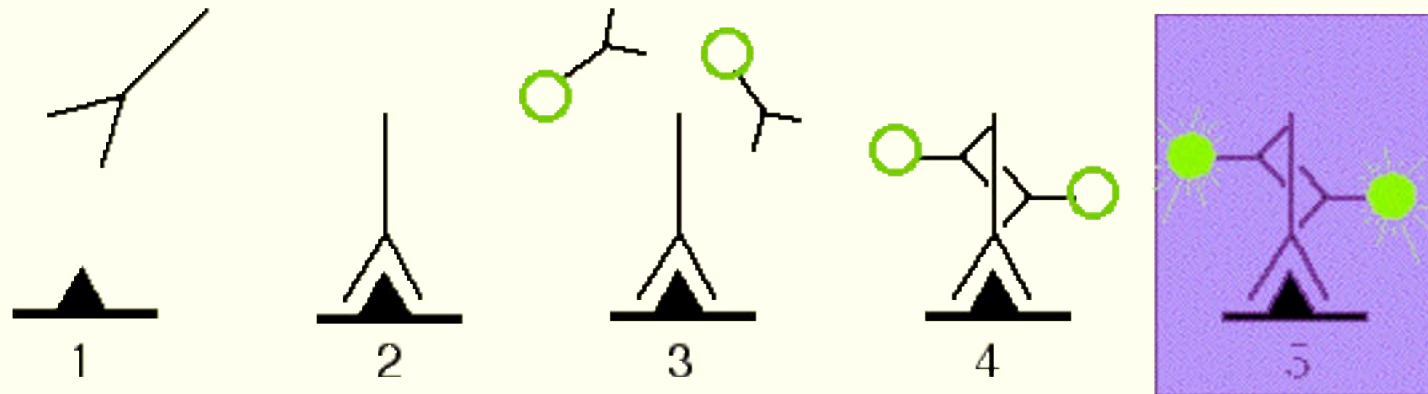
Principaux fixateurs :

alcools (éthanol, méthanol)

aldéhydes (formaldéhyde, paraformaldéhyde, glutaraldéhyde)

NB : attention autofluorescence du Pfa

P R I N C I P E D' I M M U N O F L U O R E S C E N C E



1- Pour détecter une substance X non soluble dans la cellule, on l'utilise comme antigène en l'injectant à un lapin. Celui-ci réagit en fabricant des anticorps (I G G) anti-X.

2- Sur la préparation cellulaire, les anticorps anti-X se fixent spécifiquement sur X.

3- On utilise des anticorps anti-lapin couplés à un fluorochrome;

4- Sur la préparation cellulaire, les anticorps anti-lapins se fixent spécifiquement sur les anticorps anti-X.

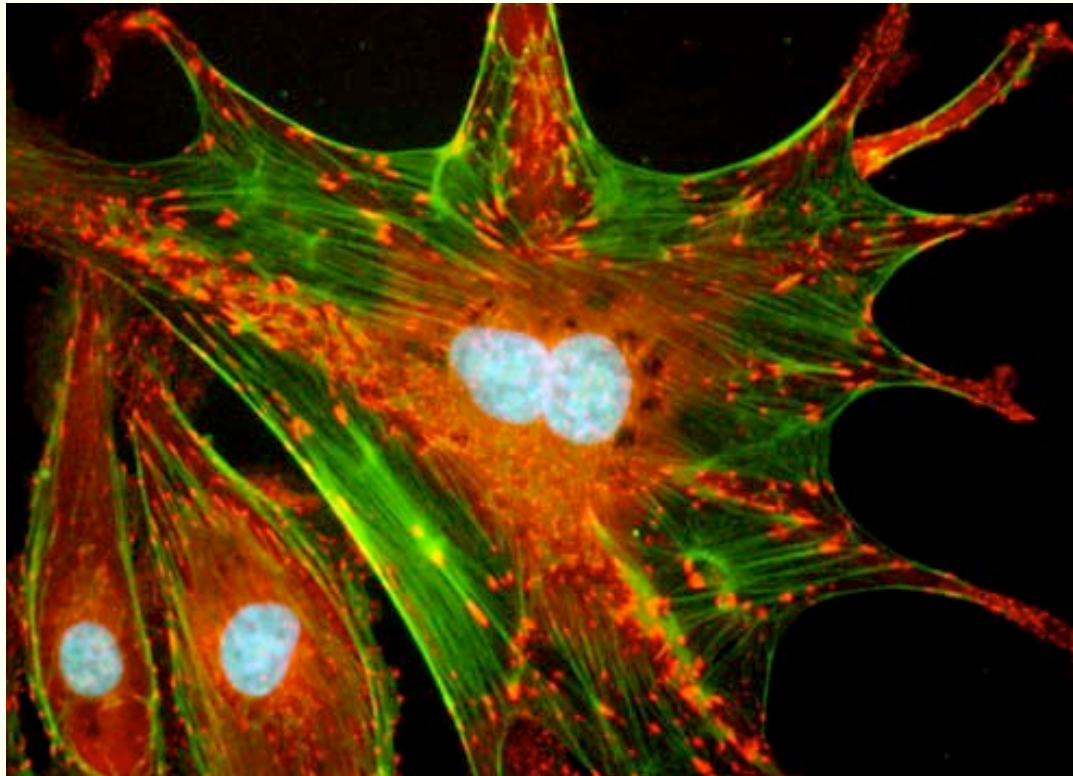
5- excités par une source lumineuse, le fluorochrome émet de la fluorescence et permet de localiser la substance X.

