

# FILTRES SPECTRAUX POUR LE MULTIPLEXAGE DE FLUORESCENCE

Guillaume Adam<sup>1</sup>, Anne Souchon<sup>2</sup>, Michael Delay<sup>2</sup>, Elizabeth Bernhardt<sup>2</sup>, Xavier Elbaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Optoprim France, 21-23 Rue Aristide Briand, 92170 VANVES, France

<sup>2</sup>Semrock (IDEX Health and Science, LLC), 1180 John Street, West Henrietta, NY 14586, USA



Les progrès constants de la technologie de dépôt de couches minces au cours des dernières décennies ont permis la production de filtres optiques multi-bandes haute performance, répondant ainsi à la demande croissante d'instruments de fluorescence multispectraux. Bien qu'il existe maintenant une large gamme de filtres standards conçus pour une grande variété de fluorophores, la sélection de filtres appropriés est souvent un processus complexe. Nous présentons ici les caractéristiques techniques à considérer pour la conception d'un tel système multiplexe.

**L**a disponibilité d'une large gamme de marqueurs fluorescents compatibles avec les cellules sur le spectre visible et proche infrarouge permet l'étude simultanée de plusieurs composants cellulaires, molécules et/ou signaux, en utilisant plusieurs fluorophores. Le passage d'un système d'analyse à une seule voie optique au multiplexage – à savoir l'acquisition simultanée, séquentielle ou en combinaison de plusieurs signaux différents –

nécessite une évolution en profondeur de l'instrument utilisé.

Les meilleures performances optiques, *i.e.* contraste d'image élevé et crosstalk faible, sont en général obtenues en utilisant des jeux de filtres simple-bandes interchangeables mécaniquement. Cependant, il peut être souhaitable de réduire le temps d'acquisition au prix d'une modeste réduction des performances avec un choix judicieux de filtres multi-bandes. Cet article décrit comment choisir ces filtres pour la mesure de fluorescence multiplexée.

## FILTRES OPTIQUES DANS L'INSTRUMENTATION DE FLUORESCENCE

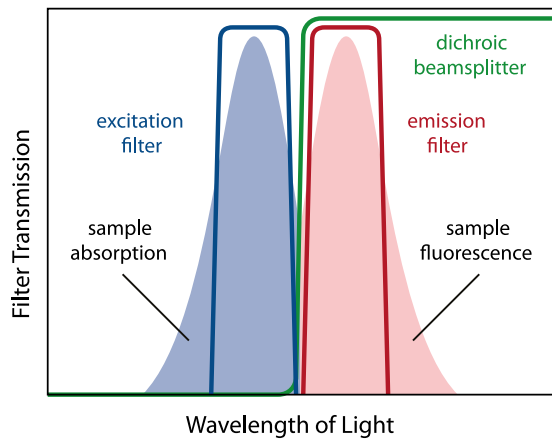
La fonction des filtres est de sélectionner spectralement la lumière dans le système optique : l'émission de chaque fluorophore dans l'échantillon, même en faible concentration, doit être détectée avec précision pour obtenir la sensibilité et la spécificité requises. Cela nécessite donc une excitation efficace et ciblée de chaque fluorophore, une transmission maximale vers le détecteur de la fluorescence émise, tout en minimisant la détection des signaux indésirables

(bruit de fond). La plupart des instruments de fluorescence utilisent une combinaison de trois filtres (Fig. 1). Chaque fluorophore a son propre spectre d'excitation et d'émission.

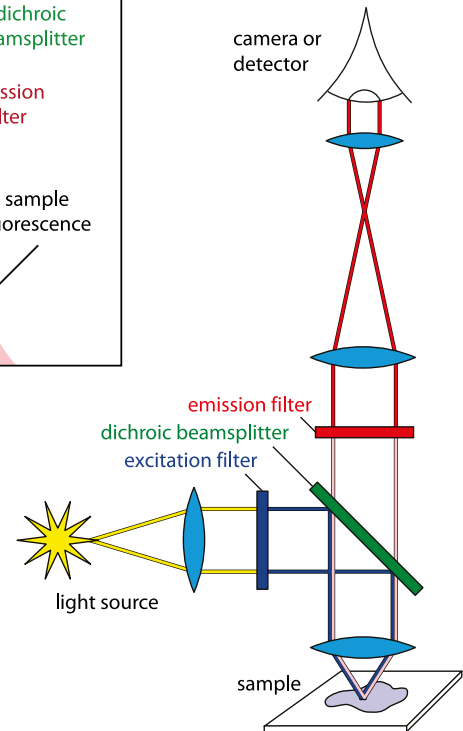
Le filtre d'excitation permet à une plage restreinte de longueurs d'onde sur la bande d'excitation du fluorophore d'atteindre l'échantillon. Il bloque toute lumière en dehors de cette bande spectrale pour limiter l'excitation d'autres sources de fluorescence dont la lumière sur la bande d'émission. Le filtre d'émission transmet au détecteur la lumière du fluorophore dans la bande d'émission choisie et bloque la lumière en dehors de cette bande, notamment toute lumière d'excitation.

