

# Emission de fluorescence

---

**Hélène Pasquier**

Institut de Chimie Physique

helene.pasquier@u-psud.fr

# *Sommaire*

*I. Emission de fluorescence : généralités*

*II. Processus d'extinction de la fluorescence*

*III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes*

# *Sommaire*

## *I. Emission de fluorescence : généralités*

- ✓ **Diagramme Perrin-Jablonski**
- ✓ **Durée de vie et rendement quantique**
- ✓ **Spectroscopie stationnaire**
  - ✓ **Instruments**
  - ✓ **Dépendance de l'intensité de fluorescence avec la concentration**
  - ✓ **Spectres d'émission et d'excitation**
  - ✓ **Détermination expérimentale du rendement quantique**
- ✓ **Influence de divers paramètres physico-chimiques**
  - ✓ **Concentration : effet de filtre interne**
  - ✓ **Température**
  - ✓ **pH**
  - ✓ **Solvant-polarité**

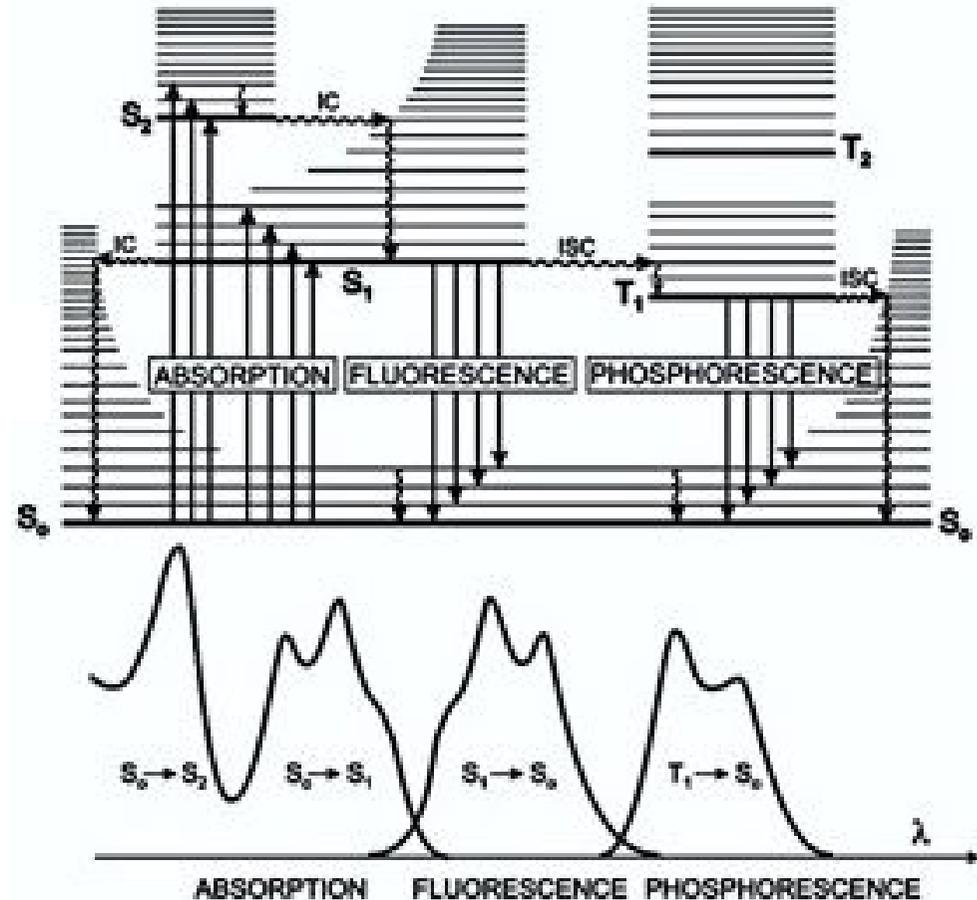
## *II. Processus d'extinction de la fluorescence*

## *III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes*

**Diagramme de Perrin-Jablonski :**  
**Processus de de-excitation d'une molécule suite à l'absorption d'un photon**

**Absorption ( $10^{-15}$ s)** : promotion d'un électron de  $S_0, v=0$  à  $S_n, v'$ .  
Principe de Franck-Condon : transition verticale pas de changement de la position des noyaux atomiques.

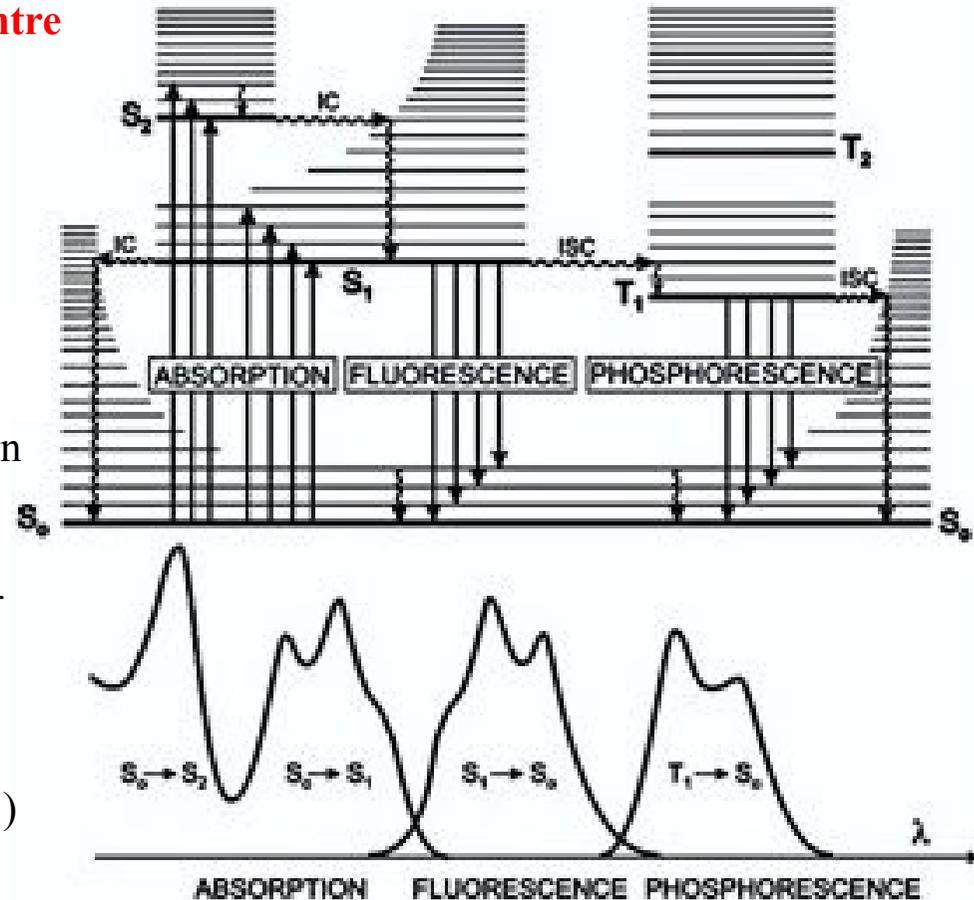
**Conversion interne** : transition non radiative entre 2 états électroniques de même multiplicité de spin.  
Suivie d'une relaxation vibrationnelle vers  $v=0$  de l'état électronique considéré.  
Dans  $S_1$ , relaxation vibrationnelle vers  $v=0$  :  $10^{-13}$  -  $10^{-11}$  s



## Diagramme de Perrin-Jablonski : Processus de de-excitation d'une molécule suite à l'absorption d'un photon

Une fois, la molécule dans  $S_1$ ,  $v=0$ , compétition entre divers processus :

- ✓ **Conversion interne** puis **relaxation vibrationnelle** vers  $S_0$ ,  $v=0$
- ✓ **Emission de fluorescence**, processus radiatif  $10^{-7} - 10^{-10}$  s
- ✓ **Conversion intersystème (ISC)** : transition non radiative entre 2 états électroniques de multiplicité de spin distinctes, ici,  $S_1 \rightarrow T_1$   
Peut être suffisamment rapide ( $10^{-7} - 10^{-9}$  s) pour entrer en compétition avec autres voies de désactivation de  $S_1$ .  
Puis **ISC**  $T_1 \rightarrow S_0$   
ou **Emission de phosphorescence** ( $10^{-7} - 1$  s)



# *Sommaire*

## *I. Emission de fluorescence : généralités*

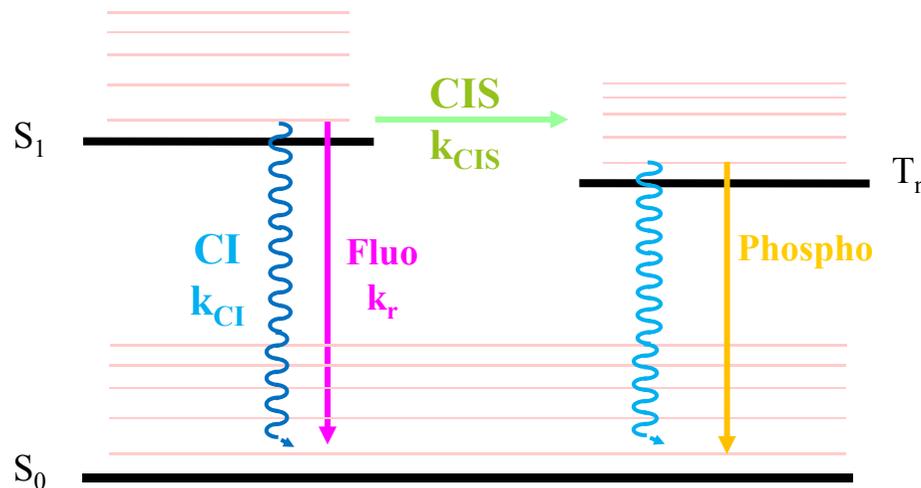
- ✓ **Diagramme Perrin-Jablonski**
- ✓ **Durée de vie et rendement quantique**
- ✓ **Spectroscopie stationnaire**
  - ✓ **Instruments**
  - ✓ **Dépendance de l'intensité de fluorescence avec la concentration**
  - ✓ **Spectres d'émission et d'excitation**
  - ✓ **Détermination expérimentale du rendement quantique**
- ✓ **Influence de divers paramètres physico-chimiques**
  - ✓ **Concentration : effet de filtre interne**
  - ✓ **Température**
  - ✓ **pH**
  - ✓ **Solvant-polarité**

## *II. Processus d'extinction de la fluorescence*

## *III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes*

## Durée de vie et Rendement quantique

### ✚ Rendement quantique d'émission de fluorescence



$k_r$  : constante de vitesse de désactivation radiative de  $S_1$  vers  $S_0$  avec émission de fluorescence

$k_{CI}$  : constante de vitesse de désactivation non-radiative de  $S_1$  vers  $S_0$  par conversion interne

$k_{CIS}$  : constante de vitesse de conversion intersystème

$$k_{nr} = k_{CI} + k_{CIS}$$

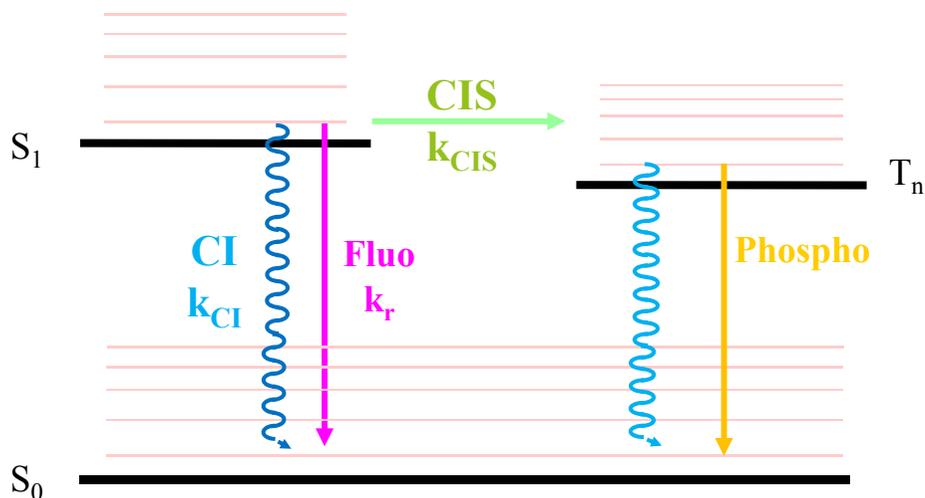
$\Phi_F$  : rendement quantique d'émission de fluorescence

= probabilité ou capacité d'une molécule excitée à émettre un photon

$$\Phi_F = \frac{N_{\text{émis}}}{N_{\text{abs}}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

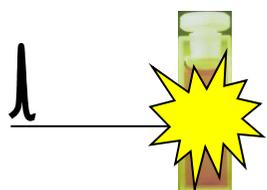
## Durée de vie et Rendement quantique

### ⚡ Durée de vie de l'état excité



$$k_{nr} = k_{CI} + k_{CIS}$$

Suite à une impulsion ultrabrève,



$$-\frac{d[{}^1M^*]}{dt} = \{k_r + k_{nr}\} \cdot [M^*]$$

Soit par intégration et en utilisant la cond. aux limites  $[{}^1M^*](t = 0) = [{}^1M^*]_0$

$$[{}^1M^*](t) = [{}^1M^*]_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$$

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

$\tau$  : **Durée de vie de l'état excité  $S_1$**   
**Durée de vie d'émission de fluorescence**

## Durée de vie et Rendement quantique

### ⚡ Déclin d'émission de fluorescence

**intensité de fluorescence** = nbre de photons émis (mol) par unité de tps (s) et de volume (L)

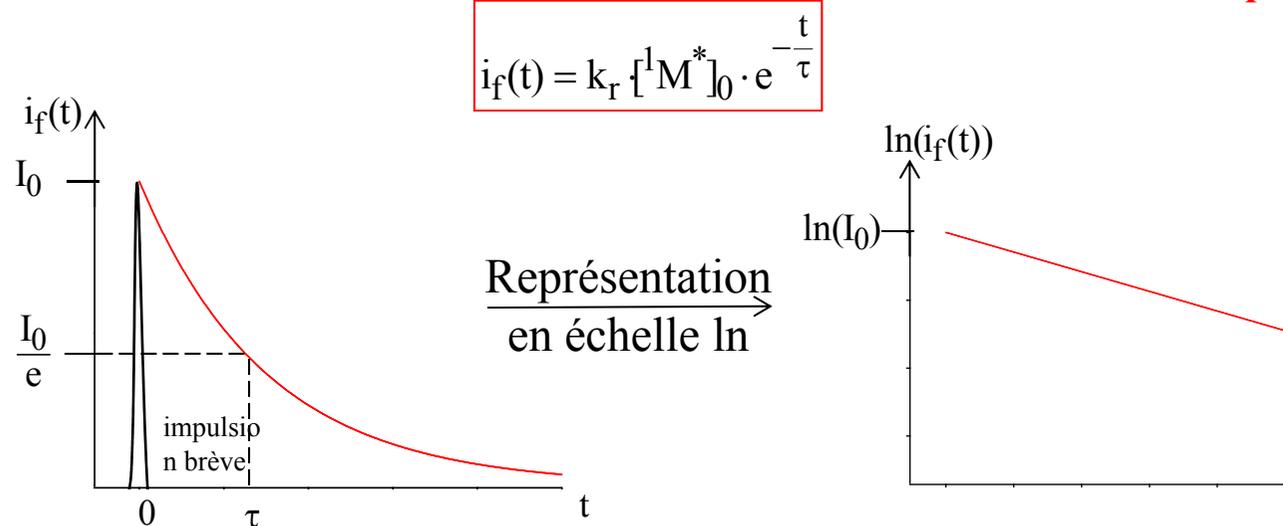
Grandeur mesurée  
expérimentalement



$i_f(t)$  = intensité de fluorescence à l'instant  $t$  après une impulsion brève

$$i_f(t) = k_r [{}^1M^*](t)$$

**Le déclin d'émission de fluorescence décroît selon une loi monoexponentielle**



## Durée de vie et Rendement quantique

### Relations entre durée de vie et rendement quantique

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \qquad \Phi_F = \frac{N_{\text{émis}}}{N_{\text{abs}}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau = \frac{\tau}{\tau_r}$$

$$\int_0^{\infty} i_F(t) dt = \frac{1}{\tau_r} [^1M^*]_0 \tau \quad \Rightarrow \quad \Phi_F = \frac{\tau}{\tau_r} = \frac{1}{[^1M^*]_0} \int_0^{\infty} i_F(t) dt$$

⇒ Le rendement quantique est proportionnelle à l'intégrale du déclin d'émission de fluorescence

## Durée de vie et Rendement quantique

### ✚ Durée de vie radiative

$$\tau_f = \frac{1}{k_r} \quad \text{Durée de vie radiative}$$

(=Durée de vie max d'un fluorophore)

✓ *Estimation de  $k_r$  à partir des spectres d'absorption et d'émission :*

$$k_r = \frac{1}{\tau_f} = 2,88 \cdot 10^{-9} \cdot n^2 \cdot \frac{\int F_{\bar{\nu}}(\bar{\nu}_F) \cdot d\bar{\nu}_F}{\int \bar{\nu}_F^{-3} \cdot F_{\bar{\nu}}(\bar{\nu}_F) \cdot d\bar{\nu}_F} \cdot \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu}_A) \cdot d\bar{\nu}_A}{\bar{\nu}_A} \quad \text{Relation de Strickler et Berg}$$

$F_{\bar{\nu}}(\bar{\nu}_F)$  : Intensité de fluorescence par unité de nombre d'onde