Une famille d'excellents fluorophores pour protéines, anticorps IIaires

Fluorophore	Absorption* (nm)	Emission* (nm)	Couleur
Alexa Fluor 350	346	442	Bleu
Alexa Fluor 430	434	541	Jaune-Vert
Alexa Fluor 488	495	519	Vert
Alexa Fluor 532	531	554	Jaune
Alexa Fluor 546	556	575	Orange
Alexa Fluor 568	578	603	Orange-Rouge
Alexa Fluor 594	590	617	Rouge
Alexa Fluor 633	632	647	Rouge lointain
Alexa Fluor 647	650	668	Rouge lointain
Alexa Fluor 660	663	690	Rouge lointain
Alexa Fluor 680	679	702	Rouge lointain

*maximum approximatif d'absorption et d'émission

Bovin Pulmonary Artery Endothelial cells



- En Rouge : Ac I aire souris anti-vinculin
Ac I I aire : fragment Fab chèvre anti-souris couplé Cyanine 3
- Bleu DAPI : noyaux
- Vert : Actine : Alexa Fluor 488 conjugué phalloïdine

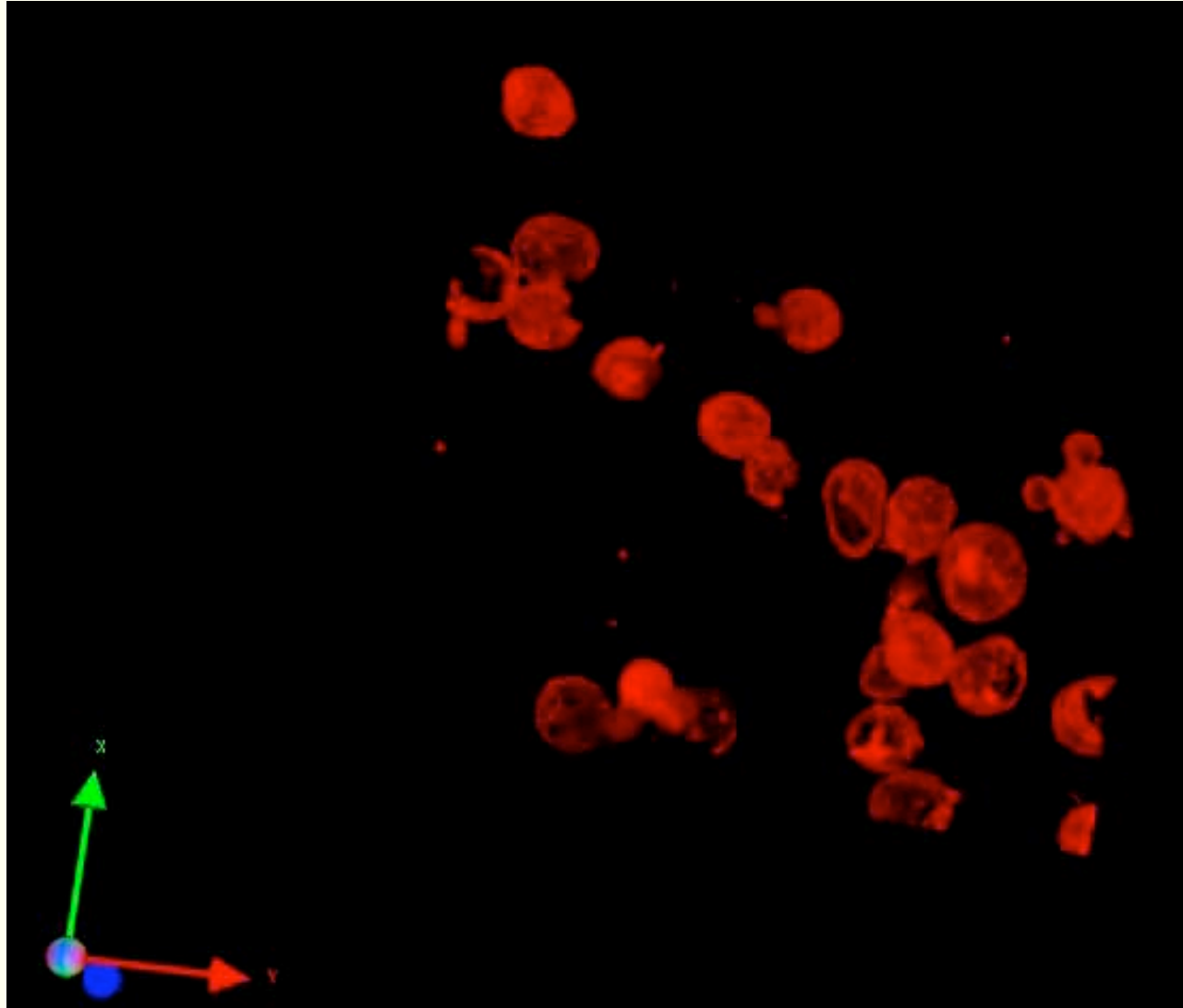
MARQUAGE DE CELLULES VIVANTES

Fluorochromes capables de diffuser à travers des cellules intactes et se fixer sur leurs cibles

Marquage par simple incubation à 37°C à l'abri de la lumière, suivie parfois de rinçage en milieu de culture.

