

La fluorescence



Aurélié Le Ru

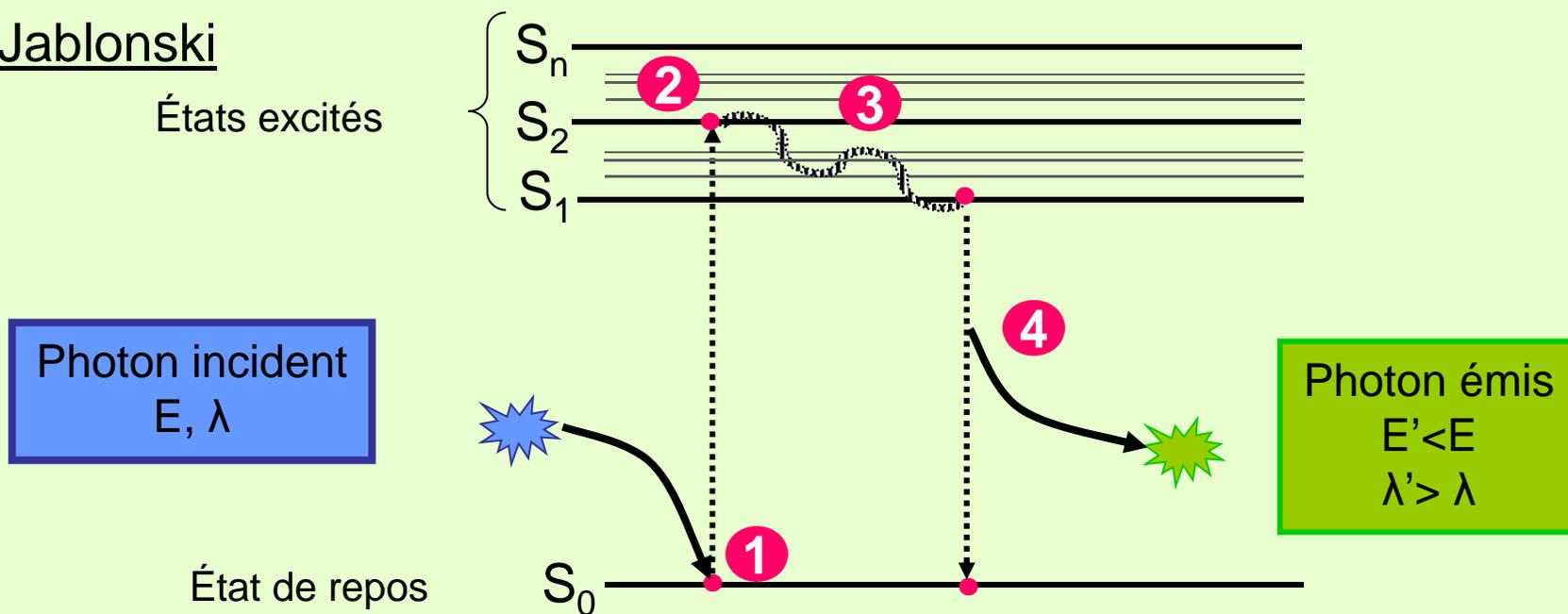
FR3450

leru@lrsv.ups-tlse.fr

Principe de la fluorescence

- passage d'un électron d'un état basal **1** à un état excité **2** grâce à l'énergie d'un photon incident
- 3** perte d'énergie par radiation, conversion interne, ...
- 4** retour à l'état basal par libération d'un photon différent du 1°.

Diagramme de Jablonski

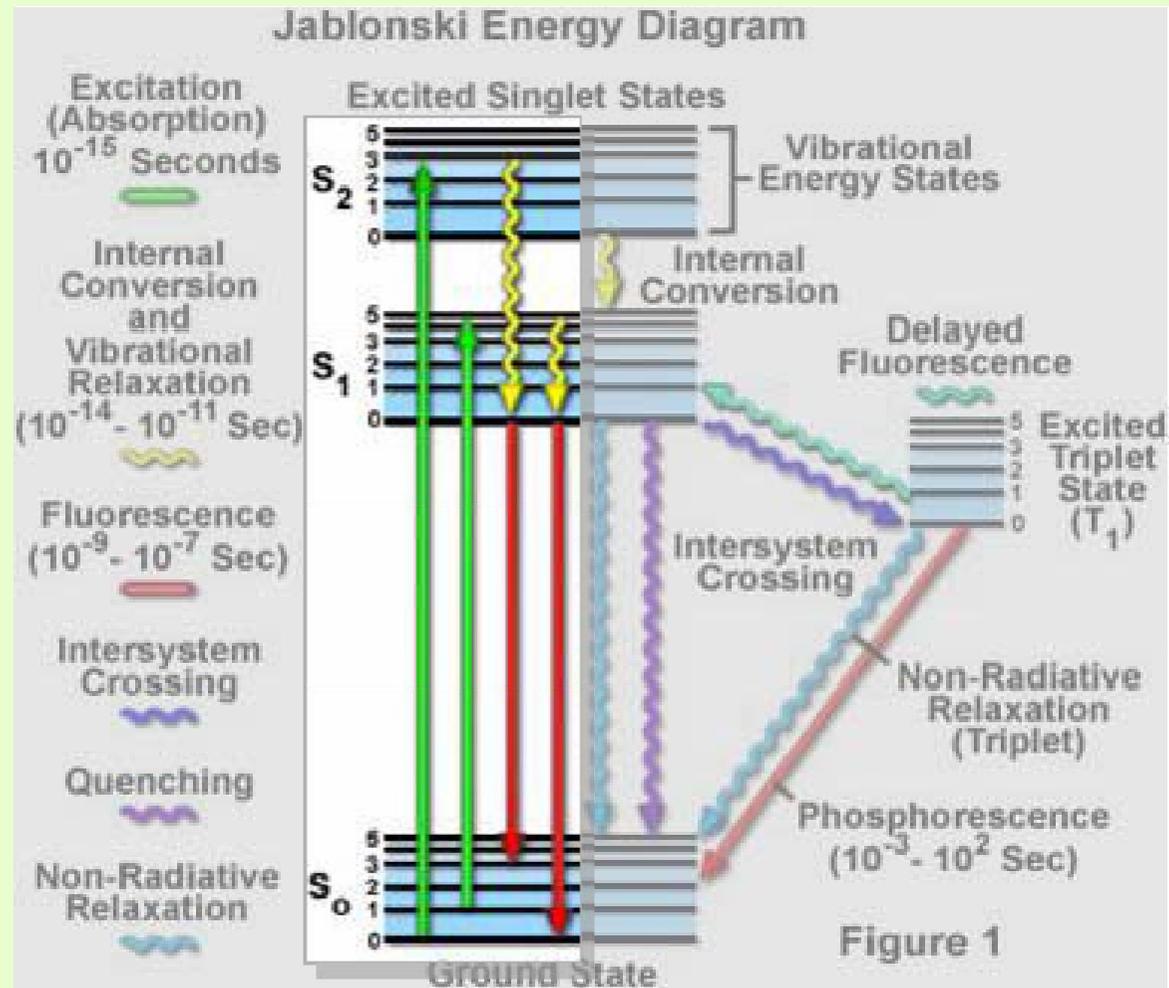


Loi de Planck: $E = hc / \lambda$

$c = 299\,792\,458 \text{ m/s}$
 $h = 6,626\,17 \times 10^{-34} \text{ J.s}$

Si $E \text{ incidente} > E \text{ libérée} \rightarrow \lambda \text{ excitation} < \lambda \text{ émise}$ (fluorescence)
(fluorescence décalé vers le rouge)