La lame séparatrice dichroïque est un filtre positionné à incidence oblique qui dirige efficacement la lumière dans les bandes d'excitation et d'émission vers leurs destinations respectives.

Des filtres haute performance avec des spécifications appropriées sont essentiels pour maximiser le rapport signal sur bruit. Un filtre d'excitation doit avoir une transmission élevée sur une bande passante centrée sur le pic d'absorption du fluorophore. Un filtre d'émission doit avoir une transmission élevée sur une bande passante optimisée suffisamment large, tout en assurant un blocage étendu afin de limiter la détection



**Figure 1.** La plupart des instruments de fluorescence utilisent une combinaison avec un filtre d'excitation, une lame séparatrice dichroïque et un filtre d'émission.



de la lumière d'excitation diffusée et du bruit de fond (dû par exemple à l'auto-fluorescence). Enfin, un dichroïque doit offrir une transition suffisamment rapide entre la bande à haute réflectivité et la bande de transmission.

Les filtres dans un système de détection de fluorescence sont fortement interdépendants. Chaque ensemble excitation-émission-dichroïque doit

être choisi avec soin pour avoir de bonnes performances avec le fluorophore correspondant, mais aussi pour optimiser les résultats avec les autres fluorophores. Dans le cas où des filtres seraient choisis chez plusieurs fournisseurs différents, il faut être particulièrement vigilant quant à leur comptabilité, au-delà des spécifications spectrales publiées.

Il est préférable de considérer ●●●

small components  
MASSIVE IMPACT



Machine Vision Laser Modules

Just Around the Corner

FLEXPOINT® line laser modules  
manufactured to your needs.

[www.lasercomponents.fr](http://www.lasercomponents.fr)

les filtres optiques dans un instrument dès le début de la phase de conception, tout en sélectionnant les fluorophores et en définissant l'architecture du système avec les sources d'excitation, la configuration optique et les détecteurs.

**DÉTECTION MULTI-COULEUR ET CROSSTALK**

Les filtres de la figure 1 sont appelés filtres « simple bande ». Pour une étude multiplexe, dans laquelle différents marqueurs doivent être détectés dans un même échantillon, il peut être pratique de combiner deux ou plusieurs bandes d'excitation ou d'émission sur un filtre, ce qui donne des filtres multi-bandes.

Cependant, l'utilisation de plusieurs fluorophores peut introduire une interférence entre les spectres, appelée crosstalk, lorsque les profils spectraux de fluorophores excités simultanément se chevauchent, entraînant l'émission d'un fluorophore dans la bande passante d'émission d'un autre fluorophore, et une perte de spécificité (Fig. 2). Cela peut être

inévitable avec un multiplexage dense car de nombreux fluorophores ont des spectres larges. L'utilisation de filtres avec des bandes passantes plus étroites est préférable dans ce cas. Le positionnement et la largeur de la bande passante sont sélectionnés pour minimiser le crosstalk tout en préservant l'efficacité de collection du signal de fluorescence.