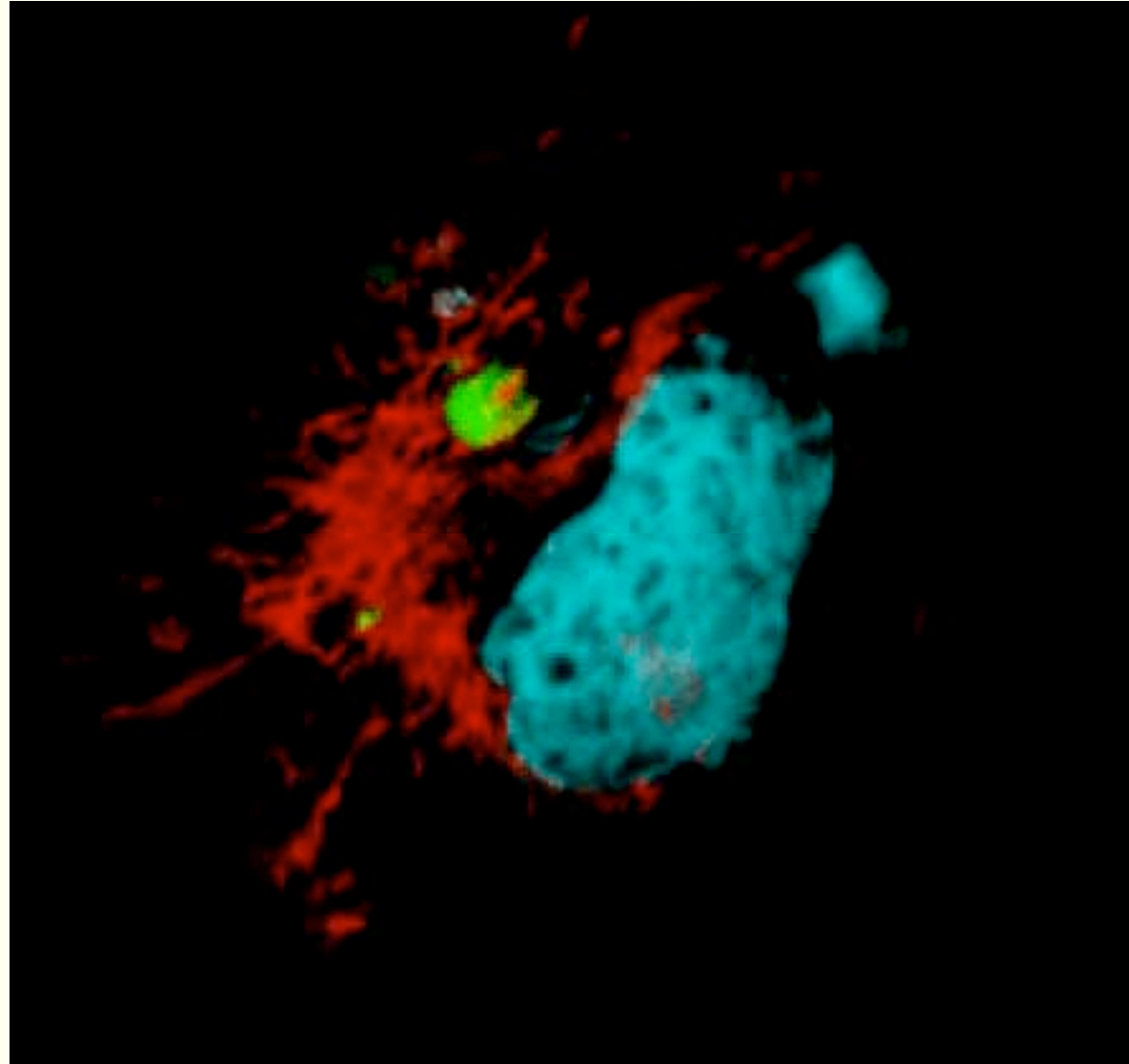
MARQUAGE DE CELLULES VIVANTES

Exemple : marquage membranaire (PKH26) d'hépatocytes de rat



MARQUAGE DE CELLULES VIVANTES

HMEC : Mitotracker Cmxros Red + Hoechst 33342+ FAD



QUELQUES FLUOROCHROMES...

Immunofluorescence

FITC, TRITC, lissamine rhodamine, Texas Red, Cy3.18, Cy5.18, Alexa Fluors

ADN

iodure de propidium, YOYO, Syto16, chromomycine A3, mithramycine; DAPI, Hoechst, DRAQ5, TOTO3

mitochondrie

sensible au potentiel membranaire, TMRM, Rhodamine 123, DiOC₆(3), DiOC₇(3), JC-1, MitoTracker Red CMXRos

membranes

Styrenes FM1-43, FM4-64, fusions-GFP, divers anticorps de surface, PKH26, PKH67, Dil

Viabilité /apoptose

FDA, exclusion d'iodure de propidium, annexine V-Alexa Fluo488, *morphologie avec DIC*

QUELQUES FLUOROCHROMES...

réticulum endoplasmique

(non spécifique) DiOC₆(5), GFP-HDEL

appareil de Golgi

GFP-tagguée, anticorps, NBD-C₆-ceramide