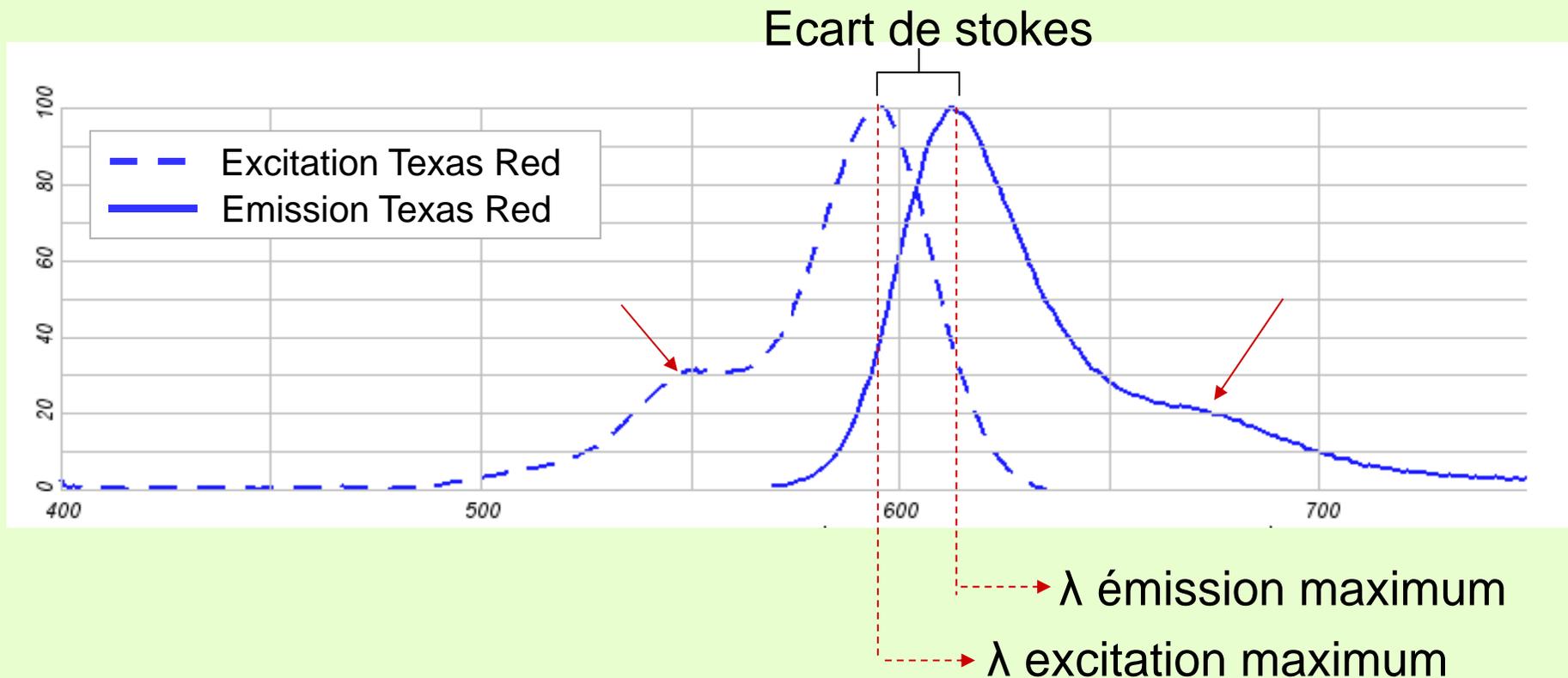
Diagramme de Jablonski et spectre



différentes valeurs d'énergie peuvent exciter le fluorochrome et différentes valeurs d'énergies seront libérées

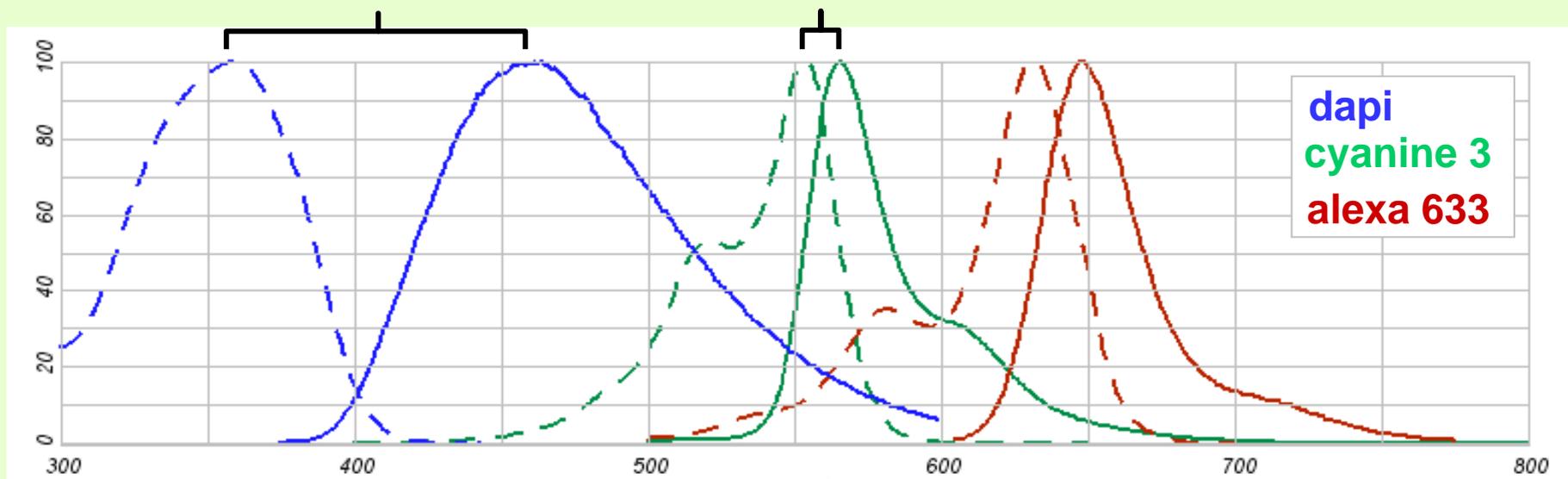
→ **spectre** d'excitation et d'émission pour chaque fluorochrome

- existe $\lambda_{\text{excitation}}$ et $\lambda_{\text{émission}}$ maximales spécifique pour chaque fluorochrome
- $\lambda_{\text{excitation}} < \lambda_{\text{fluorescence}}$ (en fluorescence monophoton)
- symétrie des spectres d'excitation et d'émission
- écart de stokes = écart entre les valeurs maximales d'excitation et d'émission. Plus l'écart de Stokes est grand, meilleure est la discrimination de la fluo