✓ *Estimation de  $k_r$  à partir du rendement quantique et de la durée de vie :*

$$k_r = \frac{\tau}{\Phi_F}$$

# *Sommaire*

## *I. Emission de fluorescence : généralités*

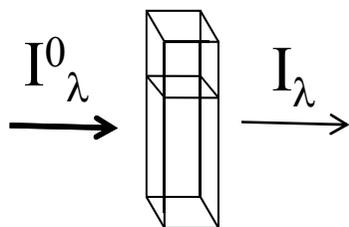
- ✓ **Diagramme Perrin-Jablonski**
- ✓ **Durée de vie et rendement quantique**
- ✓ **Spectroscopie stationnaire**
  - ✓ **Instruments**
  - ✓ **Dépendance de l'intensité de fluorescence avec la concentration**
  - ✓ **Spectres d'émission et d'excitation**
  - ✓ **Détermination expérimentale du rendement quantique**
- ✓ **Influence de divers paramètres physico-chimiques**
  - ✓ **Concentration : effet de filtre interne**
  - ✓ **Température**
  - ✓ **pH**
  - ✓ **Solvant-polarité**

## *II. Processus d'extinction de la fluorescence*

## *III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes*

## Spectroscopie stationnaire

### ✚ Instruments : absorption



$$A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}}$$

A : absorbance

$I_{\lambda}^0$  : intensité incidente

$I_{\lambda}$  : intensité transmise

Loi de Beer-Lambert

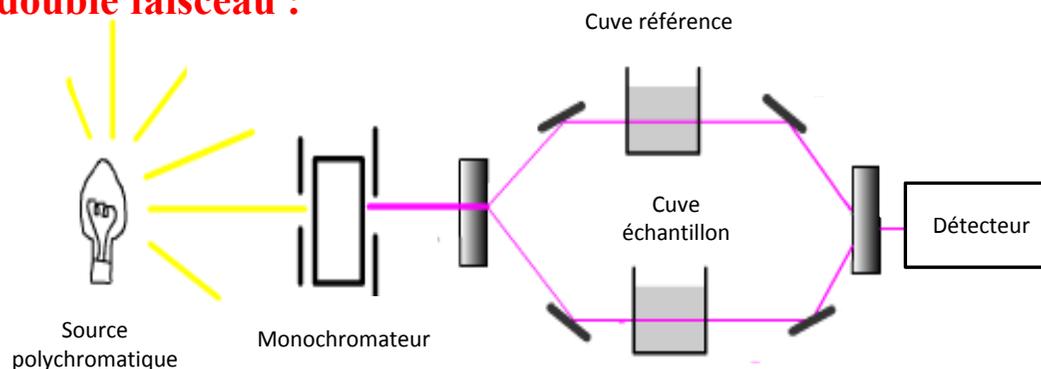
$$A(\lambda) = \varepsilon_{\lambda} l c$$

$\varepsilon_{\lambda}$  : coefficient d'absorption molaire en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

Caractéristique intrinsèque de l'espèce absorbante

Doit être défini pour chaque longueur d'onde

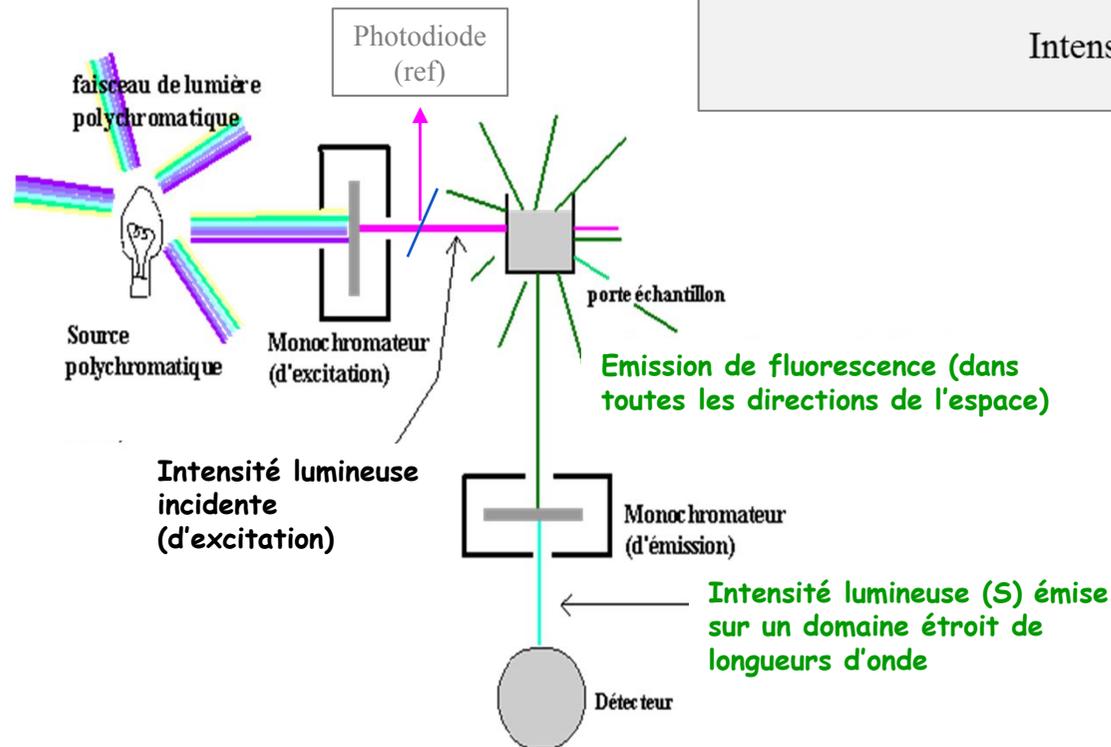
### Spectrophotomètre double faisceau :



## Spectroscopie stationnaire

### ✚ Instruments : émission

#### Spectrofluorimètre :



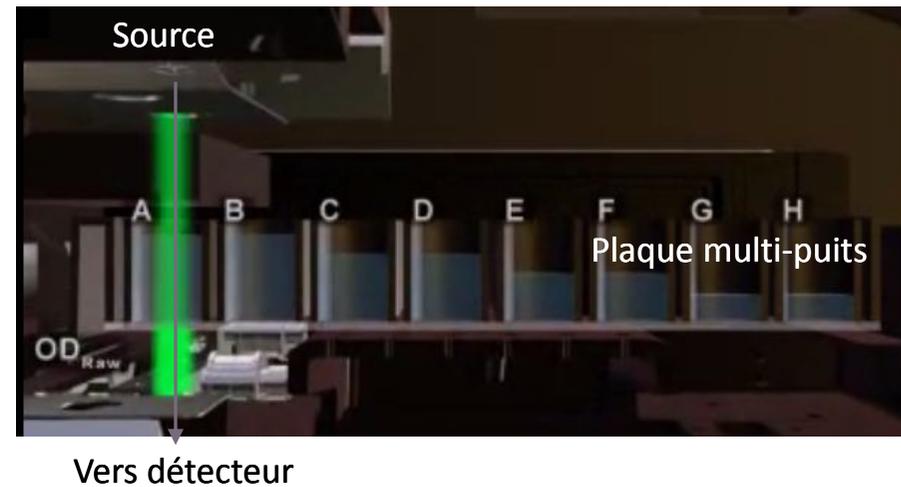
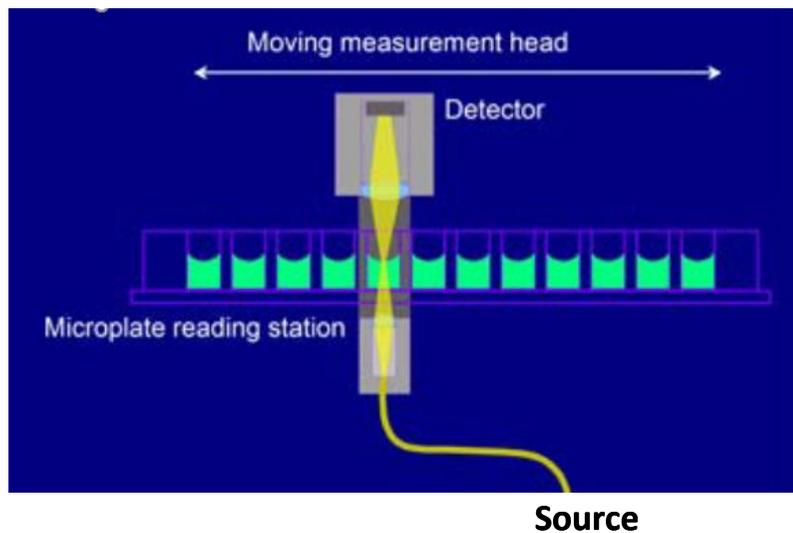
**Collecte de la lumière émise perpendiculairement au faisceau incident**

## Spectroscopie stationnaire

### ✚ Instruments : lecteur de plaques

- ✓ Mesures sur un nombre important d'échantillons
- ✓ Mesures successives de différentes grandeurs physiques (absorbance, intensité de fluorescence, de luminescence, ...) sur un même échantillon

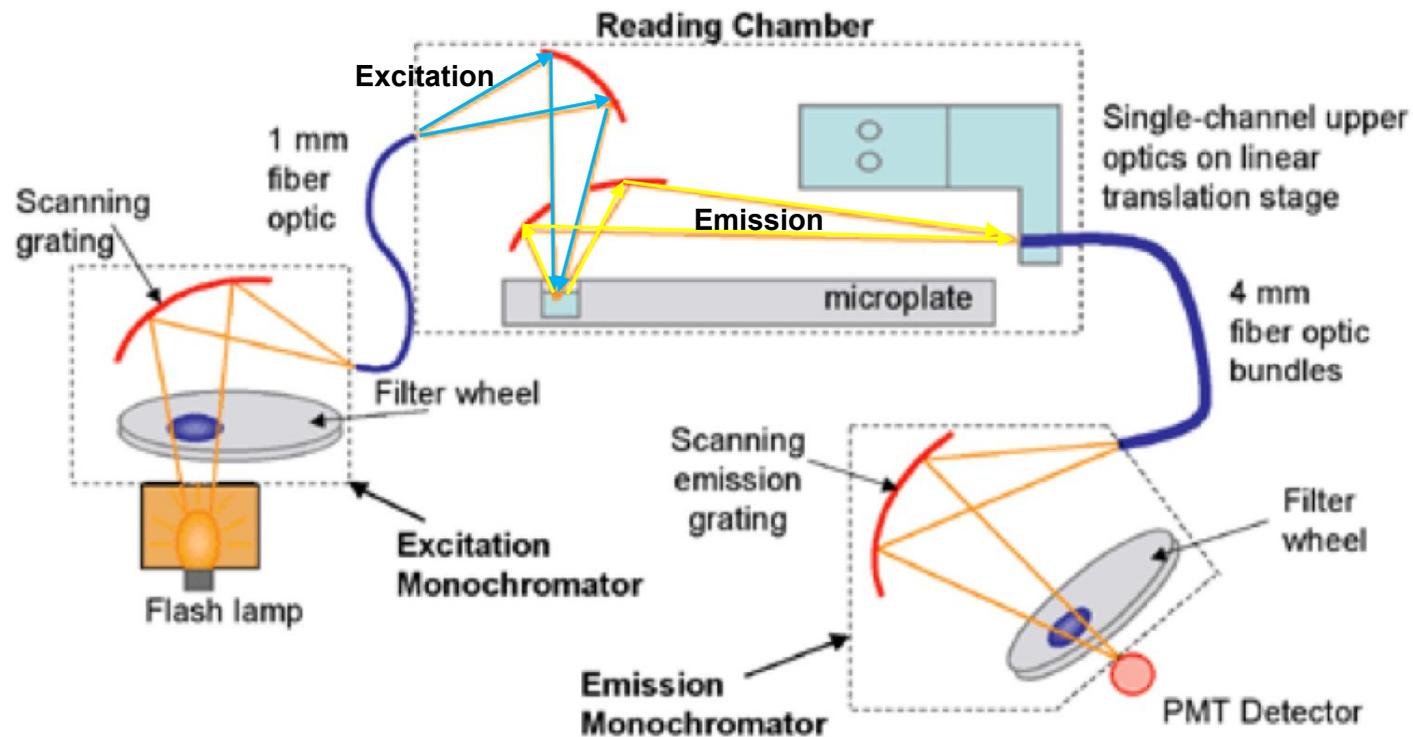
### Absorption : la détection se fait en transmission



## Spectroscopie stationnaire

### ✚ Instruments : lecteur de plaques

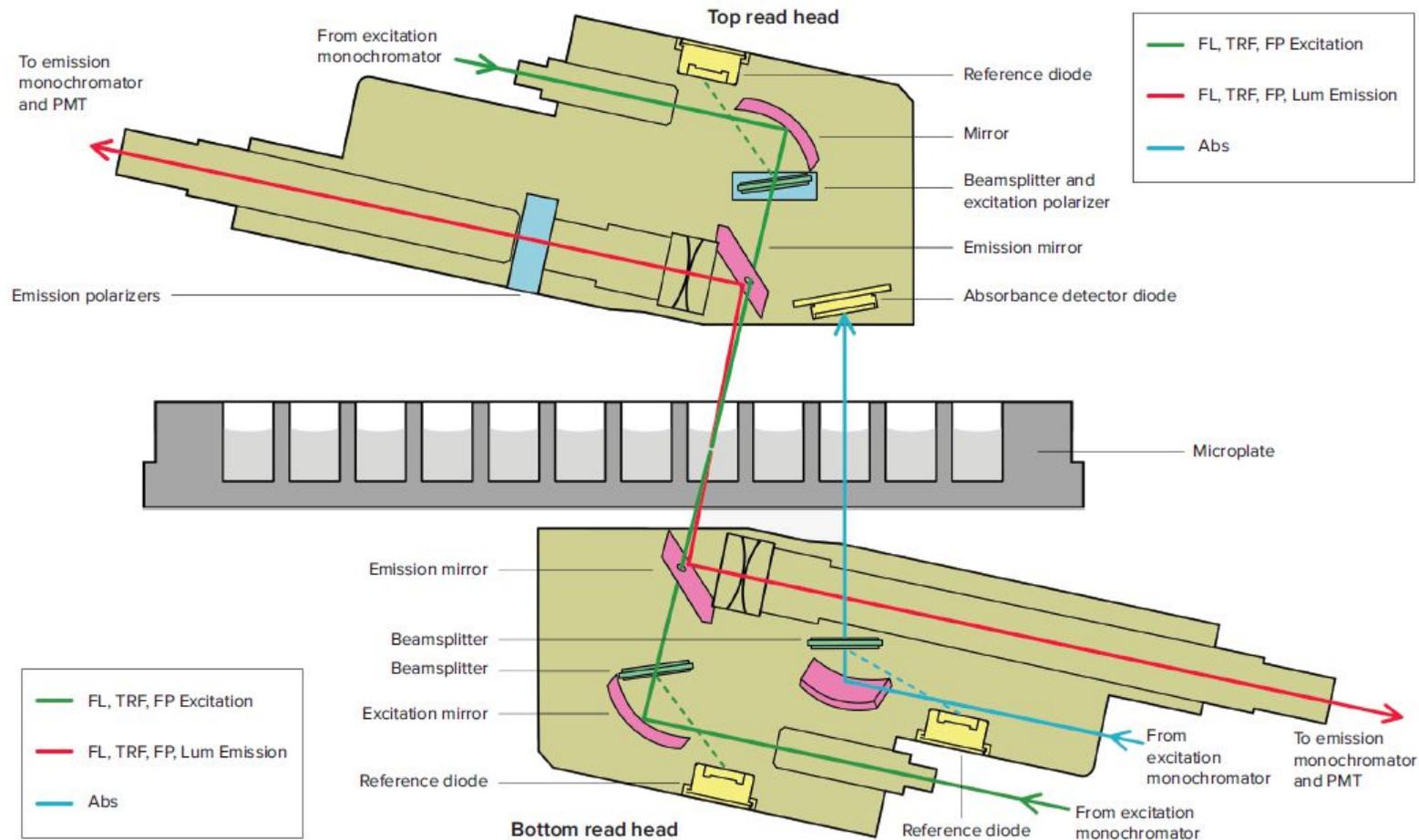
#### Emission : Configuration lecture par le haut



## Spectroscopie stationnaire

### ✚ Instruments : lecteur de plaques

#### Emission : Configuration lecture par le haut/ou par le bas (top read/bottom read)



SpectraMax M3-4-5 : Molecular devices

## Spectroscopie stationnaire

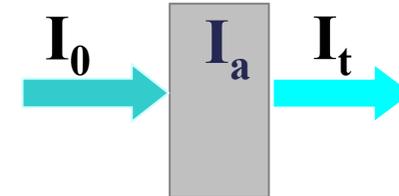
### ⚡ Dépendance de l'intensité de fluorescence avec la concentration

$$\phi = \frac{N_{em}}{N_a} = \frac{I_{em}}{I_a}$$

$$\Rightarrow I_{em} = \phi \cdot (I_0 - I_t) = \phi \cdot I_0 \cdot (1 - (I_t / I_0))$$

$$\Rightarrow I_{em} = \phi \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-A})$$

Absorbance de la solution.