(pas pour végétaux), Bodipy

dépendance envers le pH

carboxy-SNARF-1, BCECF

dépendance envers le calcium

Fluo-3 ou -4 (\pm FF), FuraRed, CalciGreen, Indo-1,
Cameleon

divers

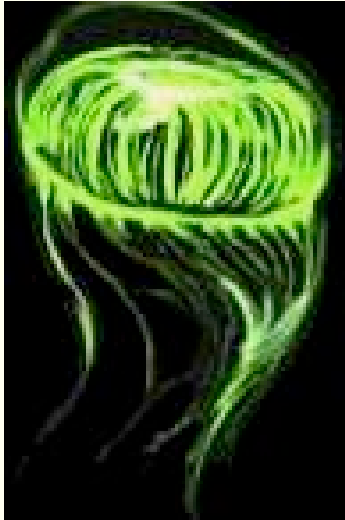
Acridine Orange, Neutral Red, Lucifer Yellow,
chlorophylle,

Protéines Autofluorescentes

-dépendant de l'état redox NADH, FAD,
-GFP, etc...

ref Shaner-Tsien .review Nature biotech. 2004

LES PROTÉINES FLUORESCENTES



Green Fluorescent Protein GFP

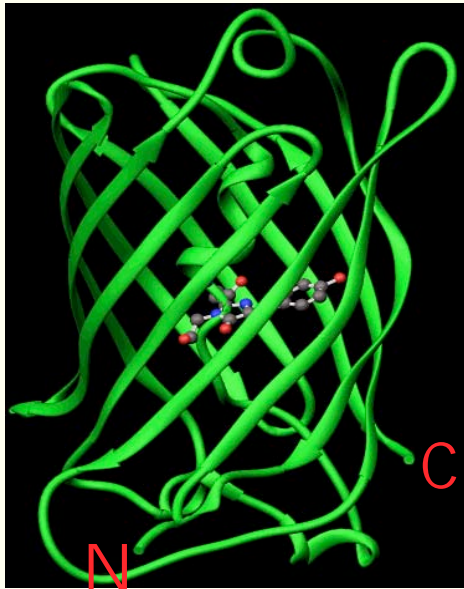
Issue de la méduse *Aequorea victoria*
Protéine intrinsèquement fluorescente
Isolée pour la 1ère fois en 1962

Son gène peut être fusionné *in vitro* au gène d'une protéine que l'on souhaite étudier. Le gène recombinant est ensuite réintroduit dans des cellules qui vont alors synthétiser la protéine chimérique fluorescente

Permet d'étudier les protéines dans leur environnement naturel :
la cellule vivante !



