

Spectroscopie à corrélation spatiale de fluorescence : mesures locales du transport moléculaire

Antoine DELON^{a,*}, Jacques Derouard^a, Jie GAO^a

^a Laboratoire de Spectrométrie Physique, UJF/CNRS, BP87, 38402 Saint Martin d'Hères Cedex

Résumé – Nous présentons des expériences de spectroscopie à corrélations spatiales de fluorescence (spatial Fluorescence Correlation Spectroscopy ou sFCS), permettant de mesurer, localement, des paramètres du transport moléculaire (vitesse de flux, perméabilité à travers une membrane), au niveau de la molécule unique. Nous montrons qu'il est possible d'utiliser des modulateurs spatiaux de lumière (SLM en anglais, pour Spatial Light Modulator) pour structurer en plusieurs spots lasers contrôlés l'illumination de l'échantillon et réaliser la détection correspondante des signaux de fluorescence, en géométrie confocale.

1. Introduction

La Spectroscopie à Corrélations spatiales de Fluorescence (sFCS en anglais), consiste à observer et à analyser les fluctuations de fluorescence émises par des molécules ou des particules se déplaçant à travers différents volumes optiques, décalés les uns par rapport aux autres (voir Fig. 1). Les premiers articles [1-3], publiés en 1999, ont montré que la sFCS en géométrie confocale (par excitation à 1 ou 2 photons) pouvait être mise en œuvre pour mesurer un flux de molécules. Cependant, ces expériences novatrices utilisaient des séparateurs de faisceaux par polarisation ou des prismes de Wollaston, pour scinder en deux, orienter et réunir les deux faisceaux lasers, quasi-parallèles, focalisés au foyer de l'objectif. Ceci rendait le réglage de l'écart, entre les deux volumes d'observation, pénible à réaliser. Des composants passifs, appelés Passive Diffractive Optical Elements (DOE) ont également été utilisés pour produire des faisceaux gaussiens d'un diamètre submicronique et réaliser ainsi des expériences de FCS et de sFCS [4, 5]. Cependant ces expériences manquaient également de souplesse, car chaque DOE est fabriqué une fois pour toute par lithographie à faisceau d'électrons. Néanmoins, récemment, les modulateurs spatiaux de lumière (Spatial Light Modulators ou SLM) sont devenus commercialement disponibles pour des applications en microscopie (essentiellement pour les pinces optiques), ouvrant ainsi de nouvelles possibilités, puisque ces dispositifs permettent de contrôler et d'optimiser la géométrie de l'illumination laser, en fonction du processus moléculaire que l'on veut étudier (transport passif ou actif, perméabilité à travers une membrane, *etc.*). Afin de tester les potentialités offertes par le fait de combiner un SLM avec la technique sFCS, nous avons réalisé des mesures locales de deux types de transport moléculaire : le transport actif caractérisé par une vitesse de flux et le transport passif avec la perméabilité à travers une membrane. Dans les deux cas, le SLM était utilisé sous la forme d'un réseau de phase 1D, produisant ainsi deux spots lasers, décalés l'un par rapport à l'autre d'une distance contrôlée.

2. Mesures de la vitesse d'un flux

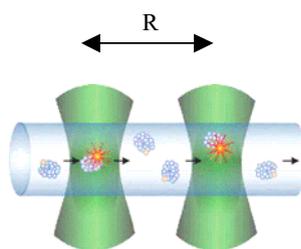


Fig. 1: principe de la sFCS

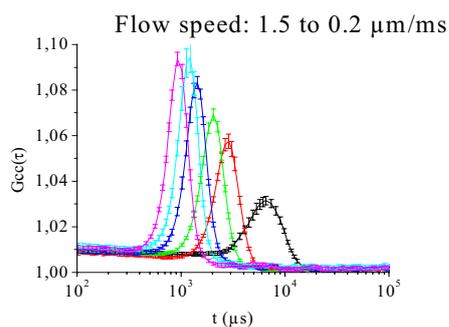


Fig. 2 : mesure d'un flux par sFCS, (distance entre spots = 1,4 μm)

Dans le cas du transport actif, la sFCS a été utilisée pour mesurer un flux de vitesse V entre deux spots lasers (Fig. 1), produits par un SLM. On espère ainsi mettre en évidence le temps, τ , mis par les molécules pour passer d'un volume à l'autre. Ceci se vérifie facilement en calculant la fonction de corrélation croisée des signaux provenant des deux volumes (Fig. 2). En effet, cette fonction possède un maximum bien prononcé au temps $\tau = R/V$.