*Dans le cas de solutions très faiblement concentrées tq  $A < 0,05$*

$$\Rightarrow 10^{-A} = 1 - A \cdot \ln 10 = 1 - \varepsilon \cdot C \cdot \ell \cdot \ln 10$$

$$I_{em} = \phi \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot C \cdot \ell \cdot \ln 10$$

→  $I_{em} = f(C)$  : variation linéaire

*Expérimentalement, on mesure une intensité de fluorescence à  $\lambda_{em}$  suite à une excitation à  $\lambda_{exc}$  :*

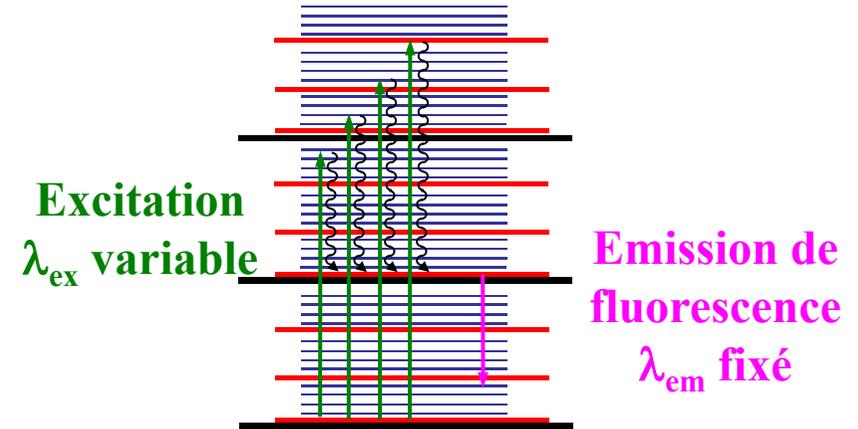
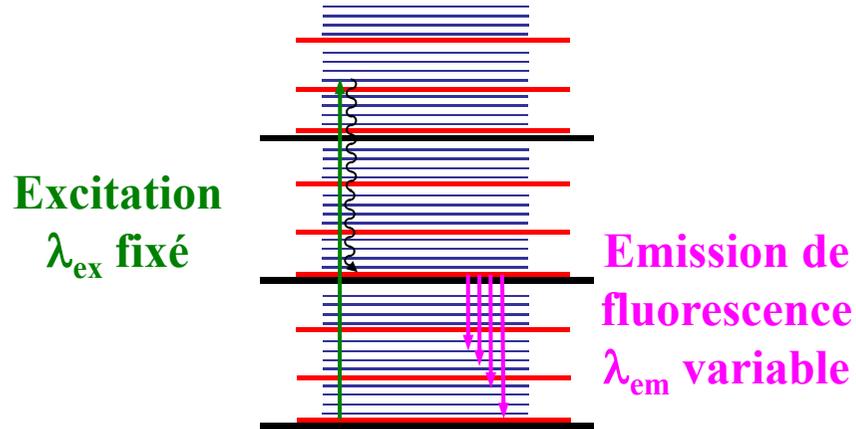
$$I_F(\lambda_{exc}, \lambda_{em}) = k \cdot I_0(\lambda_{exc}) \cdot F(\lambda_{em}) \cdot 2,3 \cdot \varepsilon(\lambda_{exc}) \cdot C \cdot \ell$$

↓  
Cste dépendant de l'instrument

↓  
Proba d'émission de fluorescence à  $\lambda_{em}$

Spectroscopie stationnaire

✚ Spectres d'émission et d'excitation

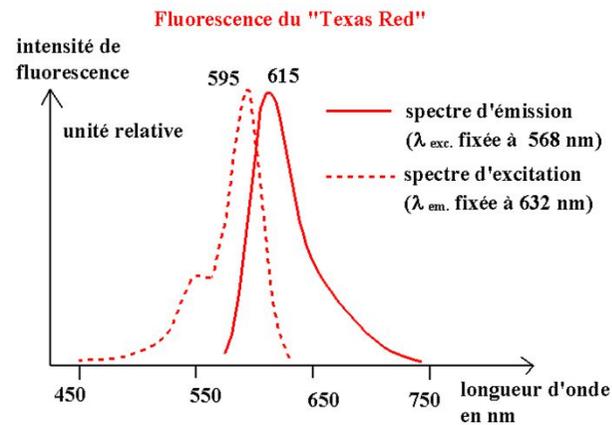


**Spectre d'émission :**  $\lambda_{ex} = \text{cste}$   
 $\lambda_{em}$  variable.

$$I_F(\lambda_{em}) = k'' \cdot F(\lambda_{em})$$

**Spectre d'excitation :**  $\lambda_{ex}$  variable  
 $\lambda_{em} = \text{cste}$

$$I_F(\lambda_{exc}) = k' \cdot I_0(\lambda_{exc}) \cdot \varepsilon(\lambda_{exc}) \cdot l \cdot C$$



## Spectroscopie stationnaire

### ✚ Détermination expérimentale du rendement quantique

$$I_F(\lambda_{exc}, \lambda_{em}) = k \cdot I_0(\lambda_{exc}) \cdot F(\lambda_{em}) \cdot 2,3 \cdot \varepsilon(\lambda_{exc}) \cdot C \cdot \ell$$

↓  
Proba d'émission de fluorescence à  $\lambda_{em}$

$$\Phi_F = \int_{\text{spectre émission}} F(\lambda_{em}) \cdot d\lambda_{em} \quad \text{Proba d'émission de fluorescence quelle que soit } \lambda_{em}$$

### Protocole :

- Prendre une molécule de  $\Phi_{F,ref}$  connu comme référence. Ses spectres d'abs et d'ém. doivent être proches de ceux de la molécule étudiée
- Les concentrations des 2 molécules doivent être proches et  $tq < 0,05$  à  $\lambda_{exc}$
- Enregistrer les spectres d'absorption et d'émission des 2 composés fluorescents dans les mêmes conditions expérimentales de température, de  $\lambda_{exc}$ , d'intensité de la lampe incidente

$$\Phi_F = \Phi_{F,ref} \cdot \frac{\int_{\text{spectre}} I_{em} \cdot d\lambda_{em}}{\int_{\text{spectre}} I_{em,ref} \cdot d\lambda_{em}} \cdot \frac{1 - 10^{-A_{ref}}}{1 - 10^{-A}} \cdot \frac{n_{ref}^2}{n^2}$$

$n_{ref}$  : indice de réfraction du solvant de la solution de référence

$n$  : indice de réfraction du solvant de l'échantillon

# *Sommaire*

## *I. Emission de fluorescence : généralités*

- ✓ **Diagramme Perrin-Jablonski**
- ✓ **Durée de vie et rendement quantique**
- ✓ **Spectroscopie stationnaire**
  - ✓ **Instruments**
  - ✓ **Dépendance de l'intensité de fluorescence avec la concentration**
  - ✓ **Spectres d'émission et d'excitation**
  - ✓ **Détermination expérimentale du rendement quantique**
- ✓ **Influence de divers paramètres physico-chimiques**
  - ✓ **Concentration : effet de filtre interne**
  - ✓ **Température**
  - ✓ **pH**
  - ✓ **Solvant-polarité**

## *II. Processus d'extinction de la fluorescence*

## *III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes*

## Influence de divers paramètres physico-chimiques

### ✚ Effet de la concentration : effet de filtre interne

- En solution très diluées :



$$I_F(\lambda_{exc}, \lambda_{em}) = k \cdot I_0(\lambda_{exc}) \cdot F(\lambda_{em}) \cdot 2,3 \cdot \epsilon(\lambda_{exc}) \cdot C \cdot \ell$$

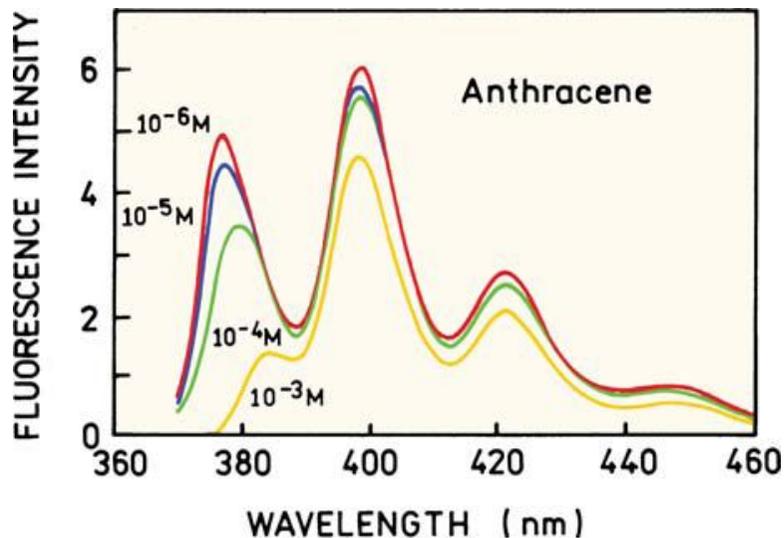
➔ A priori, variation linéaire de  $I_F$  avec  $C$

- Si  $C$  trop élevée :



✓ déviation à la linéarité de la courbe  $I = f(C)$

✓ distorsion du spectre d'émission de fluorescence (pour les fluorophores présentant un recouvrement entre les spectres d'absorption et d'émission)

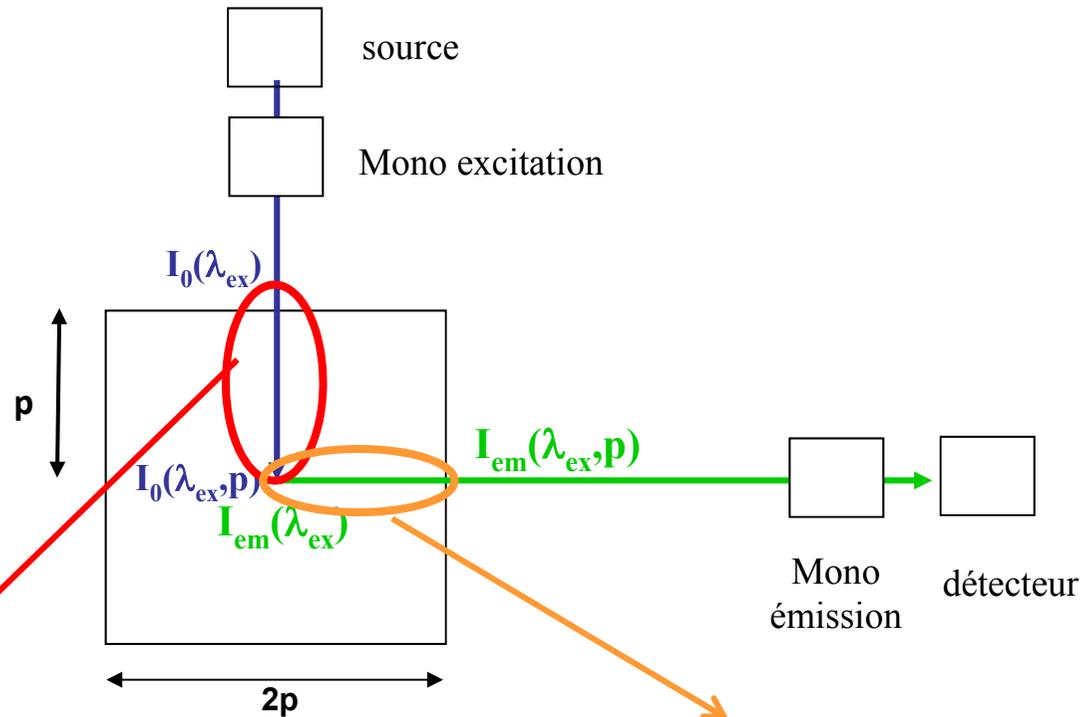


Influence de la concentration en anthracène sur l'allure de son spectre d'émission

J. Lakowicz., 2006, Principles of fluorescence spectroscopy

## Influence de divers paramètres physico-chimiques

### ✚ Effet de la concentration : effet de filtre interne



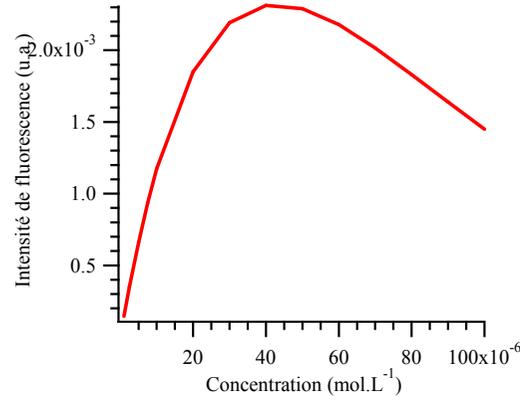
Atténuation du faisceau lumineux incident du fait de l'absorption des molécules se trouvant sur son passage

Réabsorption des photons émis par les fluorophores présent et restés dans leur état fondamental

## Influence de divers paramètres physico-chimiques

### ✚ Conséquences :

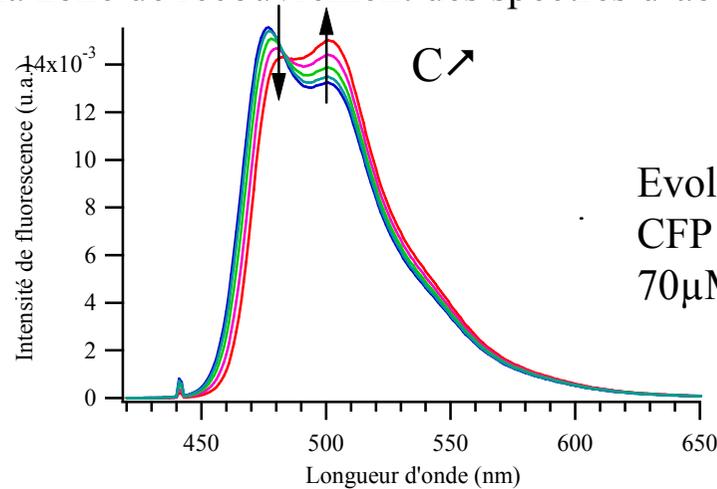
- ✓ déviation à la linéarité de la courbe  $I = f(C)$



Variation de l'intensité de fluorescence de la Cyan Fluorescent Protein (CFP) en fonction de sa concentration

- ✓ Distorsion des spectres d'émission de fluorescence :

Observable sur la zone de recouvrement des spectres d'absorption et d'émission

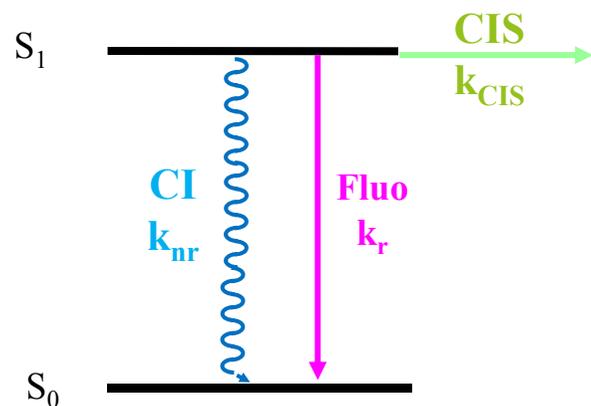


Evolution du spectre de fluorescence de la CFP en fonction de sa concentration (1 à 70 μM)

## Influence de divers paramètres physico-chimiques

### ✚ Température

La température favorise les processus de désactivation non radiatifs induites par les collisions des fluorophores avec les molécules de solvant (quenching dynamique)



$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad \tau_F = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

Si  $T \nearrow \Rightarrow k_{nr} \nearrow$   
 $\Rightarrow \Phi_F \searrow ; \tau_F \searrow$  et  $I_{em} \searrow$

Rem : On constate souvent une relation empirique entre  $T$  et  $\Phi_F$  ou  $\tau_F$  supposant une dépendance de type Arrhenius pour  $k_{nr}$

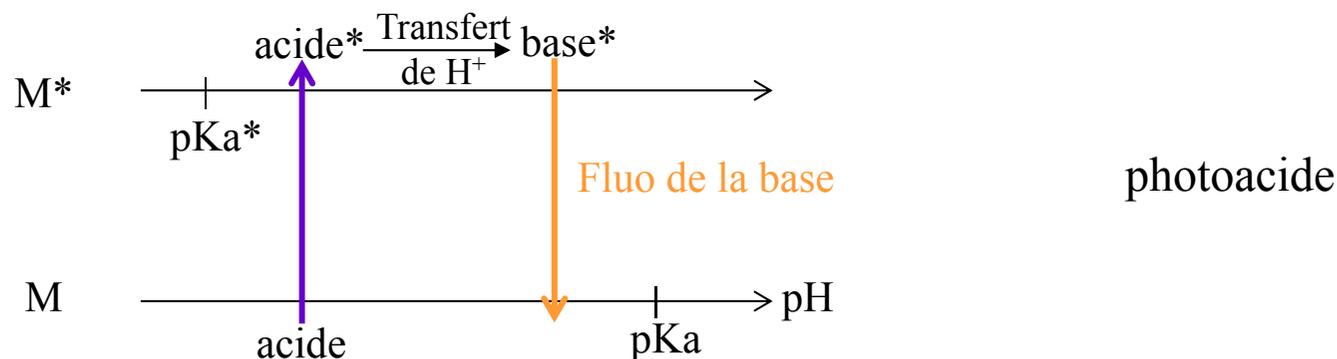
$$k_{nr} = A \cdot e^{-\frac{E_a}{kT}}$$

## Influence de divers paramètres physico-chimiques

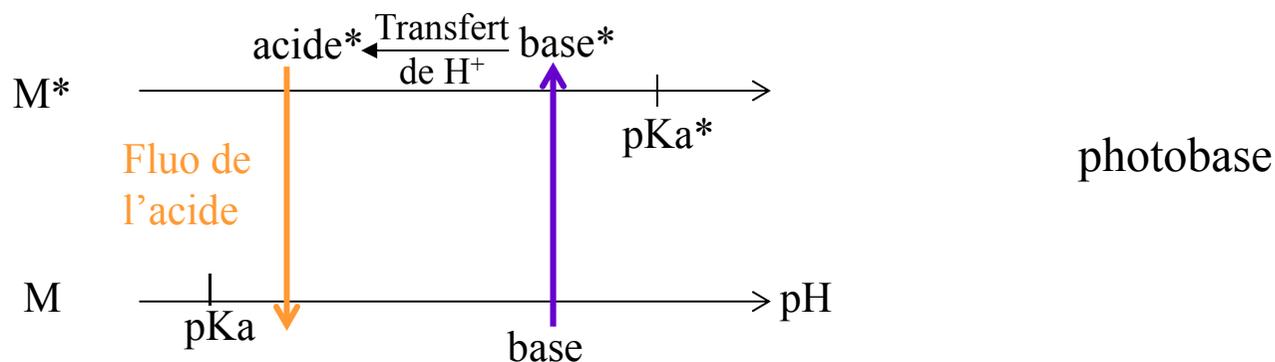
### ✚ pH

Les propriétés acido-basiques des molécules peuvent être différentes à l'état fondamental et à l'état excité ( $pK_a^* \neq pK_a$ )  $\Rightarrow$  **transfert de protons suite à l'excitation possible**