STRUCTURE de la GFP

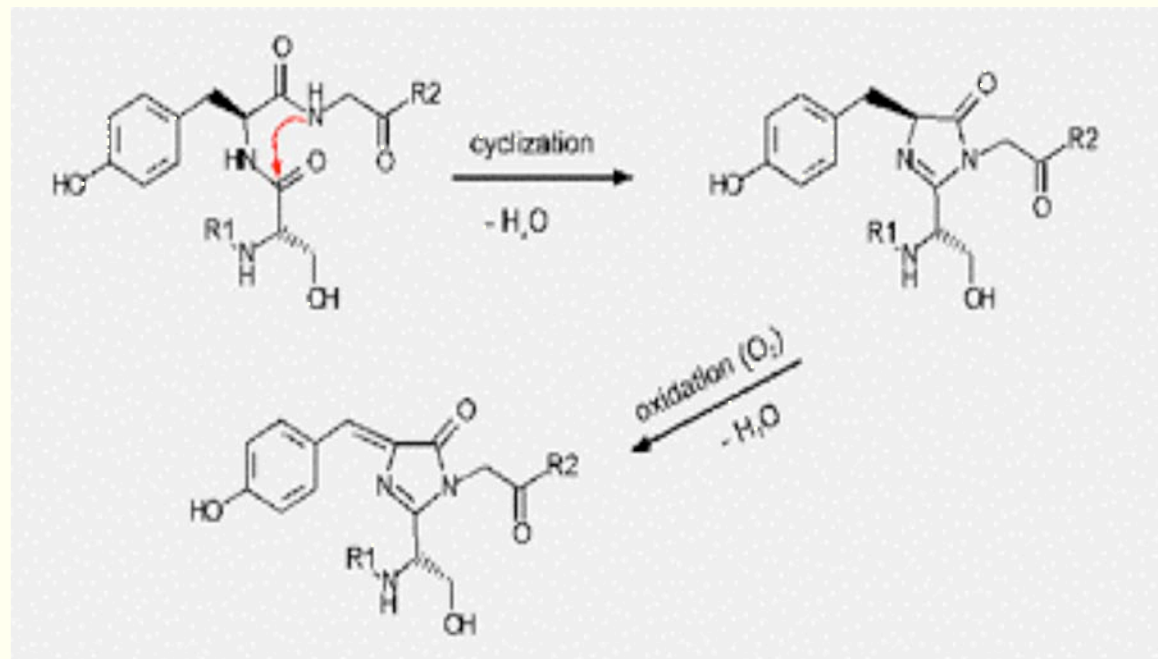


238 acides aminés en 11 « feuillets »
 α -hélice centrale

L'ensemble forme un protéine de 28 kDa avec une structure appelé β -tonneau.

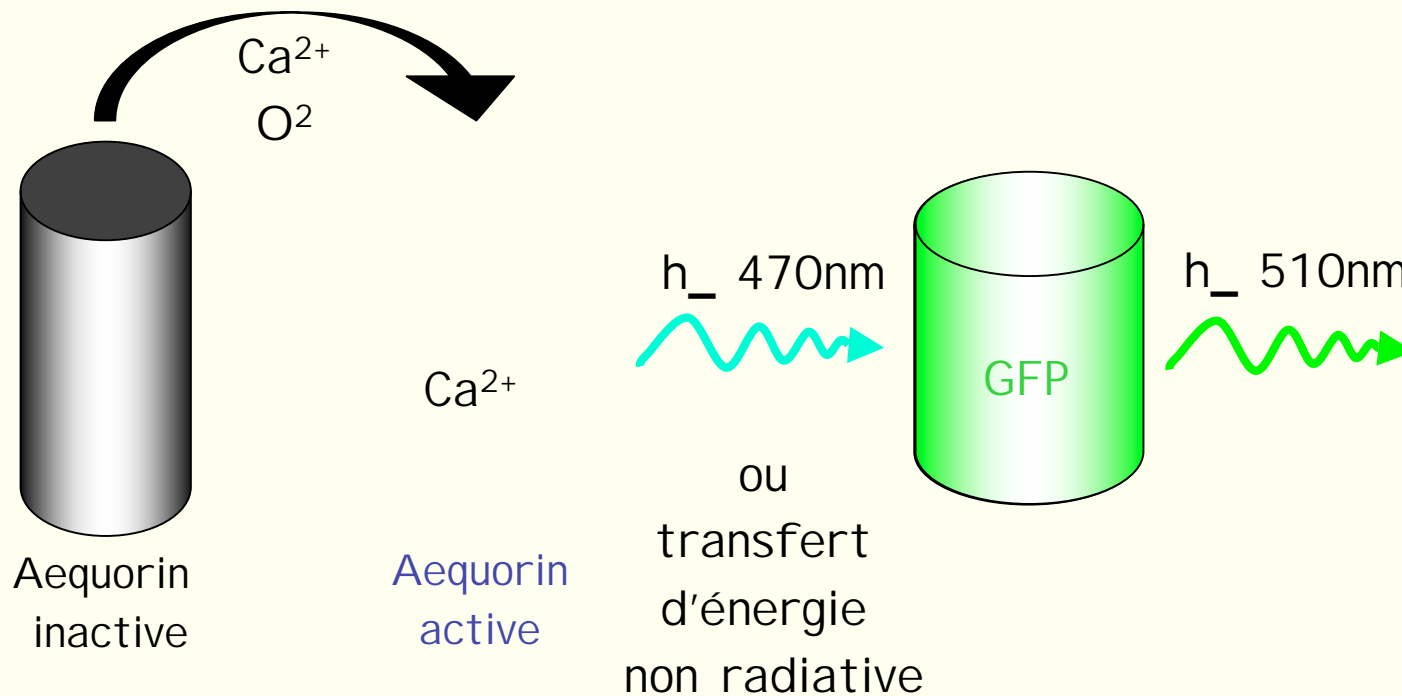
N-terminal et C-terminal sont accessible à la liaison avec d' autres protéines.