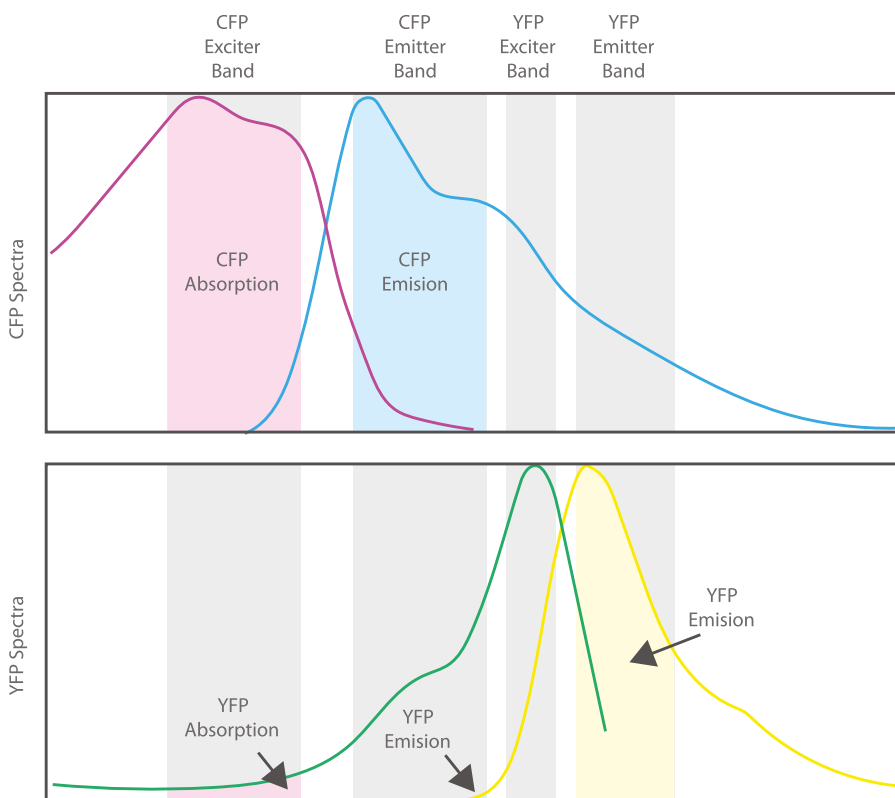
**SIMPLE BANDE VS MULTI-BANDE**

Les jeux de filtres simple-bandes offrent une grande flexibilité dans les applications multiplexes et permettent généralement d'obtenir le contraste le plus élevé et le crosstalk le plus faible. Néanmoins ils peuvent limiter la vitesse à laquelle des images multicolores complètes sont acquises, ce qui nuit à la capture de la dynamique de l'échantillon. La superposition précise des multiples

images monochromes peut être entravée par le décalage de l'image qui se produit en passant d'un jeu à l'autre. Les filtres mono-bandes augmentent également le nombre de composants optiques et leur coût total quand le nombre de fluorophores augmente.

Les filtres multi-bandes haute performance permettent une imagerie rapide sans sacrifier la fidélité de l'image. Trois types de jeux de filtres multi-bandes sont utilisés pour l'imagerie multi-couleur simultanée (Fig. 3) ; chacun utilise un séparateur dichroïque multi-bande. L'approche « Sedat » devrait fournir la meilleure fidélité d'image des trois, car elle utilise des filtres d'excitation et d'émission simple bande, et les problèmes de superposition d'image sont quasiment éliminés. Les configurations « Pinkel » et « Full Multiband » sont équivalentes si des sources lumineuses activables individuellement sont utilisées telles que des LED, des diodes laser ou des lasers.

**Figure 2.** Cas des deux fluorophores CFP et YFP, dont les spectres se chevauchent. Une partie de l'émission du YFP peut contaminer la détection dans le canal dédié au CFP.



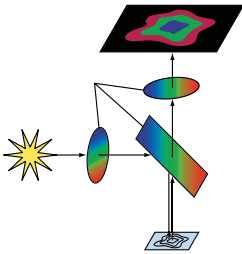
**CHOISIR OU CONCEVOIR DES JEUX DE FILTRES**

La sélection de filtres pour un instrument de fluorescence multiplexe nécessite la prise en compte des facteurs abordés dans la section suivante. Des compromis sont souvent nécessaires entre la vitesse d'acquisition, les performances optiques, la taille et le coût. La quantité de crosstalk acceptable doit également être prise en compte et dépend de l'utilisation de techniques de déconvolution spectrale (dé-mixage).

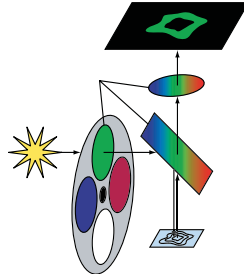
La modélisation du signal, du bruit de fond et du crosstalk pour les fluorophores, sources lumineuses et détecteurs considérés doit être réalisée avec un outil numérique approprié. Un simple afficheur spectral n'est pas suffisant, car il ne permet pas le calcul de ces paramètres.