- ✓ **Acide plus fort à l'état excité qu'à l'état fondamental ( $pK_a^* < pK_a$ )**



- ✓ **Acide moins fort à l'état excité qu'à l'état fondamental ( $pK_a^* > pK_a$ )**



## Influence de divers paramètres physico-chimiques

### ✚ Csqce : Effet sur les spectres d'absorption et d'émission

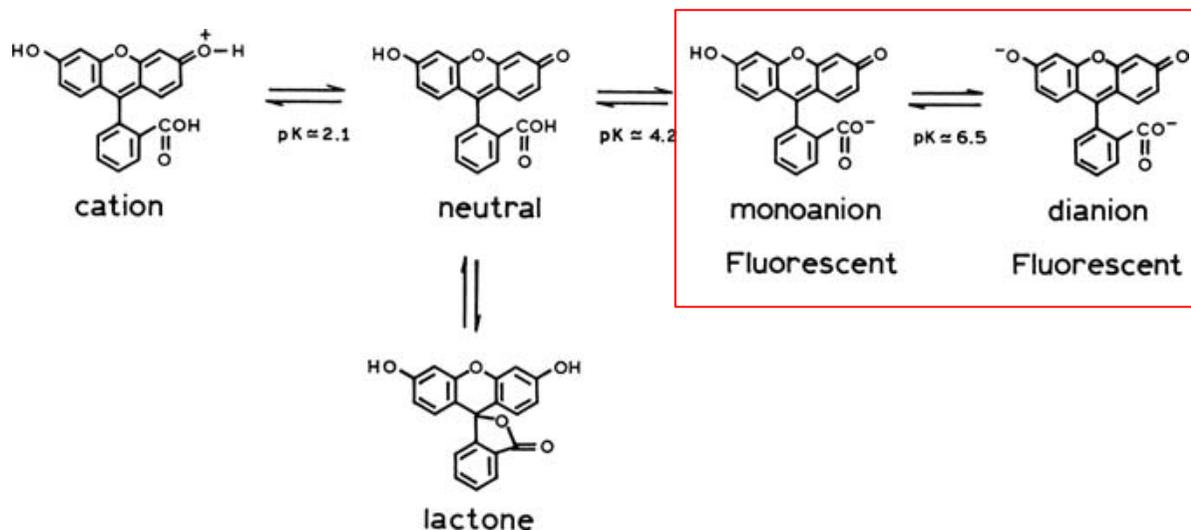
Protonation ou déprotonation de groupes fonctionnels sur une molécule  $\Rightarrow$  modification

- ✓ du rendement quantique
- ✓ de la forme des spectres d'absorption et/ou d'émission

*mis à profit pour l'élaboration de sondes de pH*

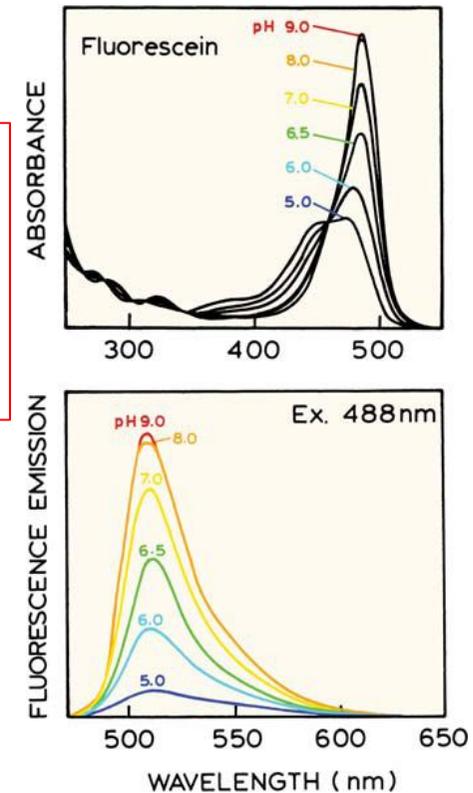
Ex : Fluorescéine = la première sonde de pH

Sonde ratiométrique en excitation (excit à 450 nm et 495 nm)



Inconv : faibles changements de son spectre d'émission

J. Lakowicz., 2006, Principles of fluorescence spectroscopy

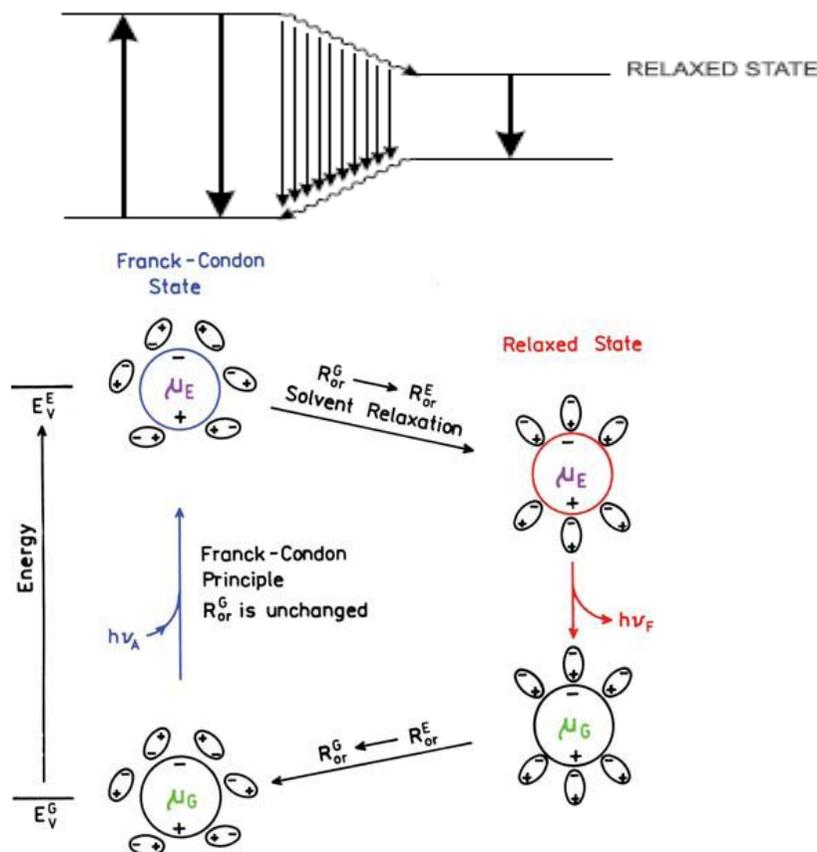


## Influence de divers paramètres physico-chimiques

### ✚ Solvant

Suite à une redistribution des électrons lors de l'excitation, de nombreux fluorophores possèdent un moment dipolaire différent entre l'état fondamental  $\mu_g$  et l'état excité  $\mu_e$ .

⇒ Modification des propriétés spectrales et cinétiques



- Etat fond = la cavité de solvant est organisée autour du moment dipolaire  $\mu_g$ ; Energie du système minimale

- Absorption d'un photon  $\Rightarrow$  redistribution des e- quasi-instantanée ( $10^{-15}$  s)  $\Rightarrow$  modification de  $\mu$  :  $\mu_g \Rightarrow \mu_e$ .

- Relaxation du solvant  $\Rightarrow$  minimisation de l'énergie du système à l'état excité

- Pendant ou après cette relaxation : émission de fluo vers un état fond non relaxé

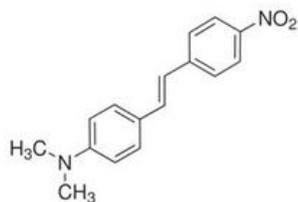
***Relaxation du solvant dép.de la viscosité du solvant.  
Si solvants fluides tq l'eau, relaxation = très rapide***

## Influence de divers paramètres physico-chimiques

### ✚ Solvant : Remarques et conséquences

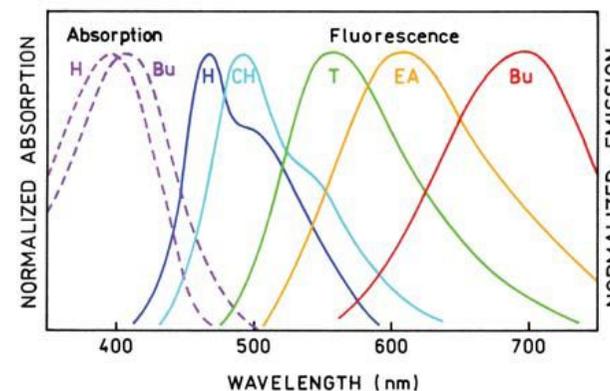
- *Déplacement bathochrome des spectres*
- *Relaxation du solvant dép. de la viscosité du solvant. Si solvants fluides tq l'eau, relaxation = très rapide, terminée avant émission.*
- *Plus la polarité du solvant est grande, plus l'état relaxé sera de faible énergie, plus le déplacement vers le rouge du spectre d'émission sera important.*
- *Le déplacement est d'autant plus important que  $\mu_g \neq \mu_e$*

Ex : Photographie et spectre d'émission du DNS dans des solvants de polarité croissante : H, hexane; CH, cyclohexane; T, toluene; EA, ethyl acetate; Bu, n-butanol



4-diméthylamino-4'-nitrostilbene (DNS)

J. Lakowicz., 2006, Principles of fluorescence spectroscopy



## Influence de divers paramètres physico-chimiques

Si pas d'interaction intermoléculaire à l'état fondamental et à l'état excité

### + Longueur d'onde d'excitation et d'émission

- Allure des spectres d'émission, d'excitation
  - $\Phi_F$
  - $\tau$
- } Indep de  $\lambda_{em}$  et de  $\lambda_{exc}$

### + Concentration en fluorophore

$$I_{em} = f(C)$$

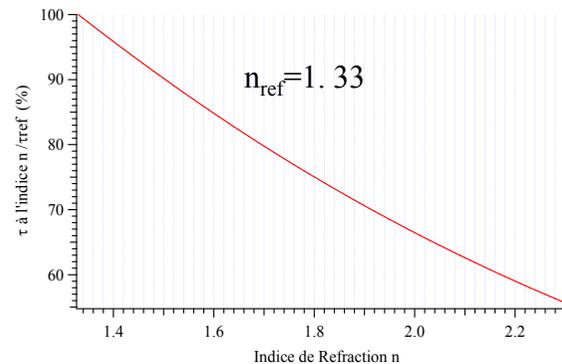
$\tau$  indépendant de C

### + Indice de réfraction du milieu

$$k_r = \frac{1}{\tau_f} \propto n^2$$

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \propto n^{-2}$$

D'après la relation de Strickler et Berg



## Influence de divers paramètres physico-chimiques

### ⚡ Température

$$\begin{aligned} \text{Si } T \nearrow & \Rightarrow k_{nr} \nearrow \\ & \Rightarrow \tau \searrow, \Phi_F \searrow \text{ et } I_{em} \searrow \end{aligned}$$

Rem : On constate souvent une relation empirique entre T et  $\Phi_F$  ou  $\tau$  supposant une dépendance de type Arrhenius pour  $k_{nr}$

$$k_{nr} = A \cdot e^{-\frac{E_a}{kT}}$$

### ⚡ Puissance incidente, dose d'irradiation

- **Photoblanchiment**

$$\Rightarrow I_{em} \searrow \text{ et } \tau = \text{constante}$$

- **Génération de photoproduits.**

$$\Rightarrow I_{em} \text{ et } \tau \text{ varient}$$

$\Rightarrow$  Génération possible de photoproduits avec des propriétés d'émission propre

### ⚡ Solvant

- Allure des spectres d'émission, d'excitation  
-  $\Phi_F$   
-  $\tau$

} peuvent être modifiés

# *Sommaire*

## *I. Emission de fluorescence : généralités*

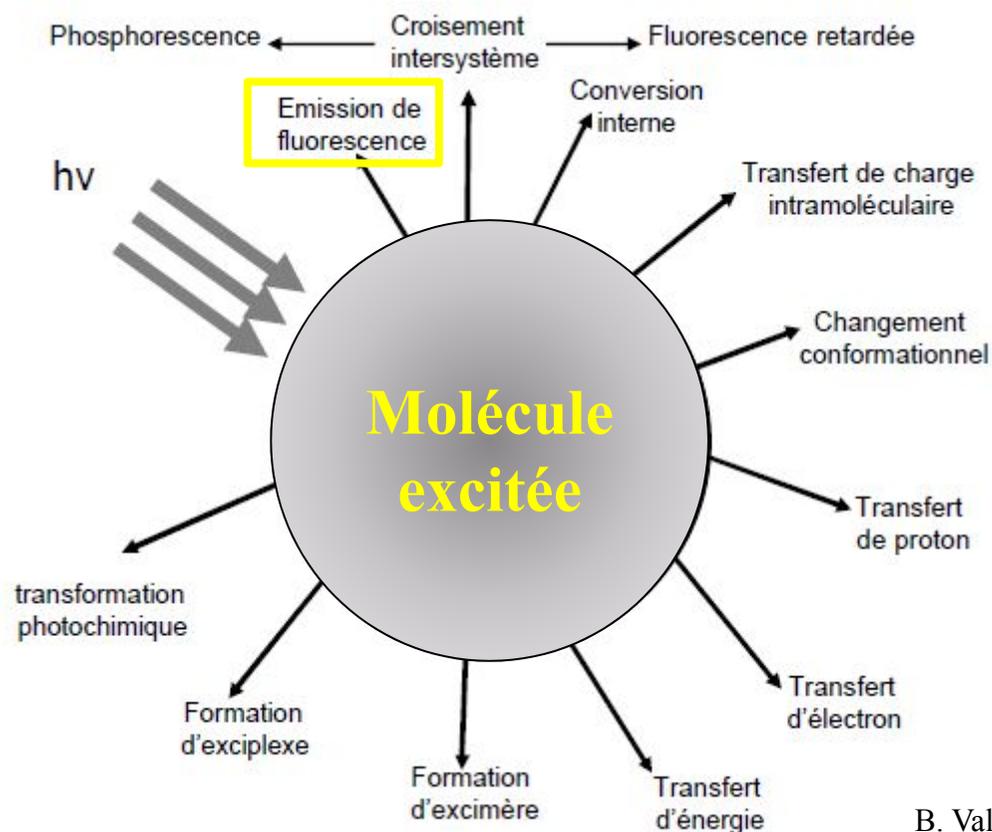
## *II. Processus d'extinction de la fluorescence*

- ✓ **Généralités**
- ✓ **Transfert d'énergie de type Förster (FRET)**
  - ✓ **Généralités**
  - ✓ **Vitesse de transfert d'énergie**
  - ✓ **Efficacité E de transfert d'énergie**
  - ✓ **Estimation expérimentale de E**

## *III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes*

### ✚ Généralités

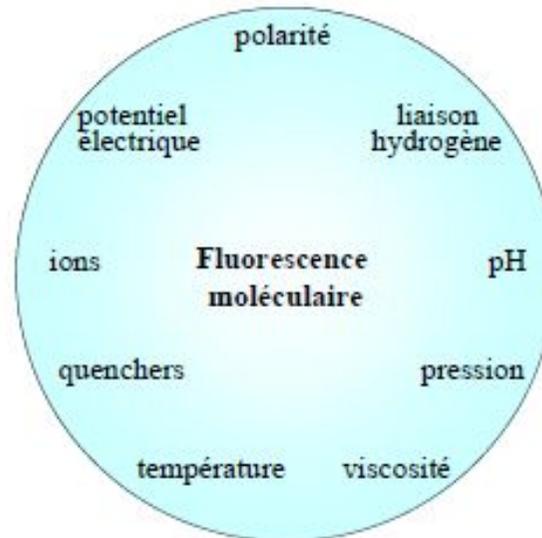
**Les diverses voies de désactivation d'une molécule suite à son excitation :**  
les divers processus sont tous en compétition et en particulier avec l'émission de fluorescence ( $\Sigma$  des probas de chaque processus = 1)



B. Valeur ., 2004, Invit. à la fluo molec.

### + Généralités

Ces diverses voies peuvent résulter de modification de paramètres physico-chimiques liés à l'environnement du fluorophore :