Formation du chromophore par cyclisation et oxydation de 3 aa de l'hélice centrale



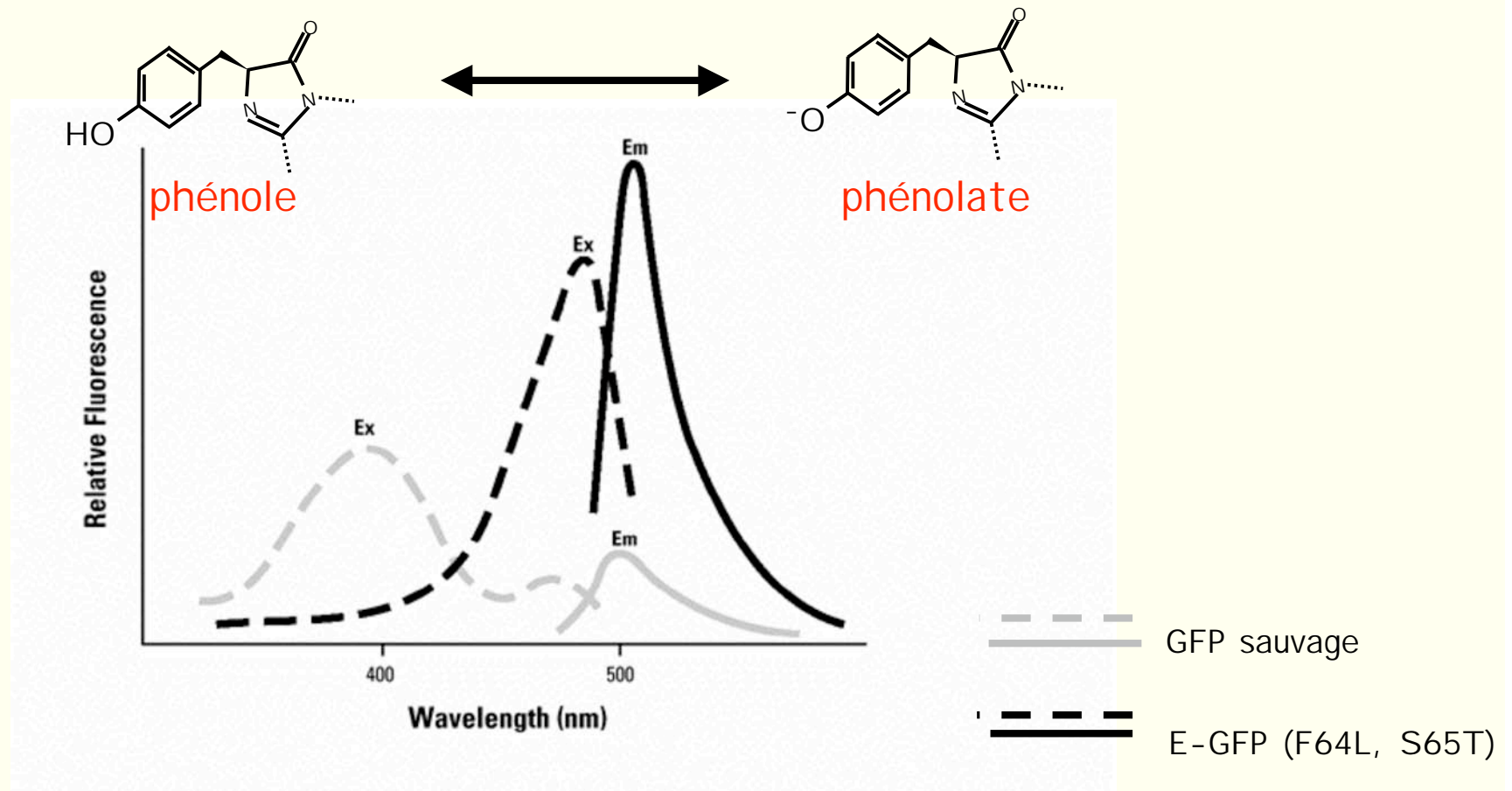
POURQUOI LA GFP EST-ELLE VERTE?