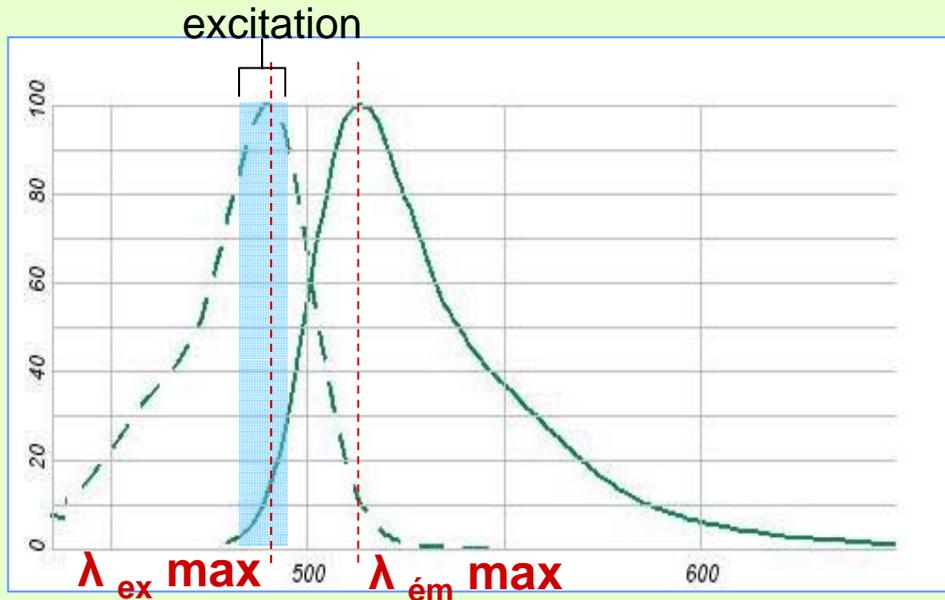


Exemple de spectres

- spectre +/- large
- écart stokes +/- important
- présence de double pics ou non

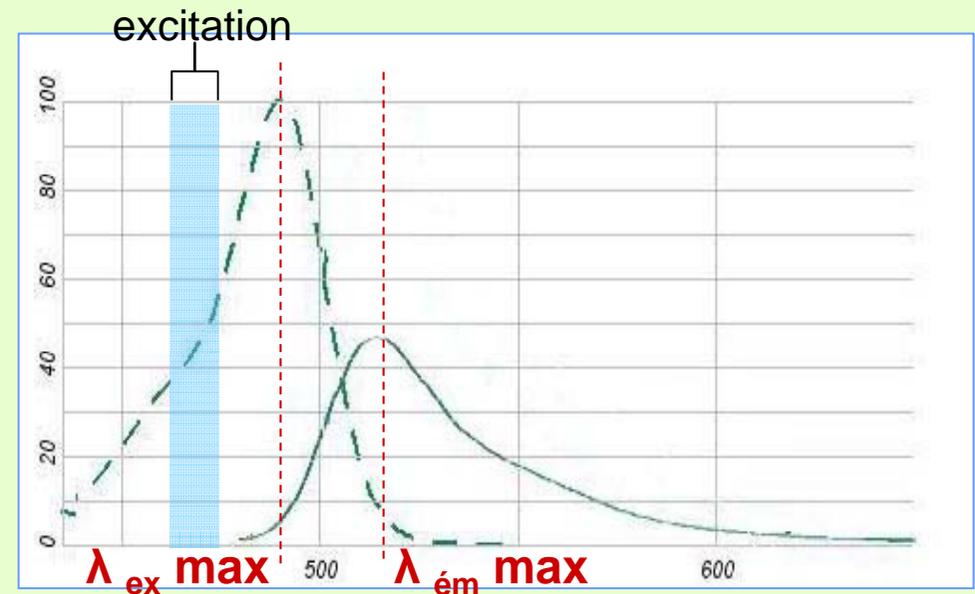


Spécificités du spectre de fluorescence



illumination du fluorochrome à son maximum d'excitation

- émission de fluorescence sous tout le spectre d'émission
- conservation du maxima d'émission
- avec une intensité maximale



illumination du fluorochrome à une longueur d'onde différente de la longueur d'onde d'excitation maximale

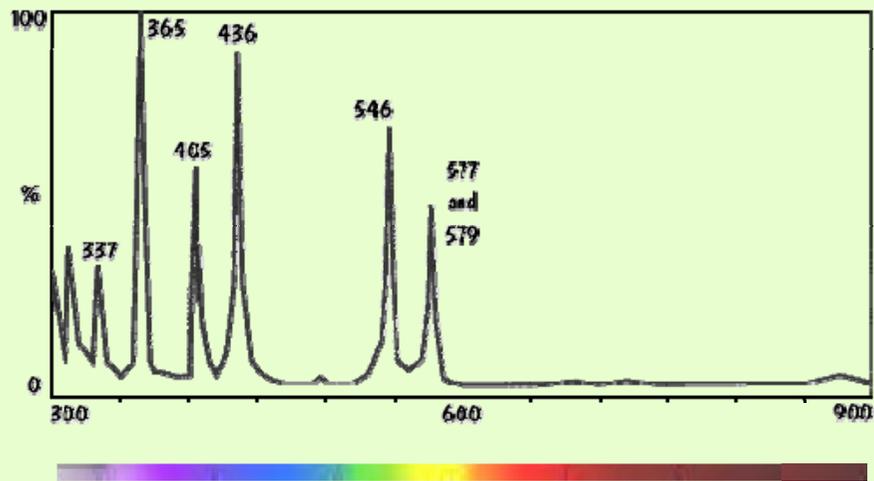
- émission de fluorescence sous tout le spectre d'émission
- conservation du maxima d'émission
- **MAIS** intensité de signal inférieure