B. Valeur ., 2004, Invit. à la fluo molec.

➔ **Perturbation des propriétés photophysiques du fluorophore :**

Spectres

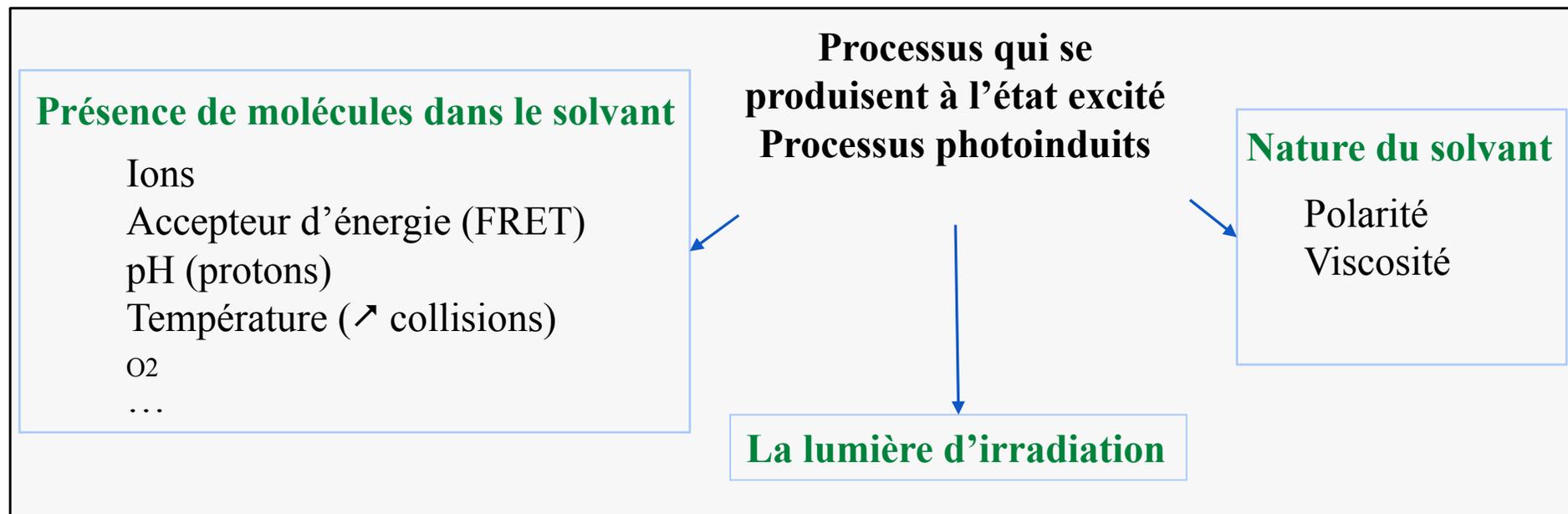
Rdt quantique fluo  $\Phi_F$

Durée de vie de fluo  $\tau_F$

*Si échelle de temps des processus  $\approx \tau_F$*

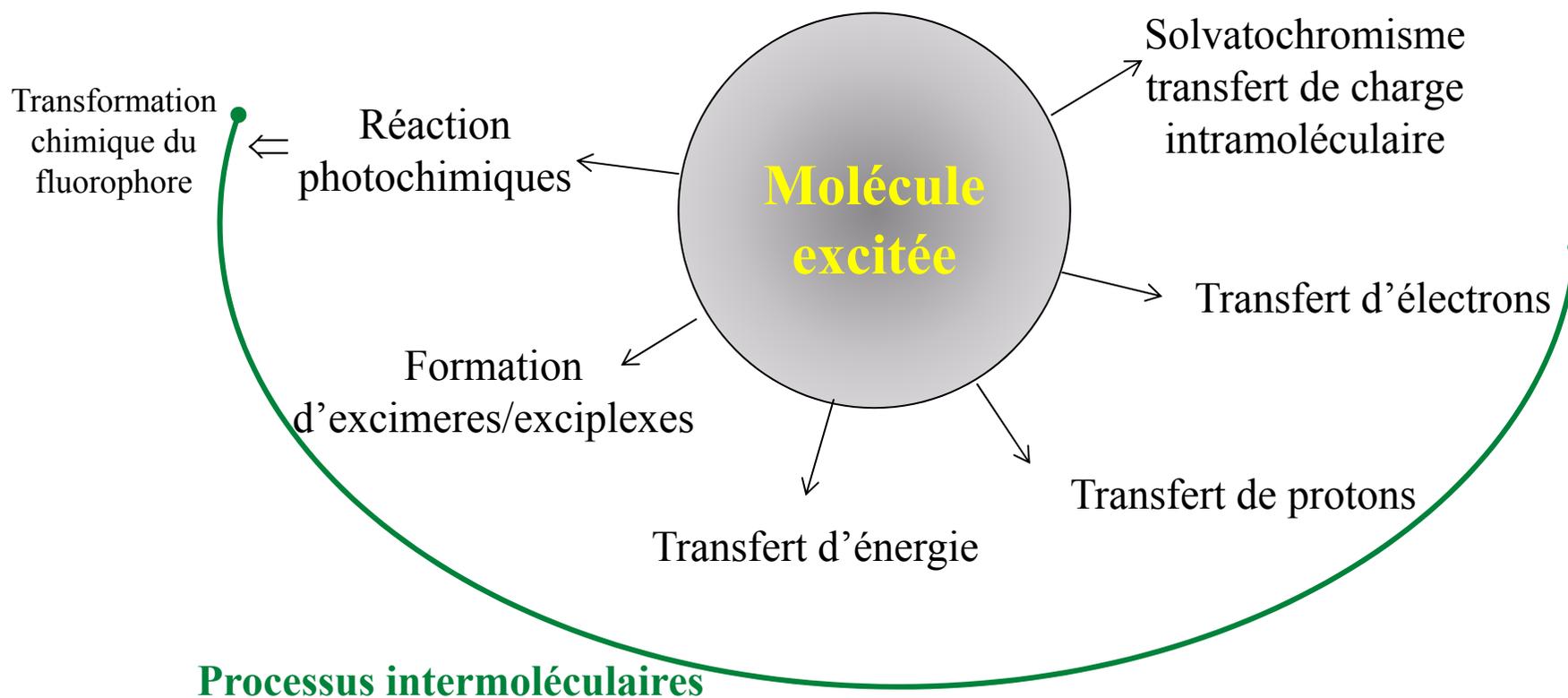
### + Généralités

Les perturbations des propriétés photophysiques d'une molécule peuvent être dues à



### ✚ Généralités

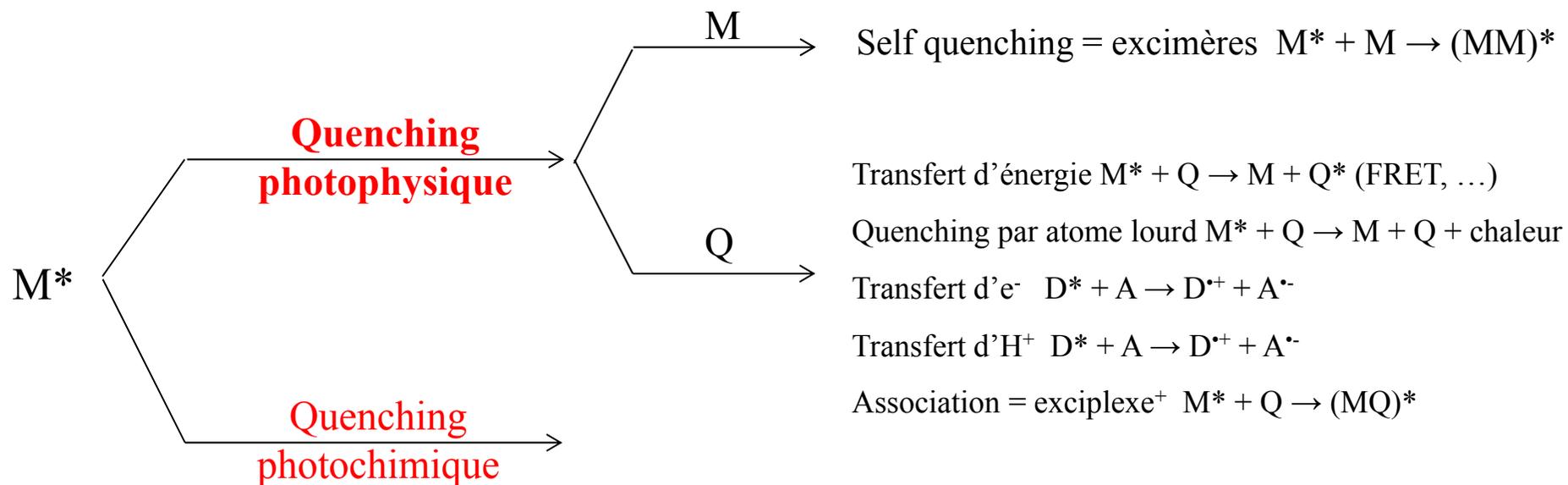
Le solvant ou la présence de molécule dans le solvant peut induire des **processus photoinduits** (autre que émission de fluorescence)



## II. Processus d'extinction de la fluorescence

### ✚ Mécanisme des processus photoinduits :

- **Terminologie** : indep. de la nature du processus photoinduit
  - Perte d'intensité de fluo due à la présence de Q = extinction ou inhibition de la fluorescence (ou quenching de la fluorescence)
  - Q = inhibiteur ou quenchneur
  - $k_q$  = constante de vitesse bimoléculaire
- **Diagramme des différents mécanismes photoinduits** :



### ✚ Mécanisme des processus photoinduits :

L'efficacité de l'extinction de  $M^*$  par Q dépend de :

- ✓ mécanisme d'interaction entre  $M^*$  et Q
- ✓  $[Q]$

L'interaction entre  $M^*$  et Q dépend de :

- ✓ la distance relative entre  $M^*$  et Q
- ✓ la diffusion relative entre  $M^*$  et Q

### 2 types de mécanisme de quenching

#### Inhibition statique

Q se trouve dans un volume « actif » tq extinction instantanée  
⇒ Pas nécessité de diffusion pdt  $\tau_F$   
⇒ l'extinction de fluo ne dépend pas de la viscosité.

#### Inhibition dynamique

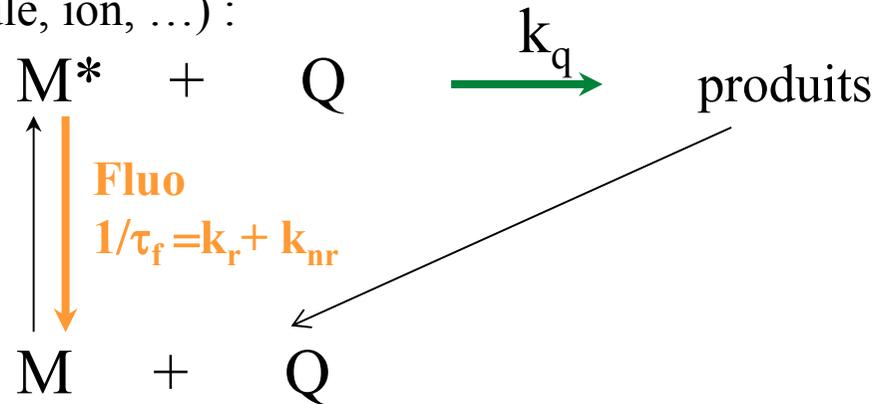
Aucune molécule Q ne se trouve dans le volume actif, mais possibilité d'y pénétrer par diffusion pdt  $\tau_F$   
⇒ l'efficacité de l'extinction va dépendre de la vitesse de diffusion relative de  $M^*$  et Q  
⇒ l'extinction de fluo dépend de la viscosité.

## II. Processus d'extinction de la fluorescence

### ✚ Mécanisme des processus photoinduits : *Inhibition Dynamique*

#### Schéma cinétique général des processus photoinduits

Processus photoinduit = Interaction du fluorophore excité,  $M^*$ , avec une molécule Q ( $H^+$ , molécule, ion, ...):



➔ **Processus photoinduit = une voie de désactivation supplémentaire de  $M^*$**

Réduction de la probabilité d'émission de fluo cad  $\Phi_F \searrow$  dc  $\tau_F \searrow$

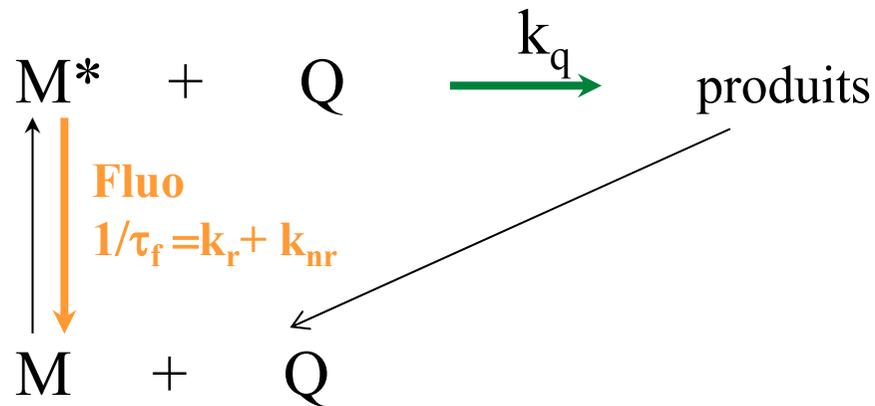
$$\text{En présence de Q : } \Phi_F^Q = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q \cdot [Q]} \quad \tau_F^Q = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_q \cdot [Q]}$$

$$\text{En absence de Q : } \Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad \tau_F = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

➔ **Réduction des deux grandeurs mesurées expérimentalement =  $I_{em}$  et  $\tau_F$**

## II. Processus d'extinction de la fluorescence

### ✚ Mécanisme des processus photoinduits : *Inhibition Dynamique*



$$-\frac{d[M^*]}{dt} = \left\{ \frac{1}{\tau_0} + k_q \cdot [Q] \right\} \cdot [M^*]$$

$$\frac{1}{\tau_0} = k_r + k_{nr} \quad \tau_0 = \text{durée de vie de } M^* \text{ en absence de quencher}$$

$$\rightarrow [M^*](t) = [M^*]_0 \cdot e^{-\left(\frac{1}{\tau_0} + k_q \cdot [Q]\right) \cdot t}$$

### ✚ Le déclin d'émission $i(t)$ et la durée de vie en présence de quencher

$$i(t) = k_r \cdot [M^*](t) = k_r \cdot [M^*]_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$$

$$\tau = \frac{1}{\frac{1}{\tau_0} + k_q \cdot [Q]}$$

**Le déclin d'émission reste monoexponentiel**

**mais de durée de vie réduite**

$$\rightarrow \boxed{\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q]}$$

### ✚ Mécanisme des processus photoinduits : *Inhibition Dynamique*

#### ✚ Rendement quantique en présence de quencher

$$\Phi = \frac{k_r}{\sum_{\text{processus}} k_i} = \frac{k_r}{1/\tau_0 + k_q \cdot [Q]}$$

Si  $\Phi_0 = k_r \cdot \tau_0$  = rdt quantique d'émission de fluorescence de M\*  
en absence de quencher

$$\rightarrow \frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q]$$

$$\rightarrow \frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \cdot [Q]$$

**Relation de Stern Volmer**

$K_{SV}$  = Cste de Stern Volmer en L.mol<sup>-1</sup>

## II. Processus d'extinction de la fluorescence

### ✚ Mécanisme des processus photoinduits : *Inhibition Dynamique*

#### ✚ Les différents cas de figures :

- **Le processus de quenching n'est pas limité par la diffusion**  $\Rightarrow k_q < k_{diff}$   
Réaction peu efficace: pas de quenching à chaque rencontre  
Constante de vitesse diffusionnelle

$$\Rightarrow k_q = p \cdot k_{diff}$$

↓  
Probabilité de formation de la paire MQ pdt la durée de vie de  $M^*$  ;  $p \leq 1$

- **Le processus de quenching est limité par la diffusion**  $\Rightarrow k_q = k_{diff}$

$$k_{diff} = 4\pi \cdot N \cdot R_c \cdot D$$
$$N = \frac{N_a}{1000}$$

Distance de contact (cm)

$$R_c = R_M + R_Q$$

#### Relation proposée par Smoluchowski

Coefficient de diffusion mutuelle =  $\Sigma$  coeff de diffusion translationnelle de M et Q

$$D = D_M + D_Q = f(T, R_M, R_D, \eta) \quad \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

↓ **viscosité**

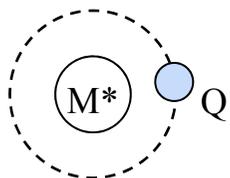
- $k_q > k_{diff}$  La réaction a lieu à distance : cas des réactions de transfert d'énergie (FRET, ...)

## II. Processus d'extinction de la fluorescence

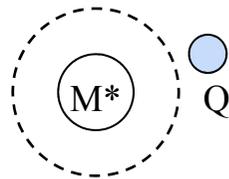
### + Mécanisme des processus photoinduits : *Inhibition Statique*

#### 2 mécanismes possibles

#### Existence d'une sphère d'inhibition



Pas d'émission



Emission

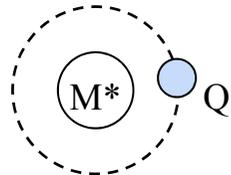
Formation d'un **complexe non fluorescent** à l'état fondamental

## II. Processus d'extinction de la fluorescence

### ✚ Mécanisme des processus photoinduits : *Inhibition Statique*

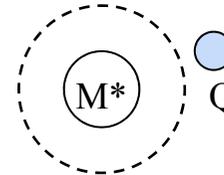
#### ✚ Existence d'une sphère d'inhibition

- **Inhibition totale si Q situé à l'intérieur de la sphère effective** : Proba quenching = 1
- **Pas d'inhibition si Q situé à l'extérieur de la sphère effective** : Proba quenching = 0



Pas d'émission

La fluorescence de ce M n'est pas observée



Emission

La fluorescence de ce M est observée et ses caractéristiques sont non modifiées

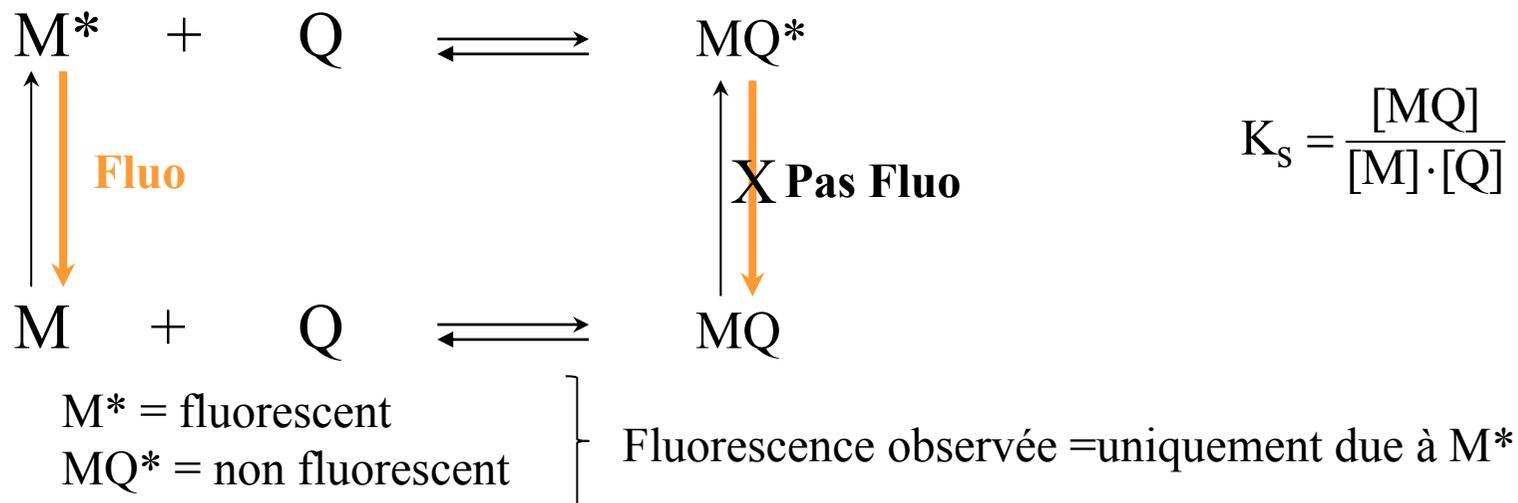
La fluorescence résiduelle observée = due à la fraction de M pour lesquels Q n'est pas dans la sphère lors de leur excitation

➔  $I_{em} \searrow$  et  $\tau$  invariant

## II. Processus d'extinction de la fluorescence

### ✚ Mécanisme des processus photoinduits : *Inhibition Statique*

#### ✚ Formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental



La fluorescence résiduelle observée = due à la fraction de M non impliquée dans un complexe MQ

→  $I_{em} \searrow$  et  $\tau$  invariant

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s \cdot [Q]$$

Linéaire !