Des filtres mono et multi-bandes et des jeux de filtres optimisés sont disponibles dans le commerce. Il est possible de sélectionner des filtres individuels pour former de nouveaux

“Full Multiband” Configuration  
(Multiband exciter, multiband emitter,  
& multiband dichroic)



“Pinkel” Configuration  
(Multiband emitter, multiband  
dichroic, & single-band exciter)



“Sedat” Configuration  
(Multiband dichroic, single-band exciter,  
& single-band emitters)

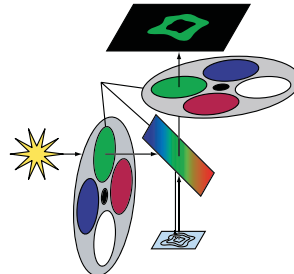


Figure 3. Trois types de jeux de filtres multi-bandes

jeux, mais une modélisation est indispensable pour assurer un fonctionnement correct.

**TRANSMISSION, BLOCAGE, PENTE ET PRÉCISION DE PLACEMENT DES FRONTS DE TRANSITION**

Les traitements diélectriques « durs » font désormais partie des offres standards de la plupart des fournisseurs de filtres. Cette technologie, associée à des systèmes de contrôle de dépôt ultraprécis et à de puissants logiciels de conception, permet la fabrication de manière fiable et reproductible de filtres de plus en plus complexes, offrant de nouveaux niveaux de performance, en particulier pour les filtres multi-bandes. À cet égard, nous reconnaissons les

contributions pionnières du professeur H.A. Macleod, 1933-2021 [1]. Les spécifications clés qui permettent de distinguer un filtre par rapport à un autre sont la transmission sur la bande passante, le niveau de réjection sur les bandes de blocage, la pente des transitions ainsi que la précision sur leur placement. Les caractéristiques optimales en termes de transmission et de blocage ont été présentées précédemment, dans la section sur les « Filtres optiques dans l'instrumentation de fluorescence ». La pente décrit l'intervalle de longueur d'onde nécessaire pour passer d'une transmission élevée à un blocage élevé (ou à

une réflectivité élevée pour un dichroïque). La précision de placement correspond à la répétabilité spectrale avec laquelle la position des fronts de transition est maintenue d'un filtre à l'autre et d'un lot de fabrication à l'autre. Comme détaillé par la suite, ces deux paramètres peuvent être optimisés pour réduire à la fois le crosstalk entre les voies d'excitation et d'émission et le crosstalk entre fluorophores, tout en assurant une bonne efficacité de collection de la fluorescence émise.

Les spectres de trois filtres conçus pour fonctionner ensemble de manière optimale dans un set quadri-bande « Full-multiband » sont présentés en figure 4.

Les jeux de filtres avec des bandes passantes d'excitation et d'émission rapprochées sont préférables pour les fluorophores ayant un faible déplacement de Stokes (« Stokes shift »), pour exciter plus efficacement le fluorophore tout en optimisant la détection de la fluorescence émise. La problématique est la même en multiplexage optique : les spectres des fluorophores se chevauchent, de sorte que des bandes passantes rapprochées maximisent le signal tout en limitant le crosstalk. Il peut cependant y avoir un ●●●

## EMPOWERING MULTIPLEX PCR

Semrock leads the way in multi-channel PCR filter design, support, and production.

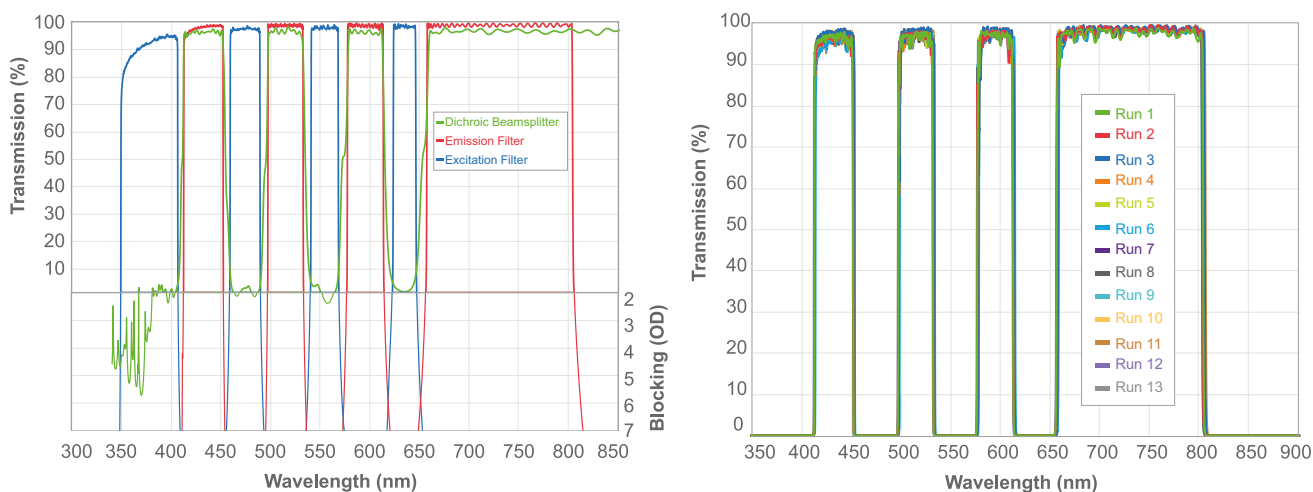
Off-the-shelf filters for common probes and dyes:

> FAM	> HEX
> SYBRGreen	> TAMRA
> JOE	> ROX
> VIC	> Cy5

OPTOPRIM  
Photons for Research & Industry

[www.semrock.com/multiplex](http://www.semrock.com/multiplex)  
[www.optoprime-microscopie.com](http://www.optoprime-microscopie.com)





**Figure 4.** À gauche : Set de filtres multi-bandes optimisé pour une transmission élevée, des transitions rapides, et un blocage optimum entre les bandes. À droite : Reproductibilité d'un lot de filtres à l'autre qui garantit une faible variabilité entre les filtres pour de meilleures performances.

risque plus élevé de contamination du signal de fluorescence par la lumière d'excitation si des décalages spectraux importants et non contrôlés se produisent sur différents lots de filtres pendant la phase de production.

Dans ces situations, des filtres haute performance sont nécessaires pour obtenir la meilleure qualité de détection. Une transition rapide de la transmission au blocage, associée au contrôle de la gamme de longueurs d'onde sur laquelle s'effectue cette transition, garantit un blocage suffisant entre les bandes, même lorsqu'elles sont rapprochées, préservant le rapport signal sur bruit. De plus, le fait de s'assurer que les fronts de transition sont positionnés de manière répétée aussi près que possible de l'emplacement optimal nominal se traduit par un signal de fluorescence plus élevé avec un crosstalk faible et contrôlé.

Enfin, un placement précis des bandes spectrales avec une haute reproductibilité de lot à lot est essentiel pour une analyse quantitative fiable, de sorte que chaque instrument fournisse les mêmes résultats.

**AUTRES CONSIDÉRATIONS**

La qualité du front d'onde peut être importante dans les applications d'imagerie, car la distorsion du front d'onde peut dégrader la qualité de l'image en réduisant le contraste ou en compromettant la résolution. Dans ce cas les filtres optiques

doivent être sélectionnés avec une faible erreur de front d'onde transmis (TWE) sur le trajet d'imagerie, et/ou avec une faible erreur de front d'onde réfléchi (RWE) pour la lumière réfléchie [2].

Les filtres interférentiels sont sensibles à l'angle d'incidence, avec un décalage de leur réponse spectrale vers le bleu quand l'angle d'incidence augmente. Cet effet doit être pris en compte pour éviter toute perte de performance. Ceci est particulièrement important pour les systèmes compacts où les faisceaux peuvent être incidents sur une large gamme angulaire.

Enfin, la qualité cosmétique de la surface du filtre doit être considérée, en particulier dans les systèmes qui ont des filtres proches des plans focaux conjugués.

**CONCLUSION**

Les considérations techniques ci-dessus fournissent un point de départ solide lors de la conception de tout instrument de fluorescence, et en particulier avec multiplexage. Dans les situations où aucun filtre catalogue n'est adapté, ces informations sont indispensables pour le design de filtres personnalisés. ●

**RÉFÉRENCES**

- [1] Macleod, H. A., Thin-Film Optical Filters, Fifth Edition, CRC Press (2021)
- [2] Maximizing the Performance of Advanced Microscopes by Controlling Wavefront Error Using Optical Filters, <https://www.semrock.com/Data/Sites/1/semrockpdfs/idx2678-smk-maxperf-wp.pdf>

MARQUE	PRODUITS	INFO	DISTRIBUTEURS FRANCE
Semrock	Filtres Optiques	<a href="mailto:info@optoprim.com">info@optoprim.com</a>	Optoprim France
Alluxa / Omega		<a href="mailto:info@lasercomponents.com">info@lasercomponents.com</a>	Laser components
Chroma		<a href="mailto:europe@chroma.com">europe@chroma.com</a>	Chroma Technology GmbH
Edmund Optics		08 20 20 75 55	Edmund Optics
Iridian		<a href="mailto:inquiries@iridian.ca">inquiries@iridian.ca</a>	Iridian Canada