Importance d'optimiser le filtre d'excitation pour avoir une émission maximale

Lampe à vapeur de mercure et lampe au xénon

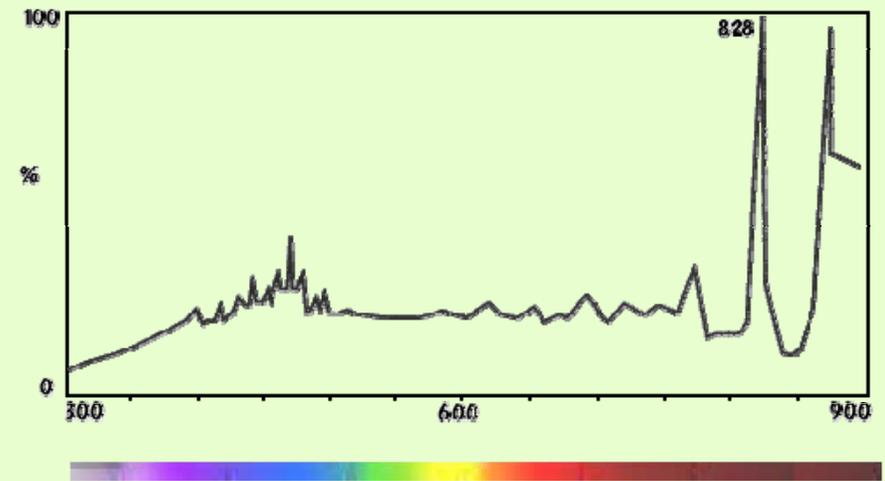


Lampe à vapeur de mercure



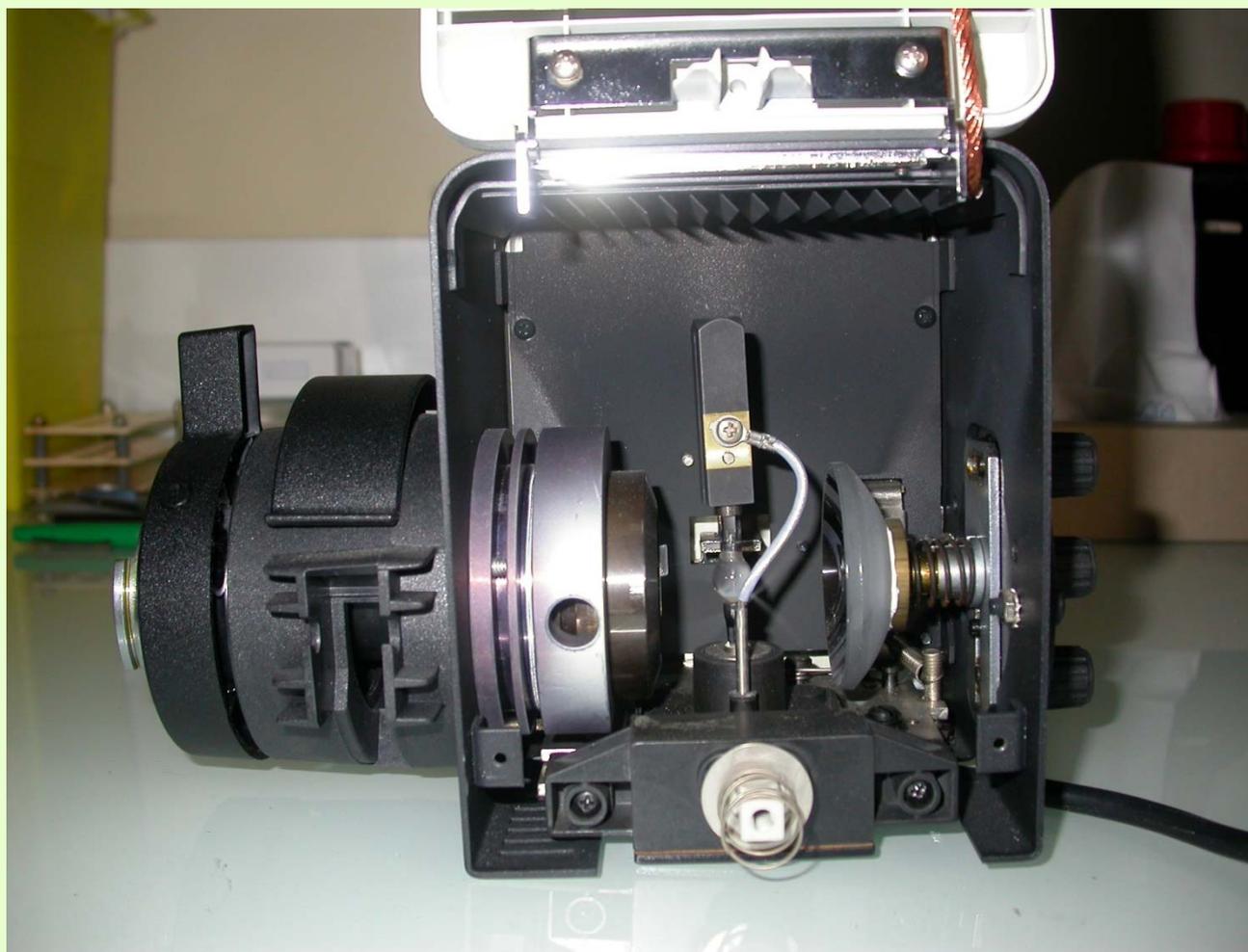
Intensité hétérogène selon les longueurs d'onde avec présence de pics de fortes intensité

Lampe xénon:



- Spectre d'intensité homogène dans le visible
- Pic dans l'infra-rouge (chaleur)

Lampe à vapeur de mercure





Lampe fibrée

Système d'illumination déporté.
La lumière arrive au microscope via une fibre optique.



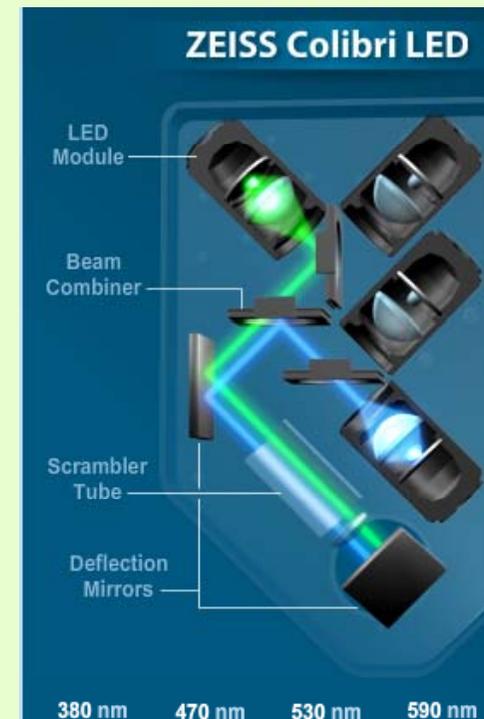
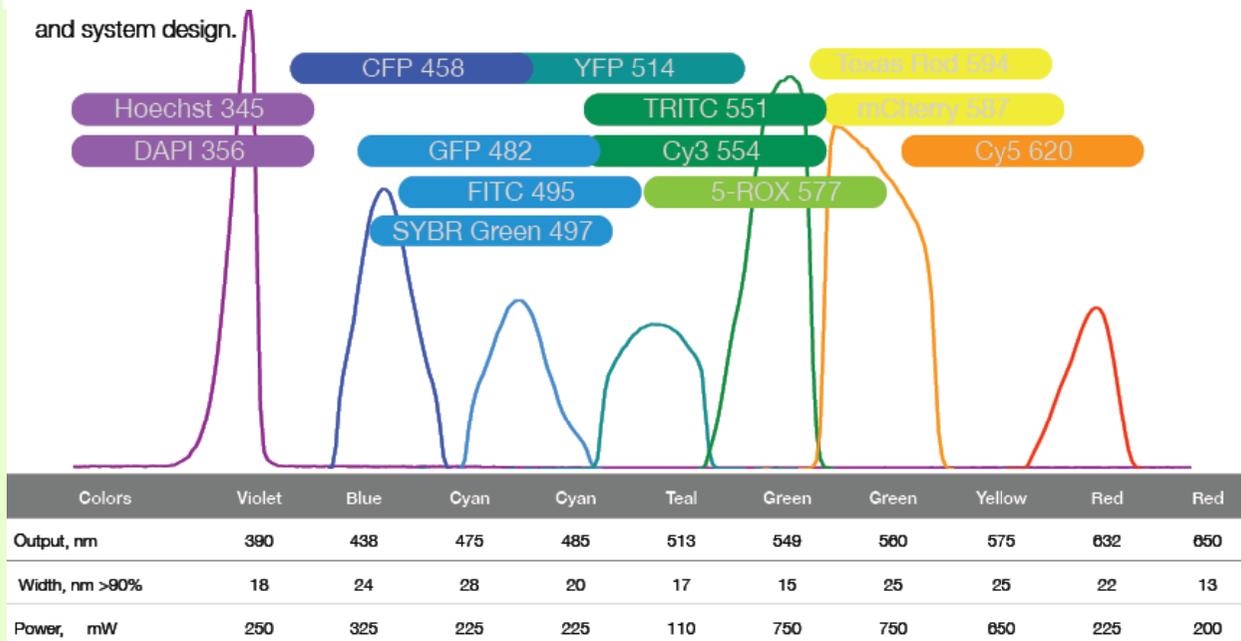
- Intensité d'illumination variable
→ préservation des échantillons
(≠ bruleurs classiques)
- déportée → pas de chauffage
- longue durée de vie des lampes
- lampe préalignée → illumination optimale

illumination par LED

utilisation de diodes lumineuses (LED ≠ diode laser) de longueurs d'onde différentes