# *Sommaire*

## *I. Emission de fluorescence : généralités*

## *II. Processus d'extinction de la fluorescence*

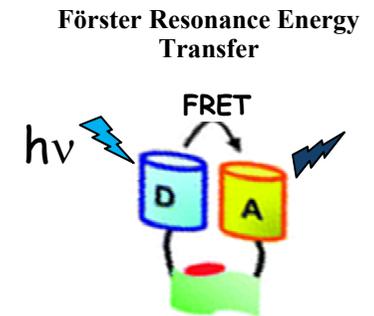
- ✓ **Généralités**
- ✓ **Transfert d'énergie de type FRET**
  - ✓ **Généralités**
  - ✓ **Vitesse de transfert d'énergie**
  - ✓ **Efficacité E de transfert d'énergie**
  - ✓ **Estimation expérimentale de E**

## *III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes*

### Transfert d'énergie de type Förster (FRET : Förster/fluorescence resonance energy transfer)

⇒ informations structurales sur les systèmes moléculaires ou macromoléculaires

Mise à profit d'une modification de la distance entre 1 donneur D et 1 accepteur A suite à des changements structuraux (changement conformationnel, association/dissociation, de réarrangement spatial)



### Nombreuses applications en sciences chimiques et sciences de la vie

- *Capteurs chimiques, biosenseurs*
- *Interaction ligand –récepteur, protéine- protéine, acide nucléique-protéine*
- *Changement conformationnel*
- *Interaction protéine- protéine*
- *organisation des membranes*
- *Effet antenne*
- *Distribution spatiale 2D ou 3D de molécules dans des systèmes organisés*
- ...

B. Valeur ., 2004, Invit. à la fluo molec.

### Transfert d'énergie de type Förster

#### + Généralités

Processus en 1 étape :



Pas de réabsorption par l'accepteur des photons émis par le donneur

- $A \neq D \Rightarrow$  hétérotransfert
- $A = D \Rightarrow$  homotransfert

**Conditions :** recouvrement spectral (au moins partiel) entre le spectre d'émission d'un donneur et le spectre d'absorption d'un accepteur.

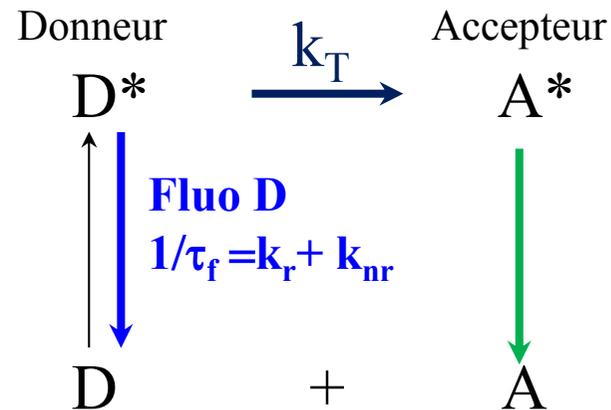
**Remarques :** Probabilité de transfert = f(distance donneur-accepteur)

**Conséquences :** I, rdt quantique et durée de vie du donneur  $\searrow$   
*Si homotransfert, modif du déclin d'anisotropie*

- **Mécanisme de Förster :** Interaction des moments dipolaires de transition (interaction dipôle-dipôle)  $\Rightarrow$  à distance

## Transfert d'énergie de type Förster

### Schéma cinétique du transfert d'énergie d'excitation



➔ **Processus transfert d'énergie = voie de désactivation supplémentaire de  $D^*$**

Réduction de la probabilité d'émission de fluo du donneur D cad  $\Phi_F \searrow$  dc  $\tau_F \searrow$

*Rdt quantique et durée de vie du donneur :*

En présence de A :  $\Phi_F^A = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_T}$   $\tau_F^A = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_T}$

En absence de A :  $\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$   $\tau_F = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$

➔ **Réduction des deux grandeurs mesurées expérimentalement =  $I_{em}$  et  $\tau_F$**

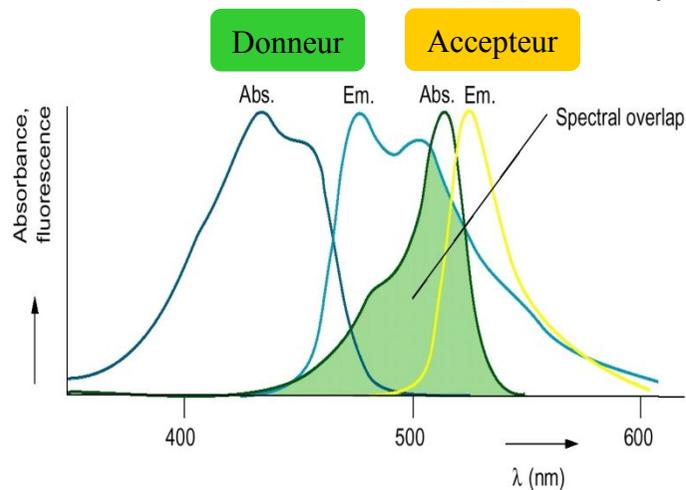
## Transfert d'énergie de type Förster

### Vitesse de transfert d'énergie

$$k_T(r) = \frac{9000 \cdot \ln 10}{128\pi^5 \cdot N_a \cdot n^4} \cdot \frac{\Phi_D^0}{\tau_D^0} \cdot J_{DA} \cdot \kappa_{DA}^2 \cdot \frac{1}{r^6}$$

{ Rdt quantique  
Durée de vie } **Donneur** (points to  $\frac{\Phi_D^0}{\tau_D^0}$ )  
Intégrale de recouvrement (points to  $J_{DA}$ )  
Facteur d'orientation (points to  $\kappa_{DA}^2$ )  
Distance donneur-accepteur (points to  $\frac{1}{r^6}$ )

**Intégrale de recouvrement**  $J_{DA}(\lambda) = \int_0^{\infty} I_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda$



Intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur normalisé à 1 et le spectre d'absorption de l'accepteur.

$$\int_0^{\infty} I_D(\lambda) \cdot d\lambda = 1$$

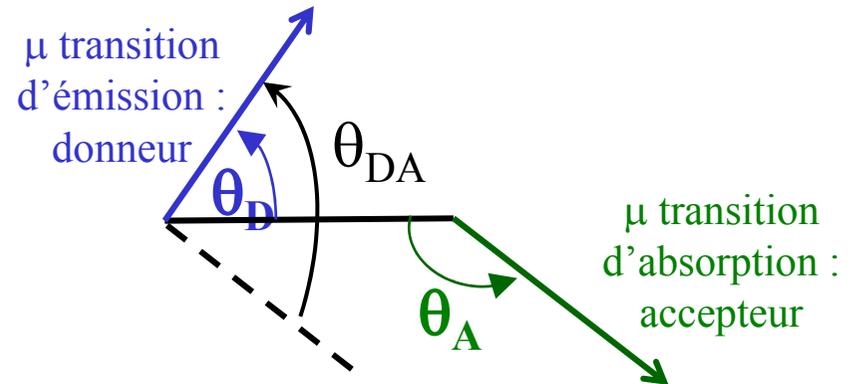
Transfert d'énergie de type Förster

Vitesse de transfert d'énergie

Facteur d'orientation

= f(orientation relative des moments de transition d'absorption et d'émission de A et D)

$$\kappa_{DA}^2 = (\cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cdot \cos \theta_A)^2$$



				Free rotation	Slow rotation
$\kappa^2 :$	4	1	0	$\langle \kappa^2 \rangle = 2/3$	$\langle \kappa^2 \rangle = 0.476$



Pas d'observation de FRET



Pas d'interaction entre D et A

## Transfert d'énergie de type Förster

### ⚡ Vitesse de transfert d'énergie

#### Distance critique de Förster

$$R_0^6 = \frac{9000 \cdot \ln 10}{128\pi^5 \cdot N_a \cdot n^4} \cdot \kappa_{DA}^2 \cdot \Phi_D^0 \cdot \int_0^\infty I_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda$$

Donor	Acceptor	$R_0$ (Å)
Naphthalene	Dansyl	~22
Anthracene	Perylene	~31
Pyrene	Perylene	~36
Phenanthrene	Rhodamine B	~47
Fluorescein	Tetramethylrhodamine	~55
Fluorescein-5-isothiocyanate	Eosin maleimide	~60
Rhodamine 6G	Malachite green	~61
Tryptophan	Dansyl	~21
Tryptophan	ANS	~23
Tryptophan	Anthroyl	~25
Tryptophan	Pyrene	~28

( $R_0 \approx 15 - 60 \text{ \AA}$ )

B. Valeur ., 2002, Molecular Fluorescence.

Couples de Protéines Fluorescentes :  $R_0 \sim 50 - 55 \text{ \AA}$

## Transfert d'énergie de type Förster

### ⚡ Vitesse de transfert d'énergie

#### Distance critique de Förster

$$R_0^6 = \frac{9000 \cdot \ln 10}{128\pi^5 \cdot N_a \cdot n^4} \cdot \kappa_{DA}^2 \cdot \Phi_D^0 \cdot \int_0^\infty I_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda$$

$$\Rightarrow k_T(r) = k_D^0 \cdot \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 = \frac{1}{\tau_D^0} \cdot \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad \text{varie en } 1/r^6$$

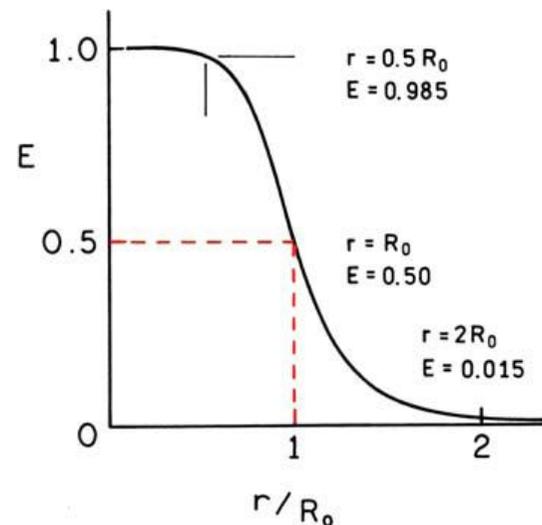
### Transfert d'énergie de type Förster

#### ✚ Efficacité, E, de transfert d'énergie

Efficacité de transfert d'énergie = rendement de transfert d'énergie

Définie par 
$$E = \frac{k_T(r)}{k_r + k_{nr} + k_T(r)} = \frac{k_T(r)}{k_T(r) + 1/\tau_D^0}$$

→ 
$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$
 Forte dépendance de E avec la distance D-A,  
Critique quand  $r \approx R_0$



### Transfert d'énergie de type Förster

#### ✚ Estimation expérimentale de E

##### Estimation expérimentale

- Variation de l'intensité du donneur en présence  $I_{DA}$  et absence  $I_D$  d'accepteur

$$\rightarrow E = 1 - \frac{I_D}{I_{DA}} \qquad E = 1 - \frac{\Phi_D}{\Phi_{DA}}$$

→ Expériences de spectroscopie stationnaire ou d'imagerie d'intensité

- Variation de la durée de vie du donneur en présence  $\tau_{DA}$  et absence  $\tau_D$  d'accepteur

$$\rightarrow E = 1 - \frac{\tau_D}{\tau_{DA}}$$

→ Expérience résolues en temps ou d'imagerie de durée de vie (FLIM)

# *Sommaire*

*I. Emission de fluorescence : généralités*

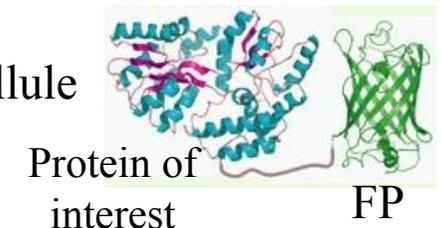
*II. Processus d'extinction de la fluorescence*

*III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes*

## Les protéines fluorescentes

- ✚ Les seuls marqueurs fluorescents codés génétiquement
- ✚ Expression dans divers organismes vivants
  - Procaryotes
  - Eucaryotes (animaux, plantes, ...)
- ✚ Spontanément fluorescente sans nécessité de cofacteur (sauf O<sub>2</sub>)
- ✚ Construction par génie génétique de fusions protéine hôte-FP

➔ Expression dans des organelles spécifiques de la cellule



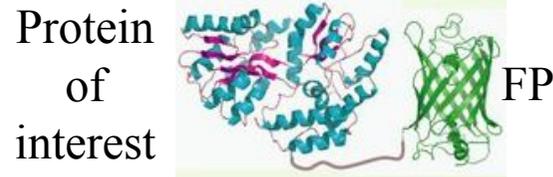
- ✚ Panel de Protéines Fluorescentes (PFs)

propriétés spectrales : la totalité du Visible est couverte !

propriétés photophysiques, physico-chimiques, biochimiques variées

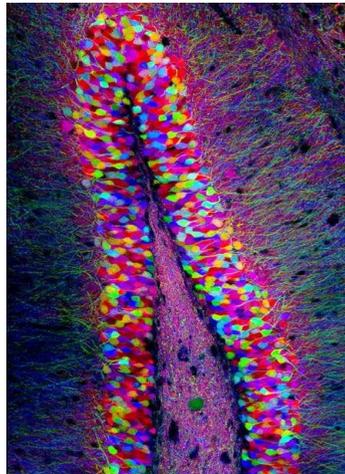
- ➔ Diversité des applications
- ➔ Diversité des techniques d'imagerie de fluorescence

Les PFs : des outils versatiles pour l'étude de systèmes biologiques de la cellule à l'organisme entier



- ✓ **Expression**
- ✓ **Localisation ou colocalisation** (Microscopies confocale, super résolution + PF photocommutable, ...)
- ✓ **Dynamique** (FRAP, FLIP, Optical Highlighter, ...)
- ✓ **Interactions** (FRET, BiFC, ...)

des protéines

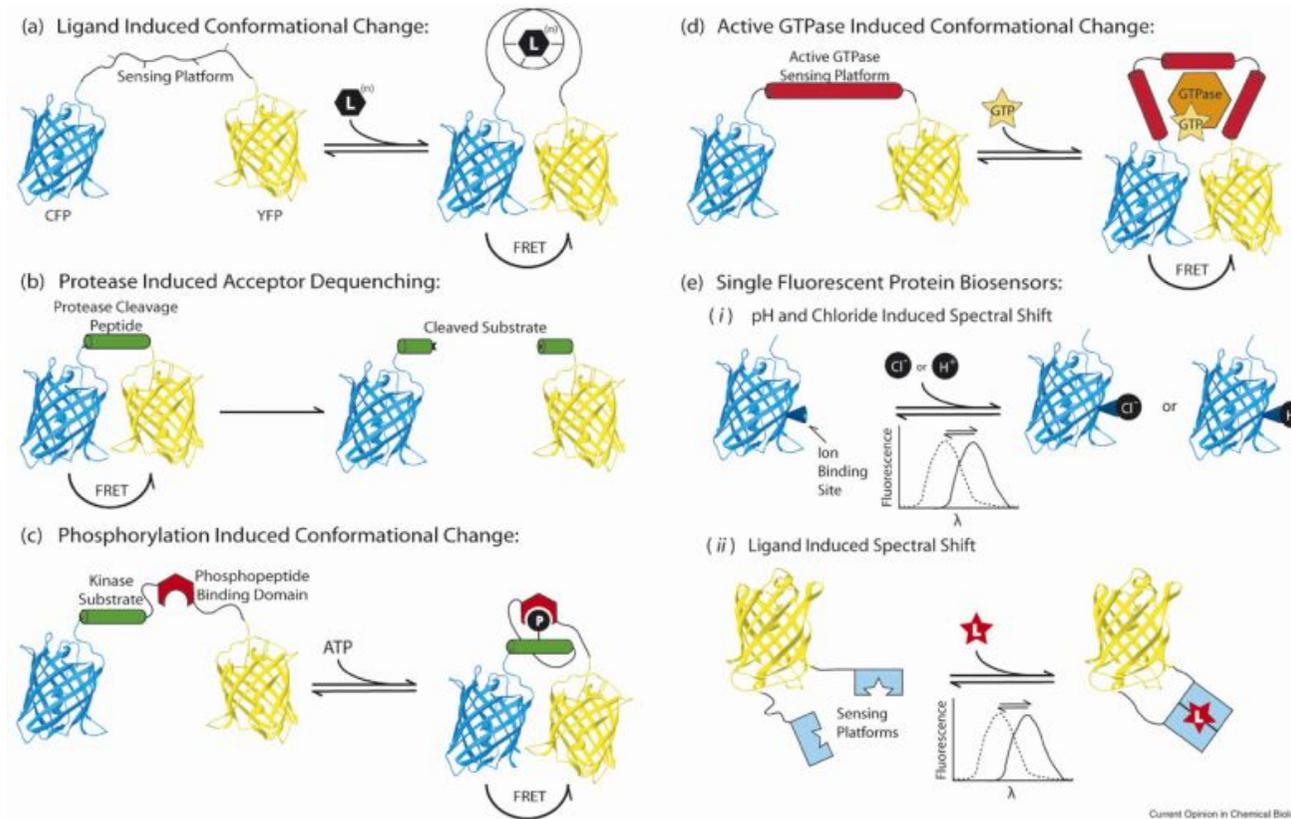


Brainbow mice  
Livet et al., 2007 *Nature*

Coupe de cerveau de souris, neurones exprimant FPs de couleur aléatoire  
=> Visualisation des neurones séparément

### III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes

## Les PFs : des outils versatiles pour l'étude de systèmes biologiques de la cellule à l'organisme entier



✓ Paramètres intracellulaires (pH, ...)