La bioluminescence de la GFP dépend de la photo-protéine AEQUORIN. Isolée, cette photo-protéine émet de la lumière verte. Ce processus est dépendant du Calcium et O_2 . En complexe, elle excite ainsi par transfert d'énergie non radiatif la GFP, laquelle émet ensuite de la lumière verte.

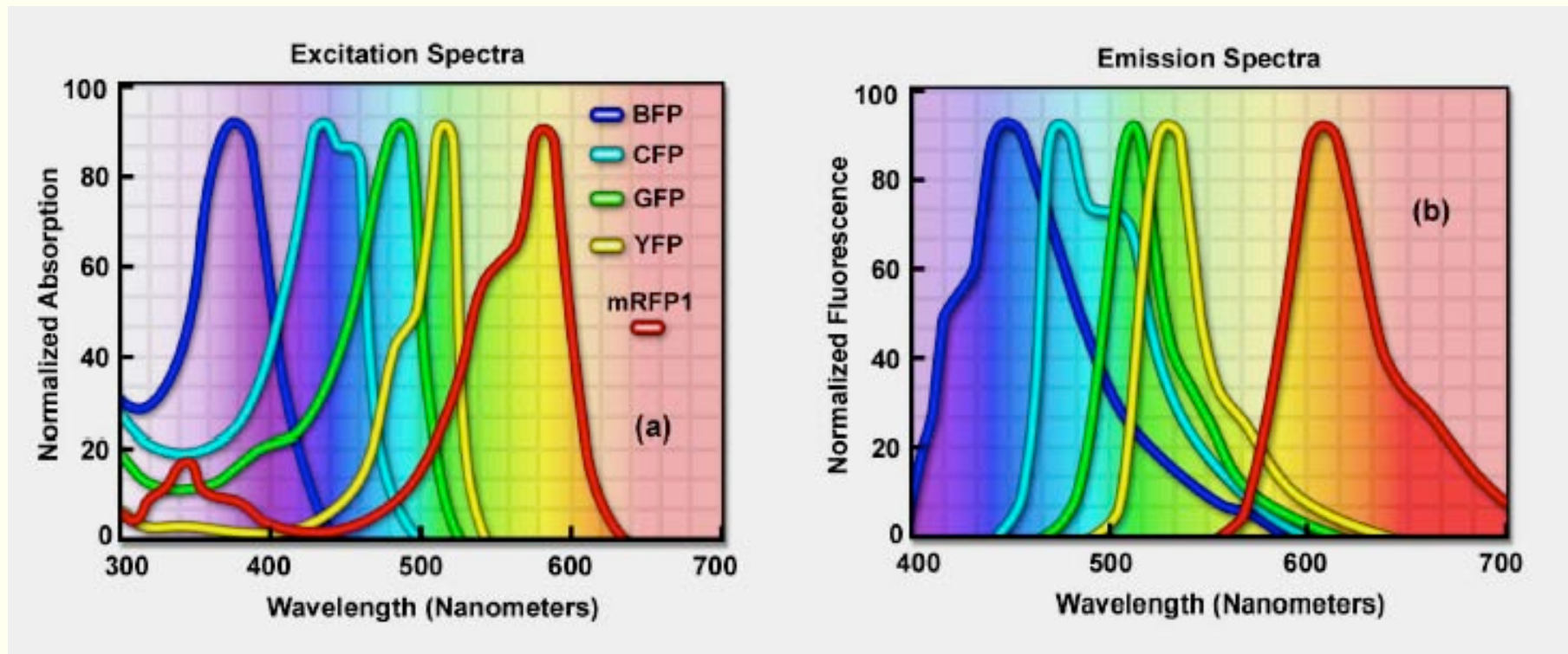


PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES

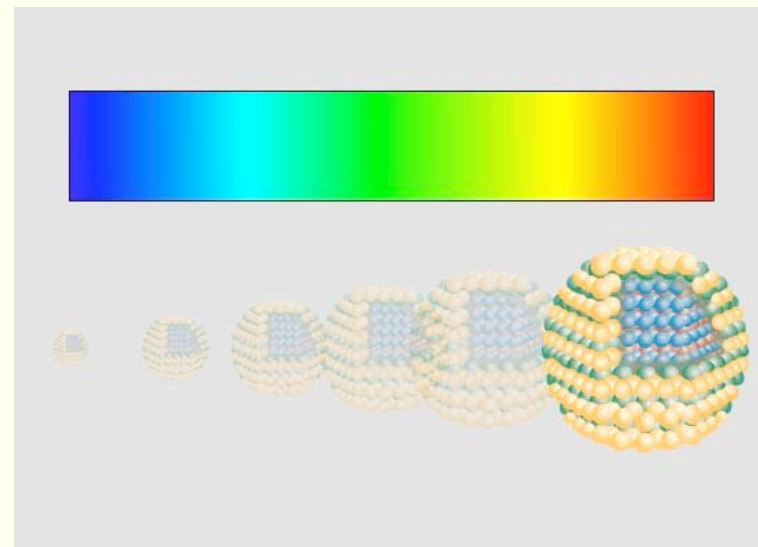