- renvoi vers le microscope par des miroirs dichroïques
- passage très rapide d'une λ à l'autre par ON/OFF des LED
- longue durée de vie des LED (10000heures), stabilité de la lumière, peu de chaleur.
- *plus besoin de filtre d'excitation????*

Diodes disponibles sur le système LUMENCOR



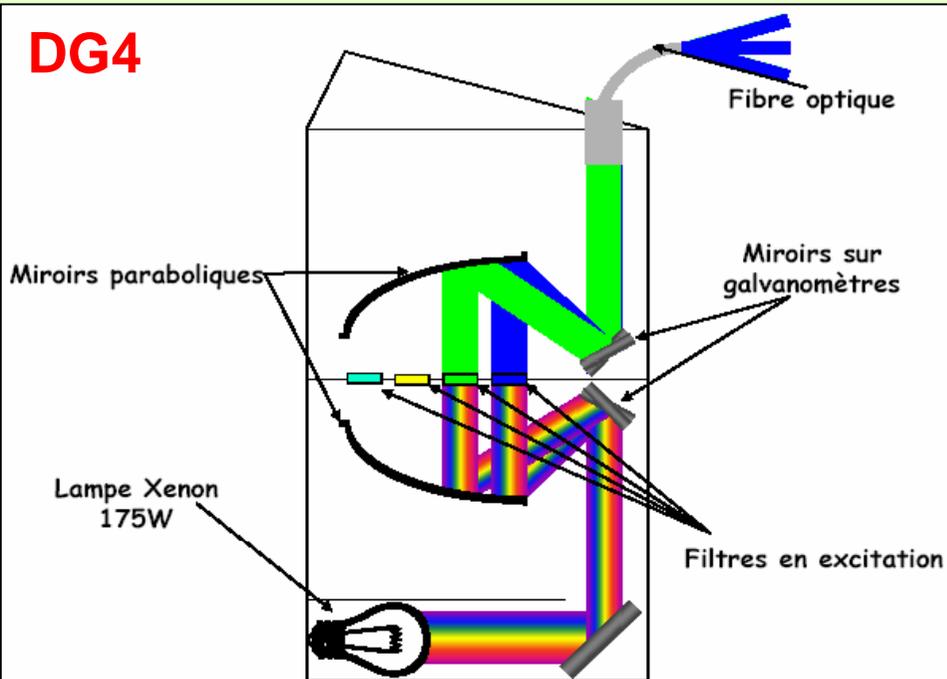
DG4 & monochromateur: changement de longueur d'onde d'excitation très rapide (1.2ms)

Système d'illumination permettant de modifier très rapidement (1.2ms) la longueur d'onde d'excitation.

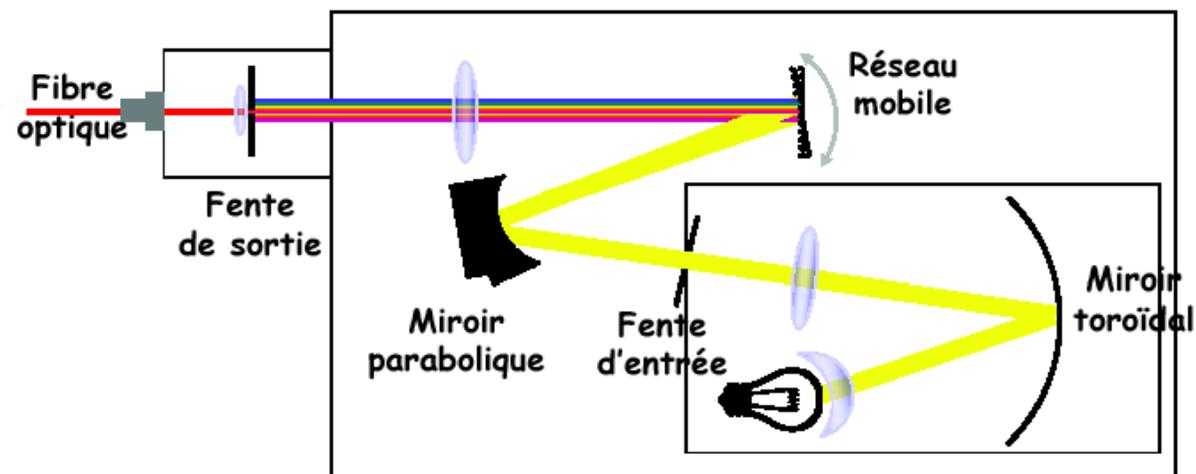
La longueur d'onde d'excitation est sélectionnée grâce à des filtres (DG4) ou à un réseau de diffraction (monochromateur)

La longueur d'onde d'émission est sélectionnée grâce à un bloc filtre multi bande dans le microscope.

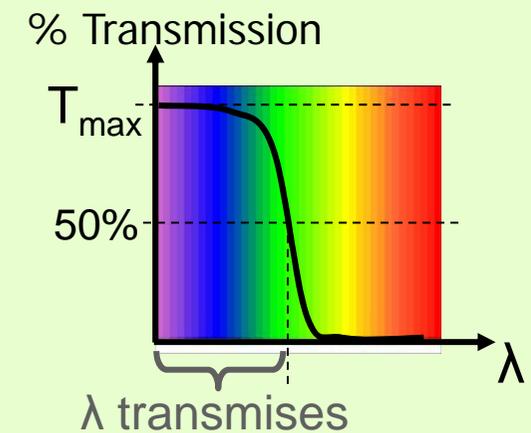
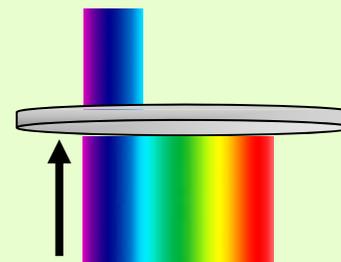
DG4



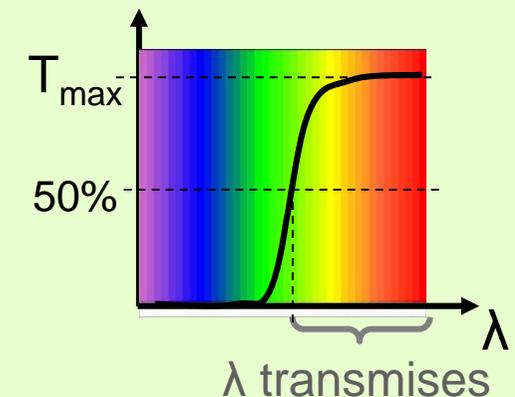
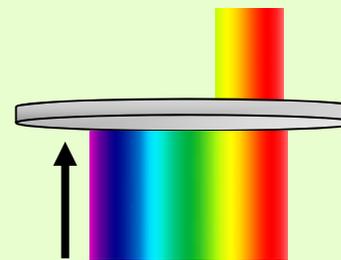
Monochromateur



Short pass (passe bas): laisse passer les $\lambda <$ à une valeur et bloque les autres
Un filtre SP500: laisse passer les $\lambda < 500$



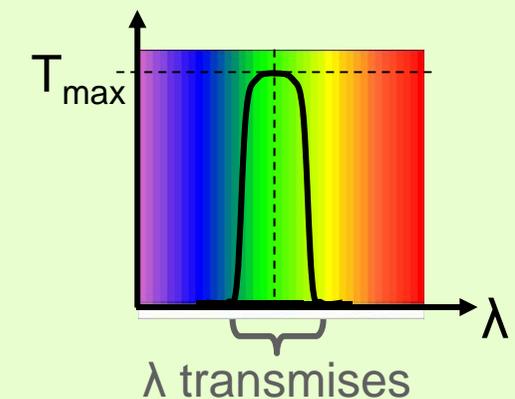
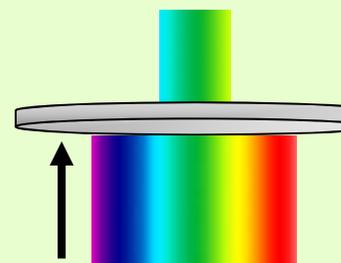
Long pass (passe haut): laisse passer les $\lambda >$ à une valeur et bloque les autres
Un filtre LP500: laisse passer les $\lambda > 500$



Band pass (passe bande): laisse passer les λ comprise entre 2 valeurs et bloque les autres

Un filtre AF500/30: laisse passer les λ comprises dans une bande de 30 nm centrée sur 500nm soit de 485 à 515nm.