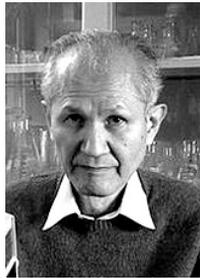
✓ Concentration intracellulaire (seconds messagers, métabolites, ...)

✓ Mesure activité enzymatique, ...

Biosenseurs  
codés  
génétiquement

### III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes

#### Historique : les étapes clés de la révolution des PFs



#### Osamu Shimomura

1961 : Découverte de la GFPav

1979 : Structure chimique du chromophore de la GFPav



#### Douglas Prasher

1987 : GFP= traceur fluorescent de protéines ?

1992 : clonage de la GFPav



#### Martin Chalfie

1988 : GFP= traceur fluorescent de protéines ?

1994 : expression de la GFPav dans *E. Coli* et *C. Elegans*

➔ GFP= marqueur génétique fluorescent



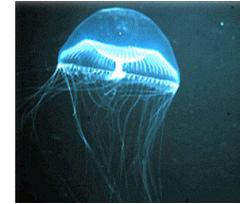
#### Roger Tsien

≥ 1994 : Développement de la GFPav et de ses homologues

Variants spectraux de la GFPav

Mise au point de biosenseurs

Mécanisme de formation du chromophore , ...



Méduse  
*Aequoria Victoria*

Prix Nobel de  
Chimie 2008

## Historique : les étapes clés de la révolution des PFs



**Sergey A. Lukyanov**

**1999 : Découverte de la DsRed**

**Depuis, découverte de plus de 150 PFs extraites d'organismes principalement non bioluminescents**

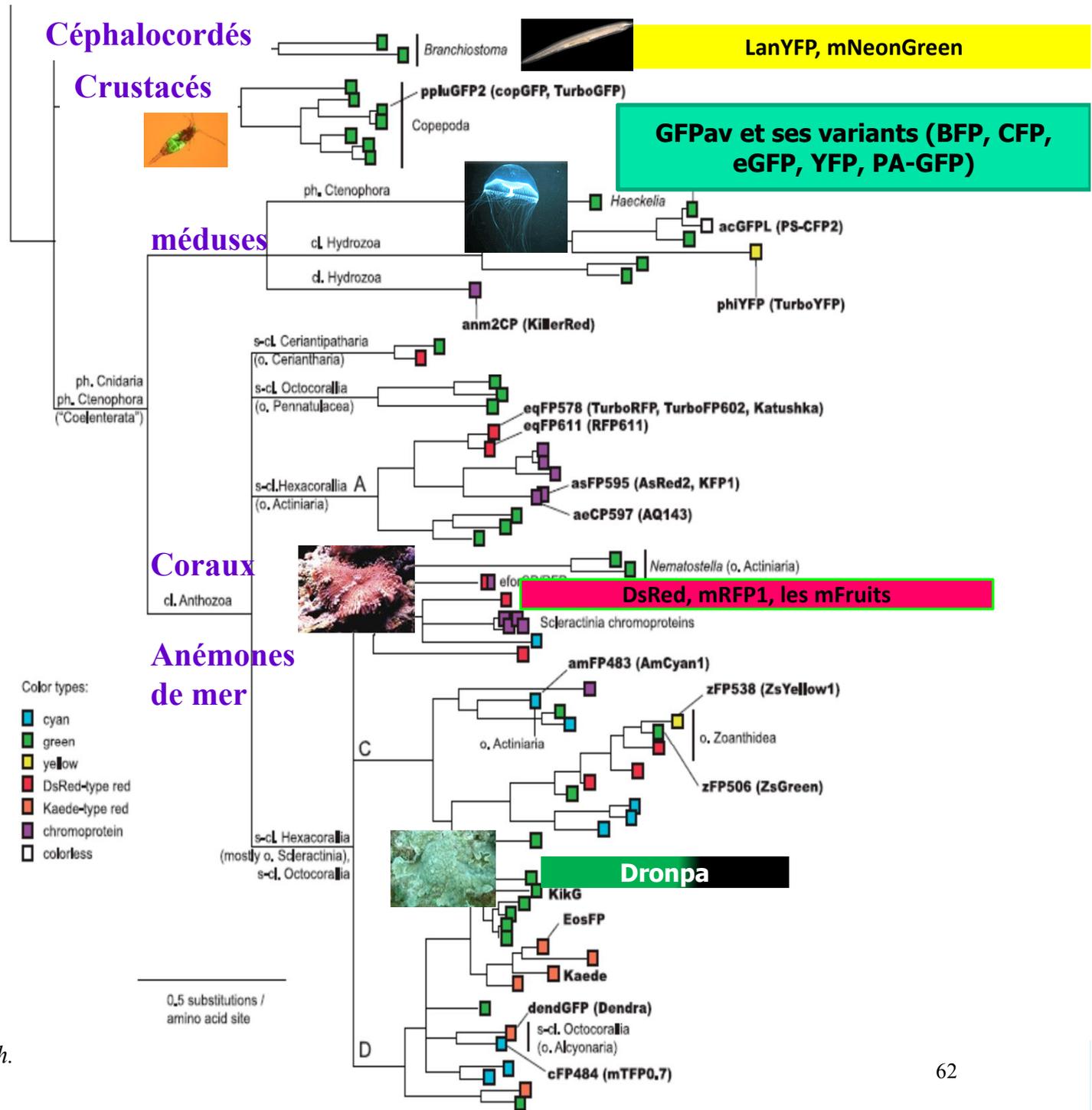
**Emergence d'une nouvelle classe de PFs : les optical highlighters = PFs photoactivables, photoconvertibles, photocommutables**



**Développement en synergie**

**Microscopies super-résolution**

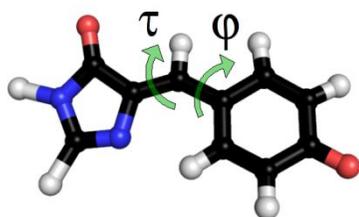
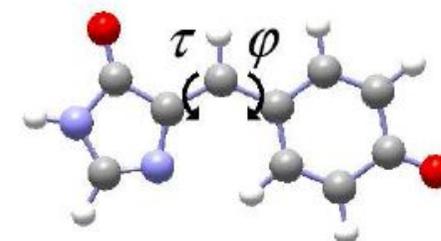
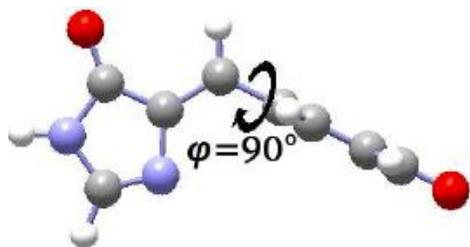
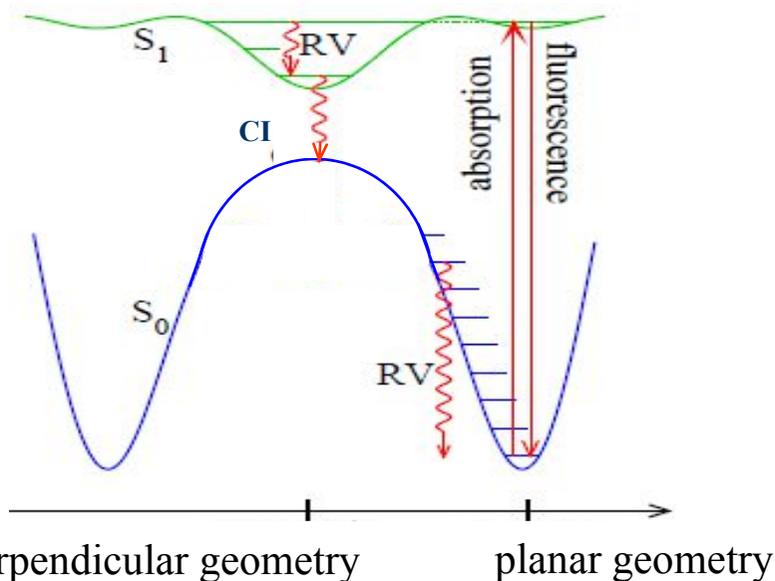
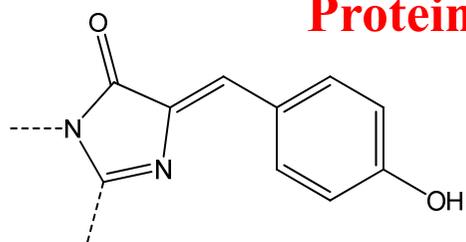
# Les Protéines Fluorescentes : phylogénie





### III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes

#### Protein matrix plays a crucial role in fluorescence emission



**Torsions in the excited state chromophore**  
= a non-radiative deactivation pathway

<b>Chromophore properties:</b>	• <b>Solvent:</b>	fluorescence lifetime: a few ps, Quantum yield ~ 0	NOT FLUORESCENT
	• <b>Protein:</b>	fluorescence lifetime: a few ns	FLUORESCENT

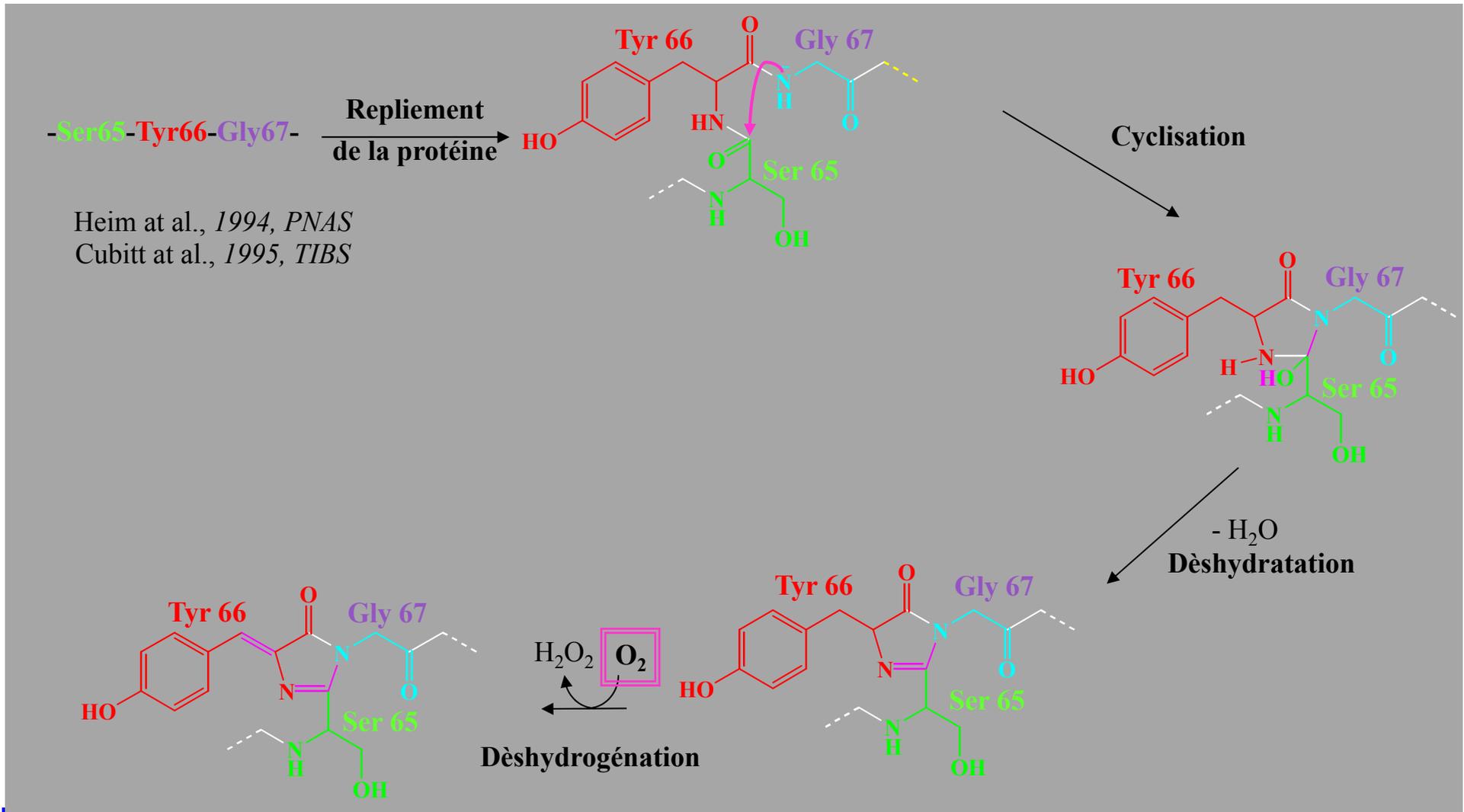
**The proteic matrix around the chromophore hinders (but not totally) the torsion motions of the chromophore**

### III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes

#### Mécanisme de formation du chromophore

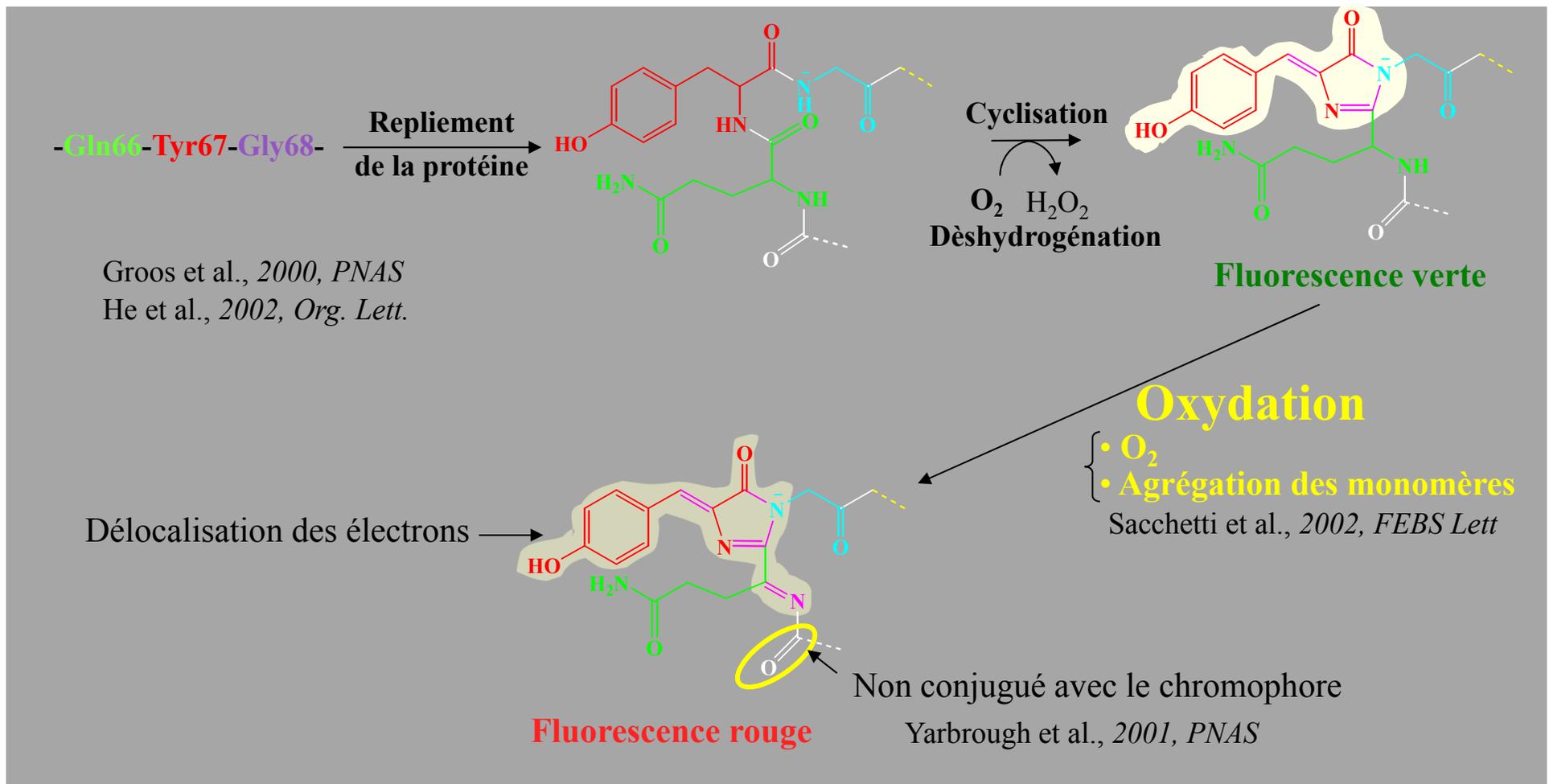
Chromophore des FP<sub>s</sub> naturelles = cyclisation de 3 résidus X65-Tyr66-Gly67