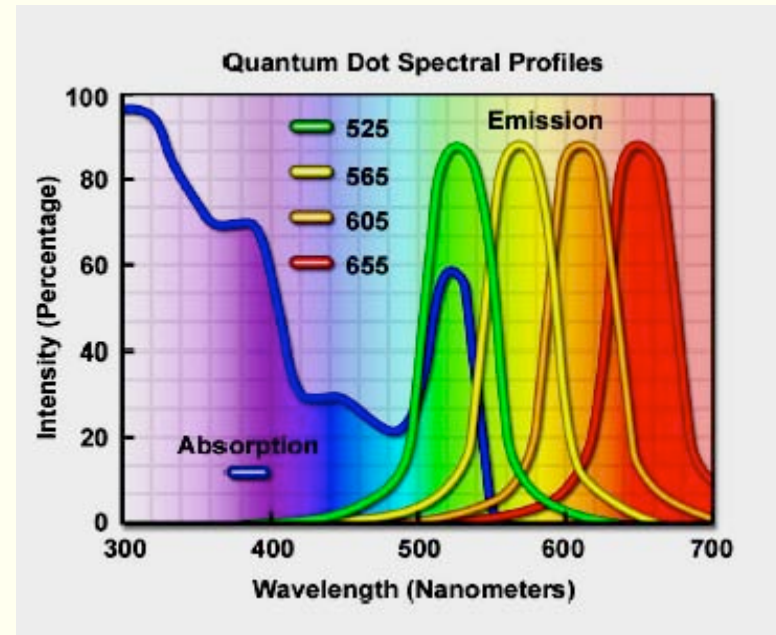
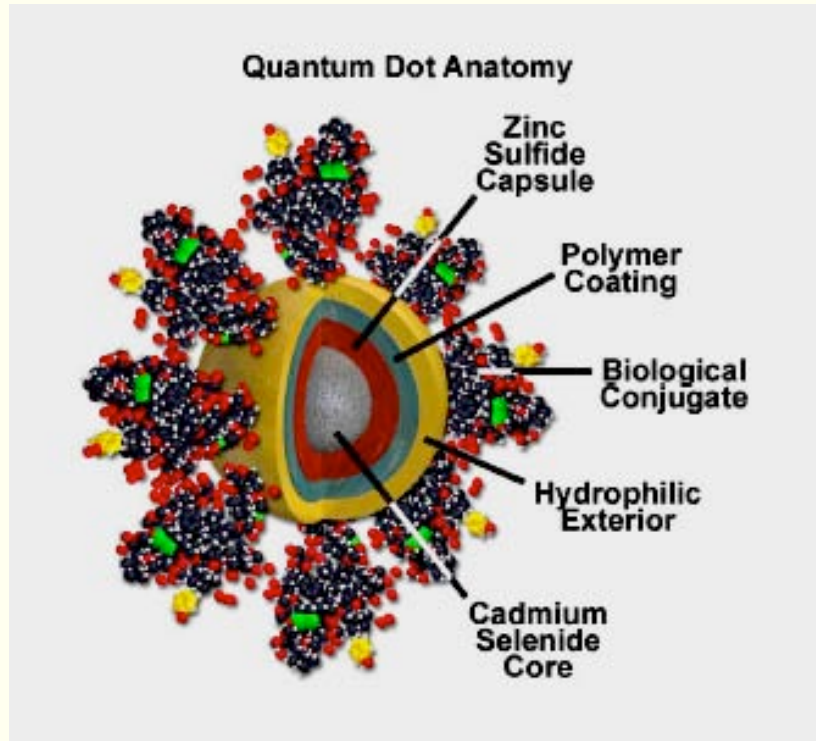
Le pic prédominant d'excitation de la GFP sauvage est à 400 nm (forme phénol), avec un pic mineur à 475 nm (forme phénolate). Dans la forme mutée EGFP, le pic prédominant d'excitation est reporté à 488 nm. Ceci permet l'excitation avec un laser bleu standard.



QUELQUES MUTANTS...



QUANTUM DOTS



QUANTUM DOTS