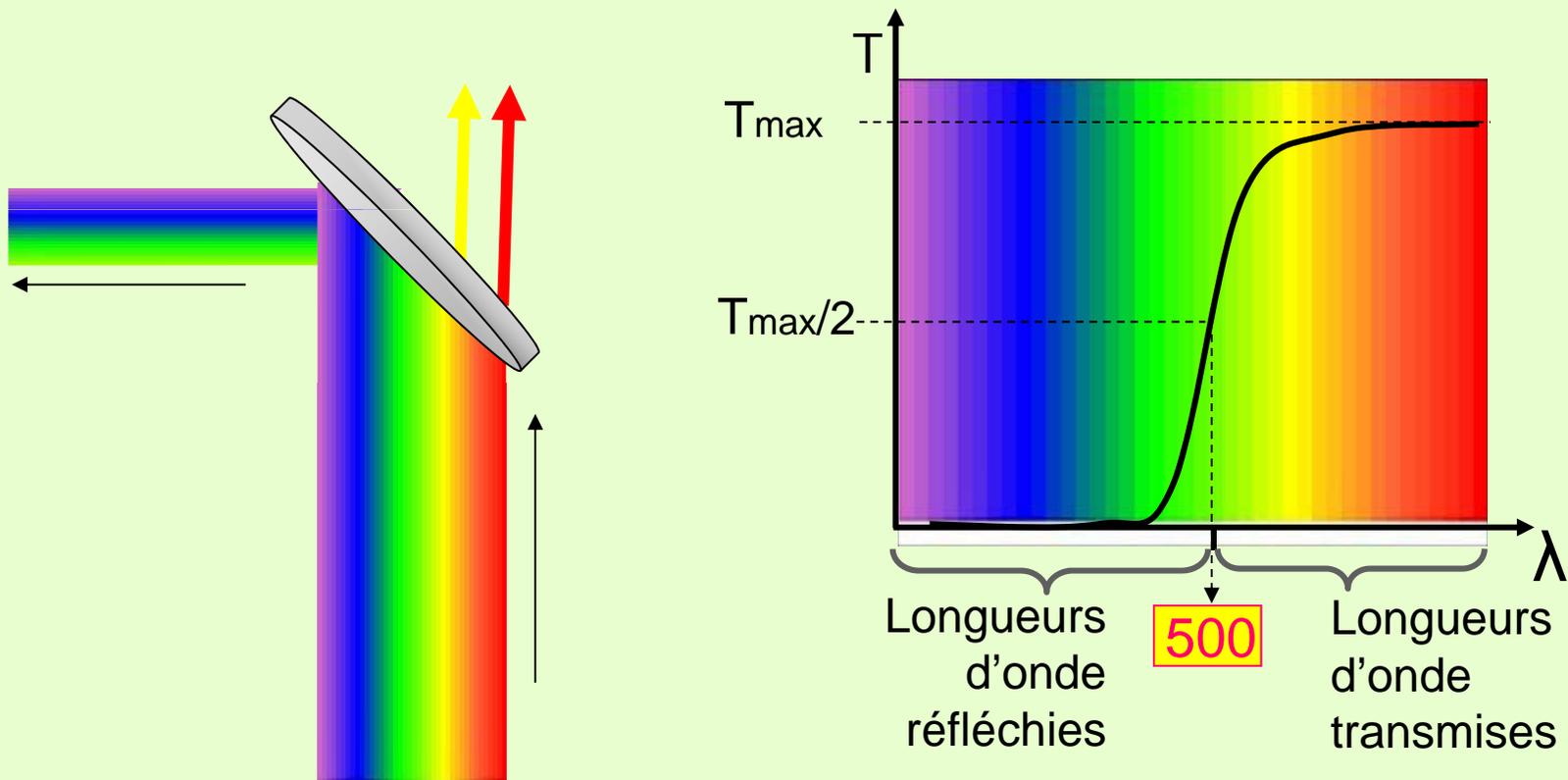
500+/- (30/2)