Cas de la GFP<sub>av</sub> et ses variants :



### III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes

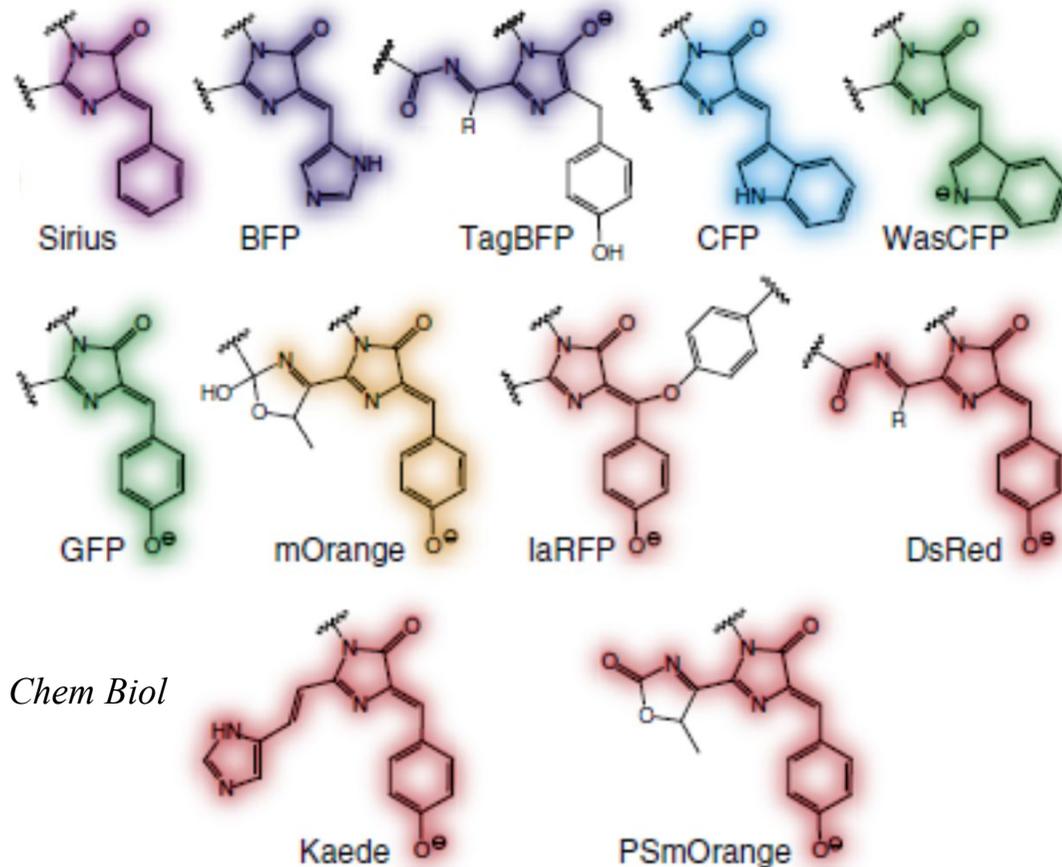
#### La DsRed : Formation du chromophore



### III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes

#### Diversité des structures de chromophore, diversité des propriétés spectrales

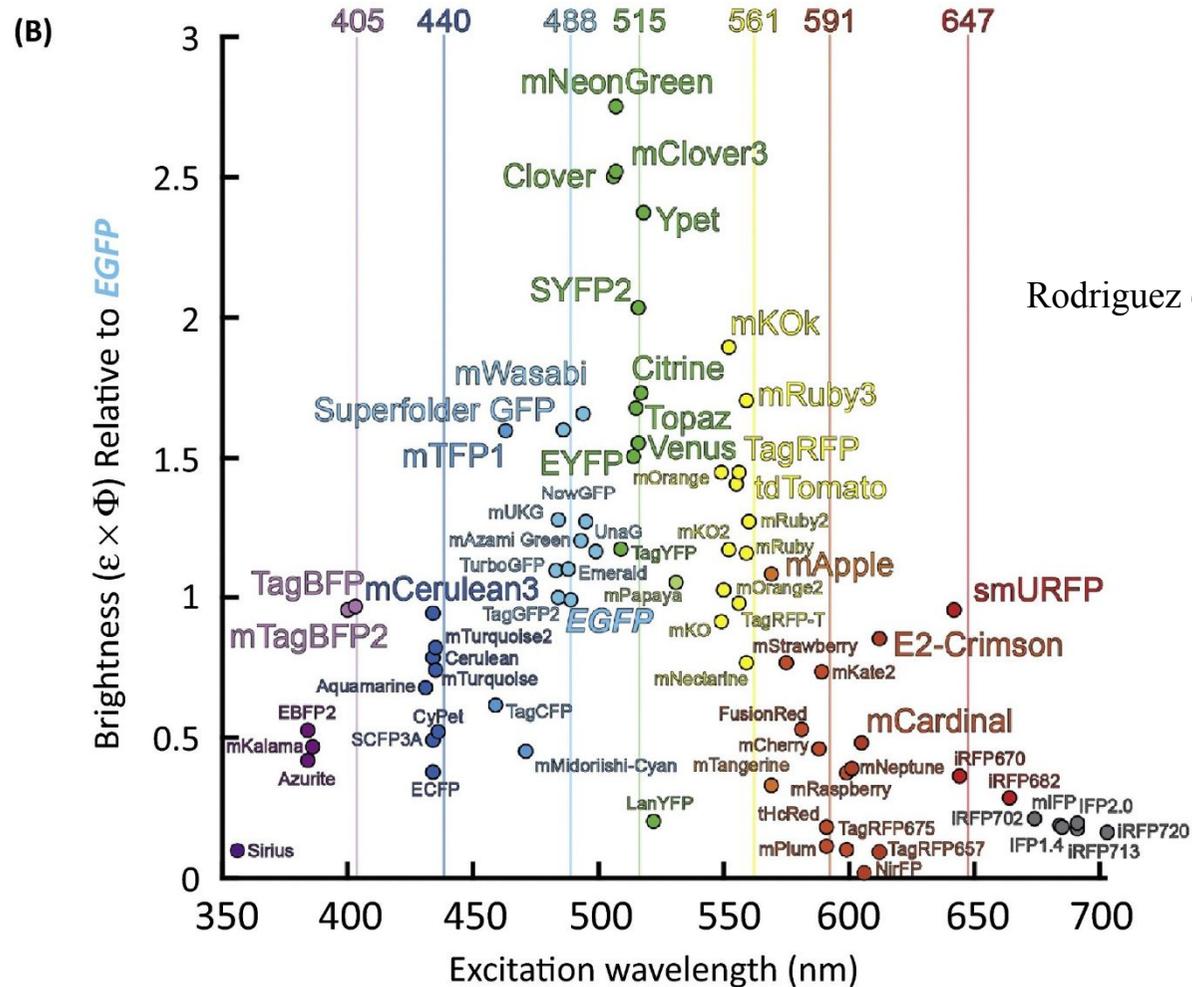
✚ Les propriétés spectrales sont déterminées par la structure du chromophore



Mishin et al., 2015, *Curr Op Chem Biol*

✚ mais pas que ... l'environnement du chromophore joue également.

### III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes



- ✓ Panel important de PFs aux propriétés spectrales variées ⇒ Grand choix !  
Mais SEULEMENT QUELQUES-UNES sont utilisées en imagerie et  
AUCUNE n'est parfaite

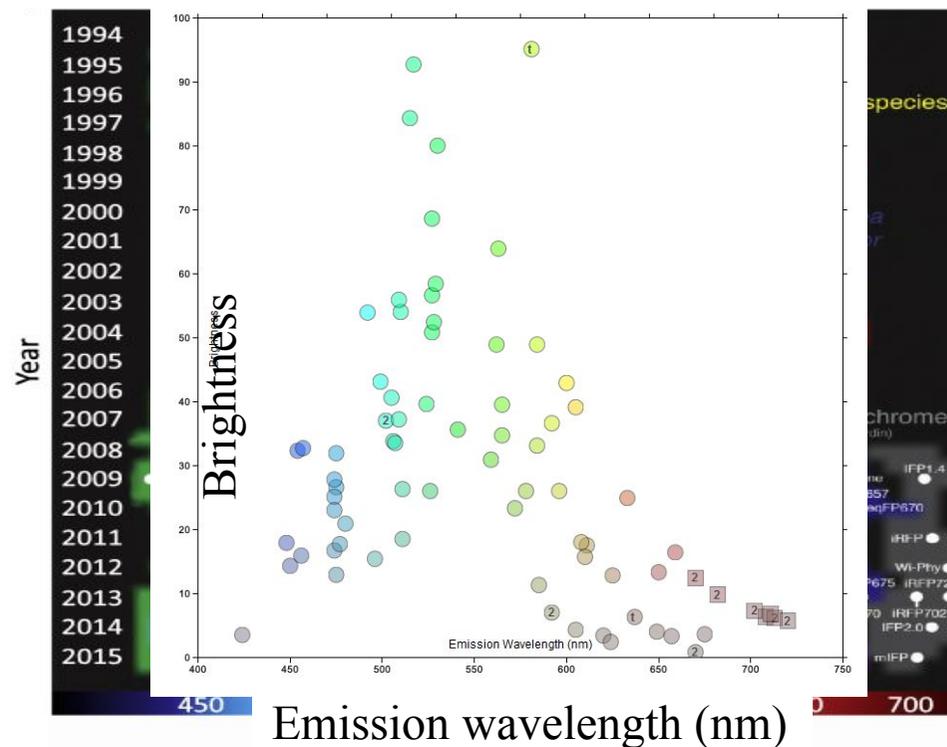
### III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes

- ✓ High brightness =  $\Phi_F \cdot \epsilon \Leftrightarrow$  High fluorescence lifetime  $\tau_F$
- ✓ Monoexponential decay
- ✓ Efficient (and quick) chromophore maturation
- ✓ Monomeric or pseudo-monomeric FPs
- ✓ Photostability ?
- ✓ Environmental sensitivity ?

A wide variety of fluorescent proteins are available

But most of them are sub-optimal !

**Better GFPs are urgently needed !**

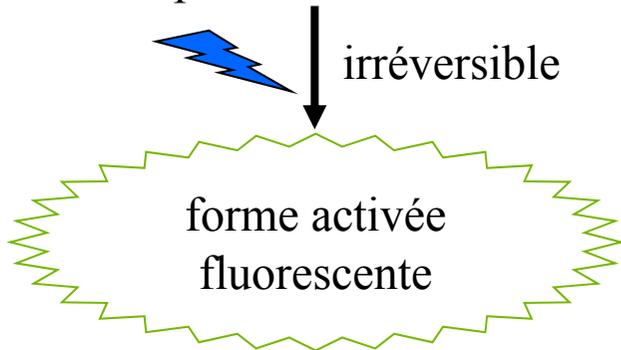


### III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes

#### *FPs photoactivables -photoconvertibles -photocommutables :* *Des FPs qui, irradiées, changent de couleur*

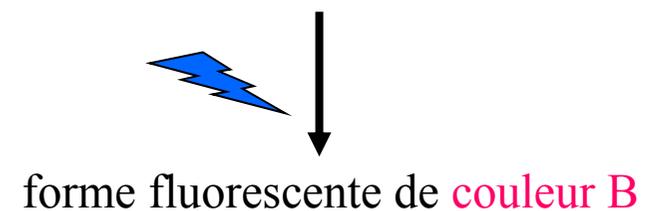
##### FPs photoactivables

forme peu ou non fluorescente



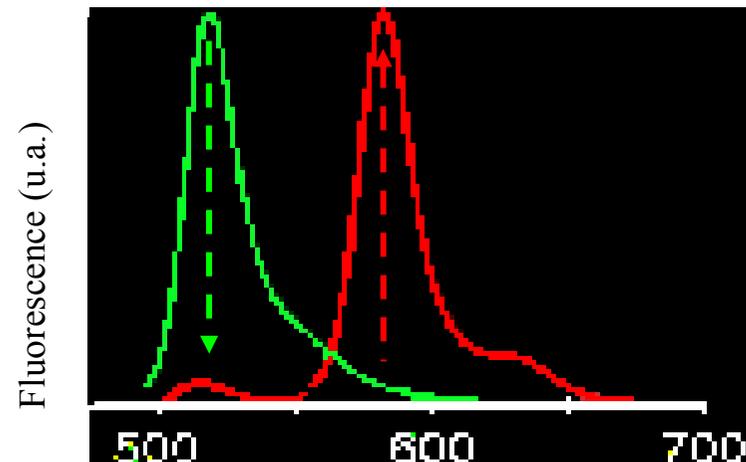
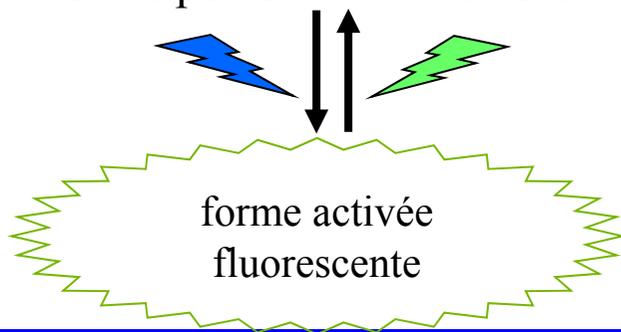
##### FPs photoconvertibles

forme fluorescente de couleur A



##### FPs photocommutables

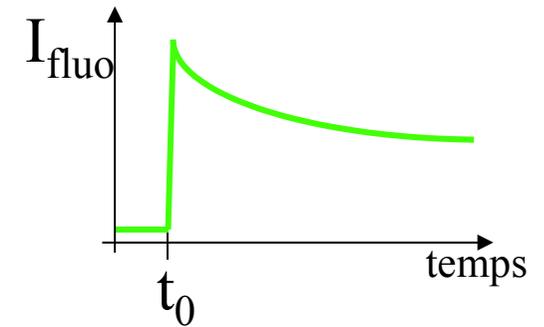
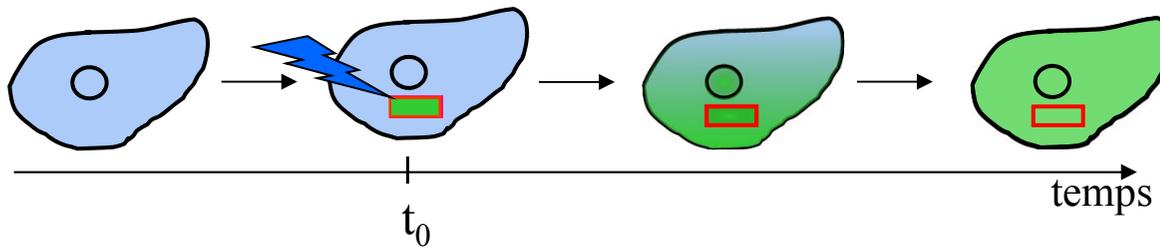
forme peu ou non fluorescente



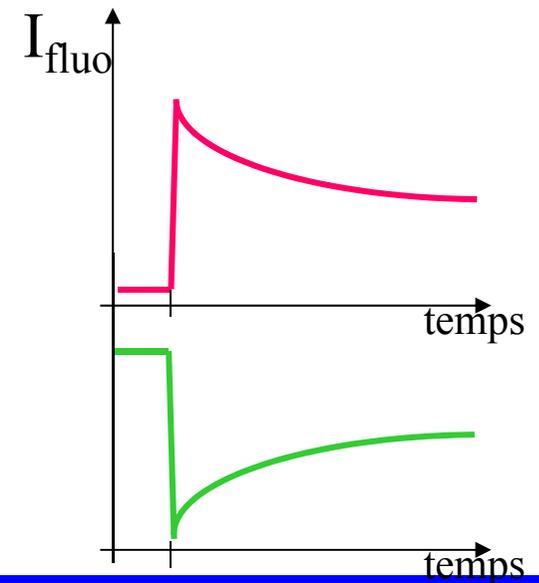
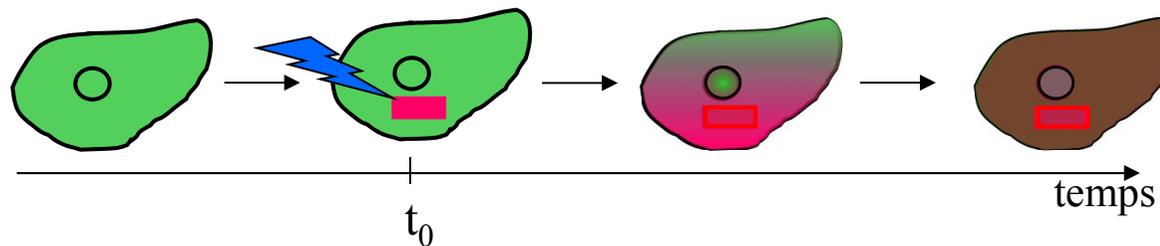
### III. Un exemple de sondes fluorescentes : Les protéines fluorescentes

#### *FPs photoactivables - photoconvertibles - photocommutables :* *Des FPs qui, irradiées, changent de couleur*

##### **+** FPs photoactivables - photocommutables



##### **+** FPs photoconvertibles



- ✓ **High brightness= <= de nombreuses études**
- ✓ **Monoexponential decay**
- ✓ **Efficient (and quick) chromophore maturation**
- ✓ **Monomeric or pseudo-monomeric FPs**
- ✓ **Photostability ?**
- ✓ **Environmental sensitivity => assez bien étudié**

Stage ICP : Etude du mécanisme de photoblanchiment des FPs

Encadrant : M. Erard et H. Pasquier