* Auteur à contacter : adelon@ujf-grenoble.fr – Tel : 04 76 63 58 01

3. Evaluation de la perméabilité

Une autre application intéressante de la sFCS concerne la mesure de la perméabilité, par exemple à travers une membrane, comme montré sur la Fig. 3. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les membranes phospholipidiques des vésicules géantes, étaient perméables aux molécules hydrophobes, générant ainsi une fonction de corrélation croisée présentant une bosse correspondant aux flux moléculaire à travers la membrane (graphe de droite). Inversement, pour des molécules hydrophiles, on n'observe aucune corrélation croisée, parce que ces molécules ne franchissent pas la membrane (graphe de gauche).

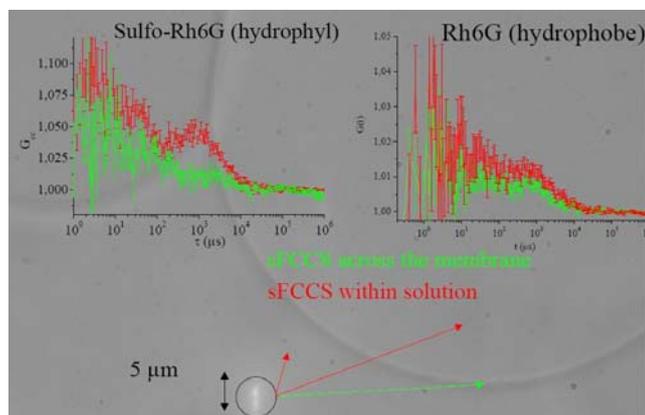


Fig. 3 : évaluation de la perméabilité par sFCS, de la membrane d'une vésicule géante ; les deux spots sont placés, soit complètement en solution (courbes rouges), soit de part et d'autre de la membrane (courbes vertes)

4. Conclusion

Ces expériences constituent donc la démonstration de principe selon laquelle il est possible de mesurer localement, par microscopie optique et au niveau de la molécule unique, des paramètres de transport, par exemple une vitesse pour un transport actif et une perméabilité pour un transport passif (ces mesures pouvant être étendues à d'autres types de transport). Plus généralement nous pensons que ce type de technique, combinant un SLM et des détecteurs ponctuels est efficace tant que le nombre de détecteurs (c'est-à-dire de points d'observation) est limité à deux. Au delà, il faut utiliser des matrices de détecteurs, comme les CCD, comme cela a déjà été démontré [6].

5. Références

- [1] Brinkmeier, M., K. Dörre, J. Stephan, and M. Eigen. *Two beam cross-correlation: a method to characterize transport phenomena in Micrometer-sized structures*. Anal. Chem. **71** (1999)609–616.
- [2] Dittrich P., and P. Schwille. *Spatial two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy for controlling molecular transport in microfluidic structures*. Anal. Chem. **74** (2002) 4472–4479.
- [3] Lumma, D., A. Best, A. Gansen, F. Feuillebois, J. O. Rädler, and O. I. Vinogradova. *Flow profile near a wall measured by double-focus fluorescence cross-correlation*. Phys. Rev E **67** (2003) 056313-1–056313-10
- [4] Blom, H., M. Johansson, A.-S. Hedman, L. Lundberg, A. Hanning, Sverker Hård, and Rudolf Rigler. *Parallel fluorescence detection of single biomolecules in microarrays by a diffractive-optical-designed 2x2 fan-out element*, App. Opt. **41** (2002) 3336-3342.
- [5] Blom, H., M. Johansson, M. Gösch, T. Sigmundsson, J. Holm, S. Hård, and R. Rigler. *Parallel flow measurements in microstructures by use of a multifocal 4x1 diffractive optical fan-out element*. App. Opt. **41** (2002) 6614-6620.
- [6] Burkhardt, M., and P. Schwille. *Electron multiplying CCD based detection for spatially resolved fluorescence correlation spectroscopy*. Opt. Exp. **14** (2006) 5013-5020.