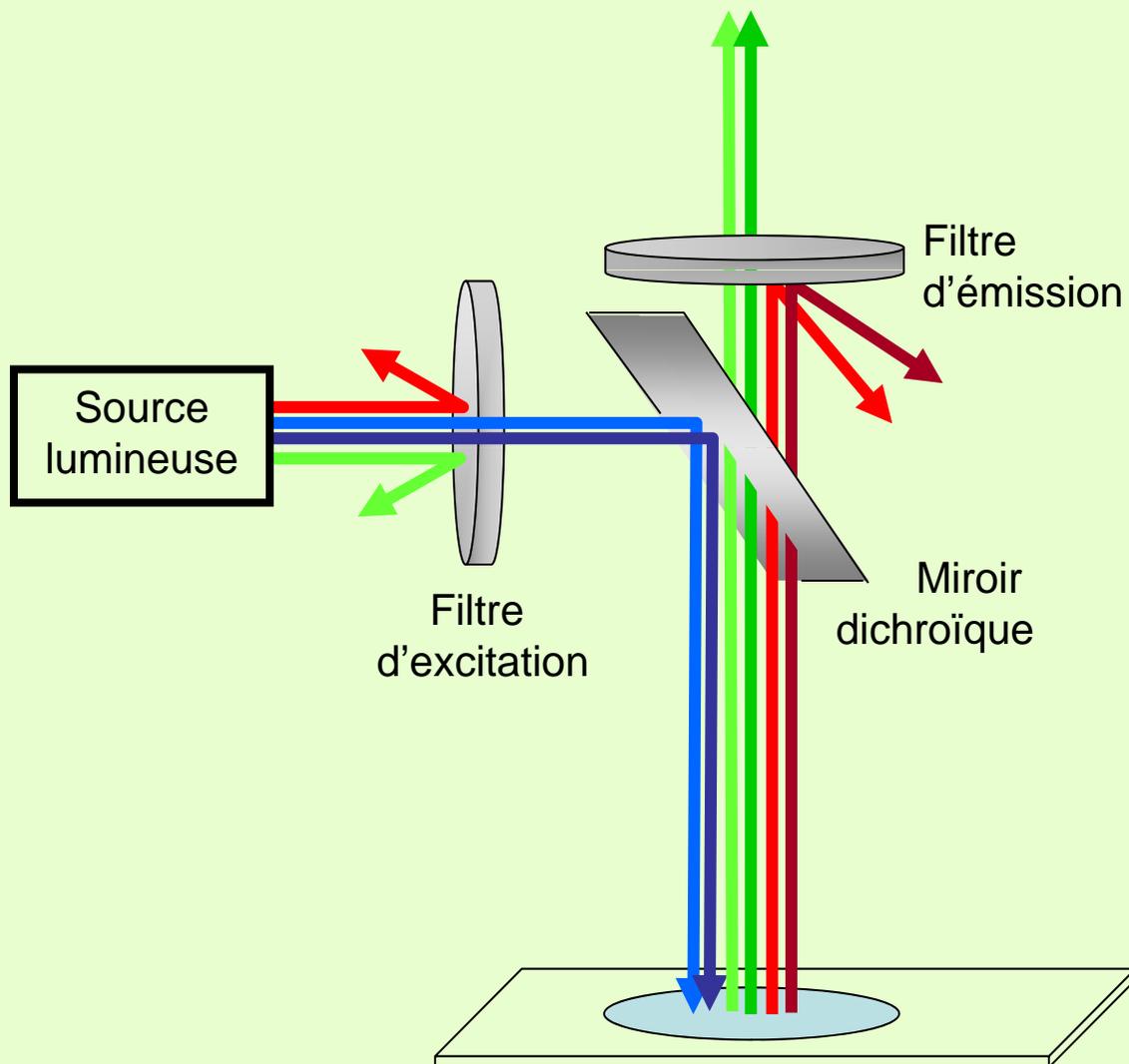


Cas spécial: le miroir dichroïque

Le miroir dichroïque fonctionne un peu comme un Long Pass SAUF qu'il **réfléchi** les longueurs d'onde qu'il ne laisse pas passer au lieu de les bloquer.

Un dichroïque de **500** réfléchit les $\lambda < 500\text{nm}$ et est transparent (laisse passer) les $\lambda > 500\text{nm}$.

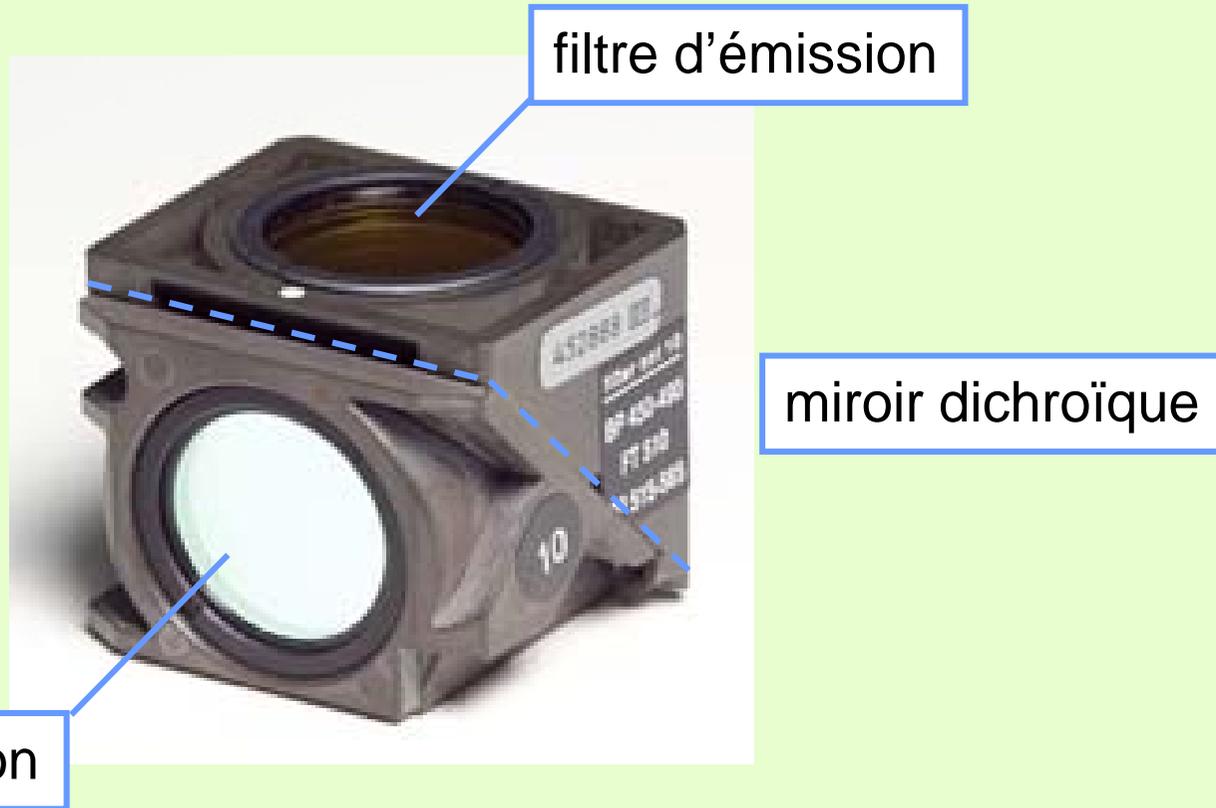




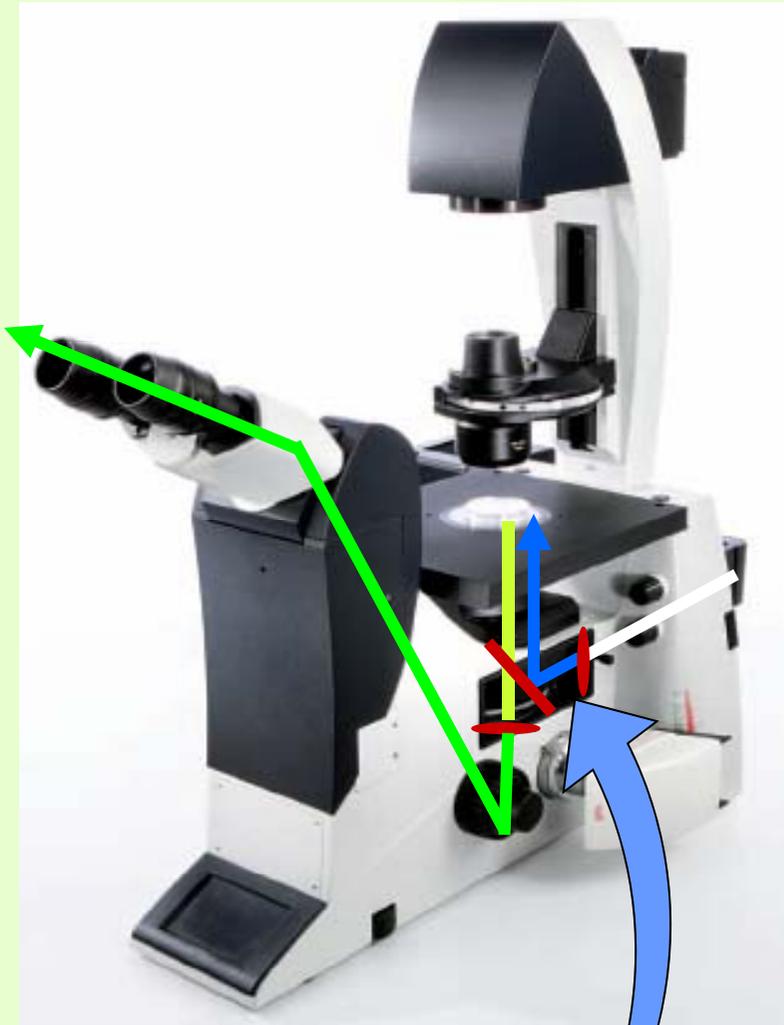
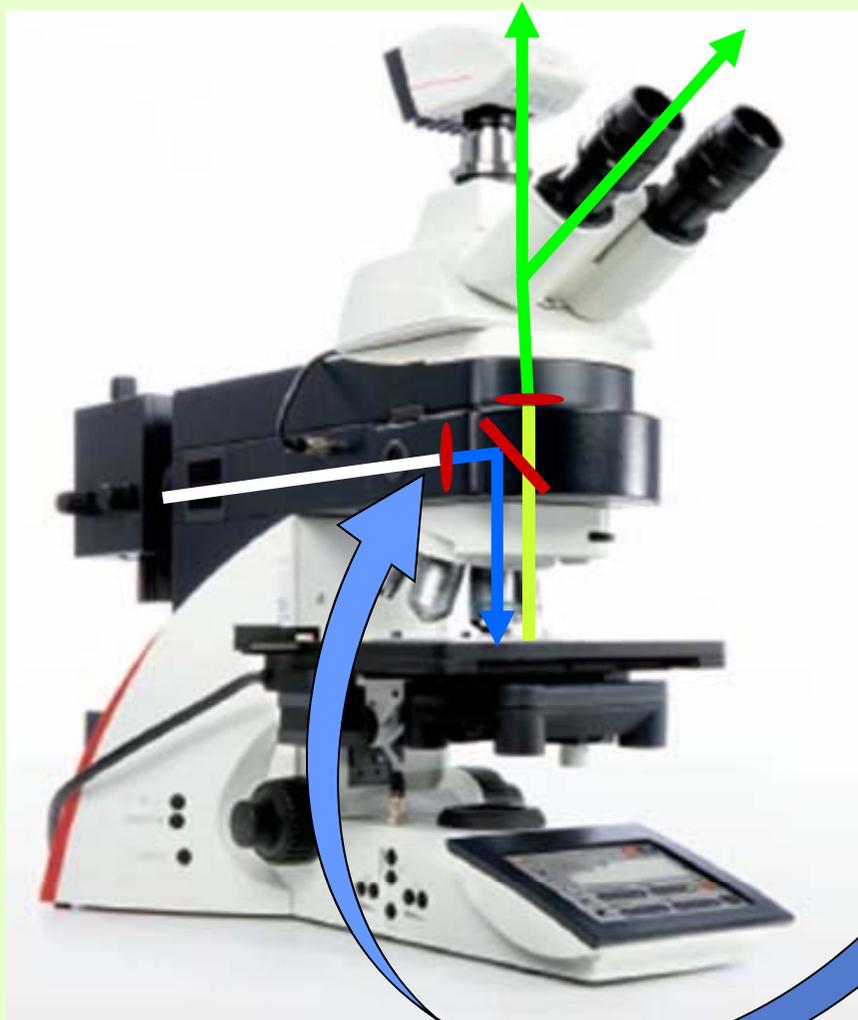
Un bloc filtre est constitué de 3 éléments

- un filtre d'excitation qui sélectionne la bande spectrale d'excitation du fluorochrome.
- un miroir dichroïque qui est miroir pour certaines longueurs d'onde et transparent pour d'autres
- un filtre d'émission qui sélectionne la bande spectrale d'émission du fluorochrome (la fluorescence).

Bloc filtre de fluorescence



Vue générale d'un microscope



Nomenclature

405DF40

excitation

filtre band pass centré sur **405** avec bande passante de **40**nm de large. Laisse passer les λ de **405**-(**40**/2) à **405**+(**40**/2) \rightarrow 385 à 425 nm

435DRLP

dichroïque

filtre Dichroïque: 50% de la transmission max à 435nm \approx réfléchi (à un angle de 45°) les $\lambda < 435$ nm, laisse passer le reste

460ALP

émission

filtre Long Pass: 50% de transmission à 460nm \approx laisse passer $\lambda > 460$ nm

Exciter Filters

SP: short pass filters

B or **BP**: band pass filter

KP (**K** for kurz, short in German)

Dichromatic Beamsplitters

DM: dichroic mirror

FT: "farb teiler", German for color splitter

CBS: chromatic beamsplitter

TK: "teiler kante", German for edge splitter

RKP: reflection short pass

Barrier Filters

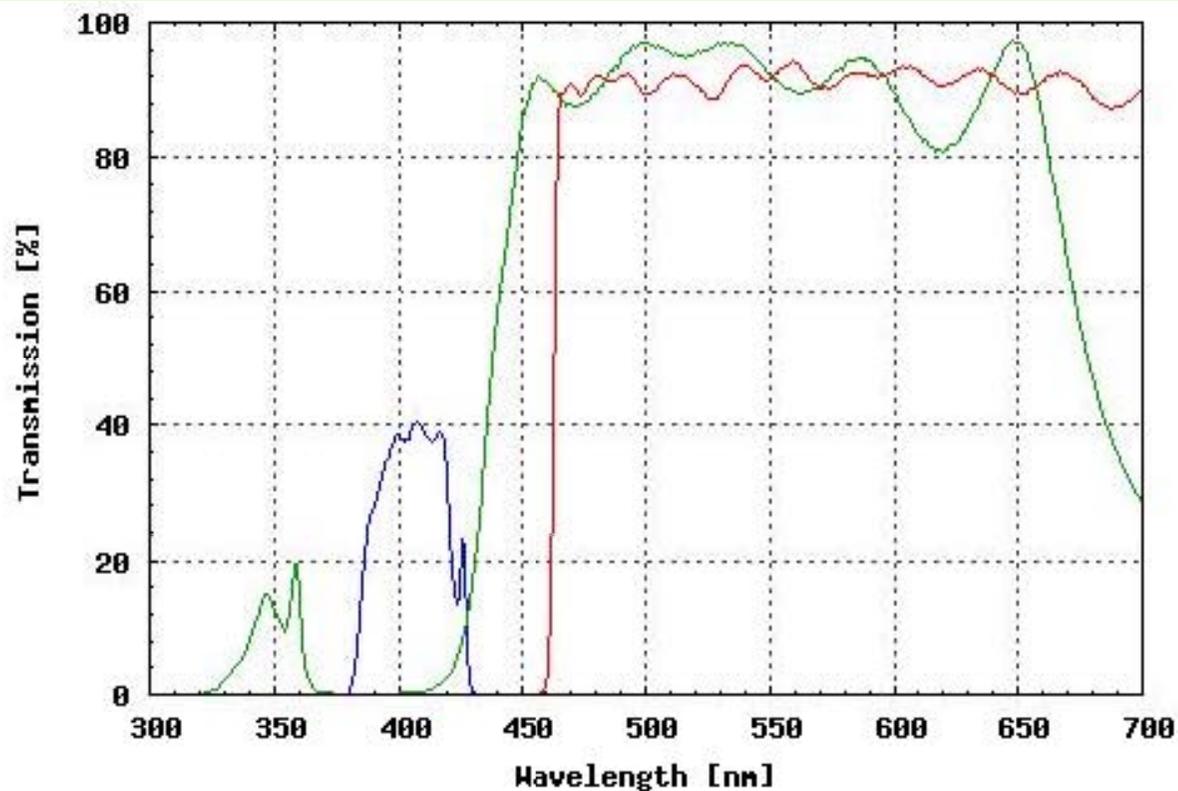
LP or **L**: long pass filters

BA: barrier filter

K: kante, for edge (filter) in German

Bloc filtre de fluorescence

405DF40
435DRLP
460ALP

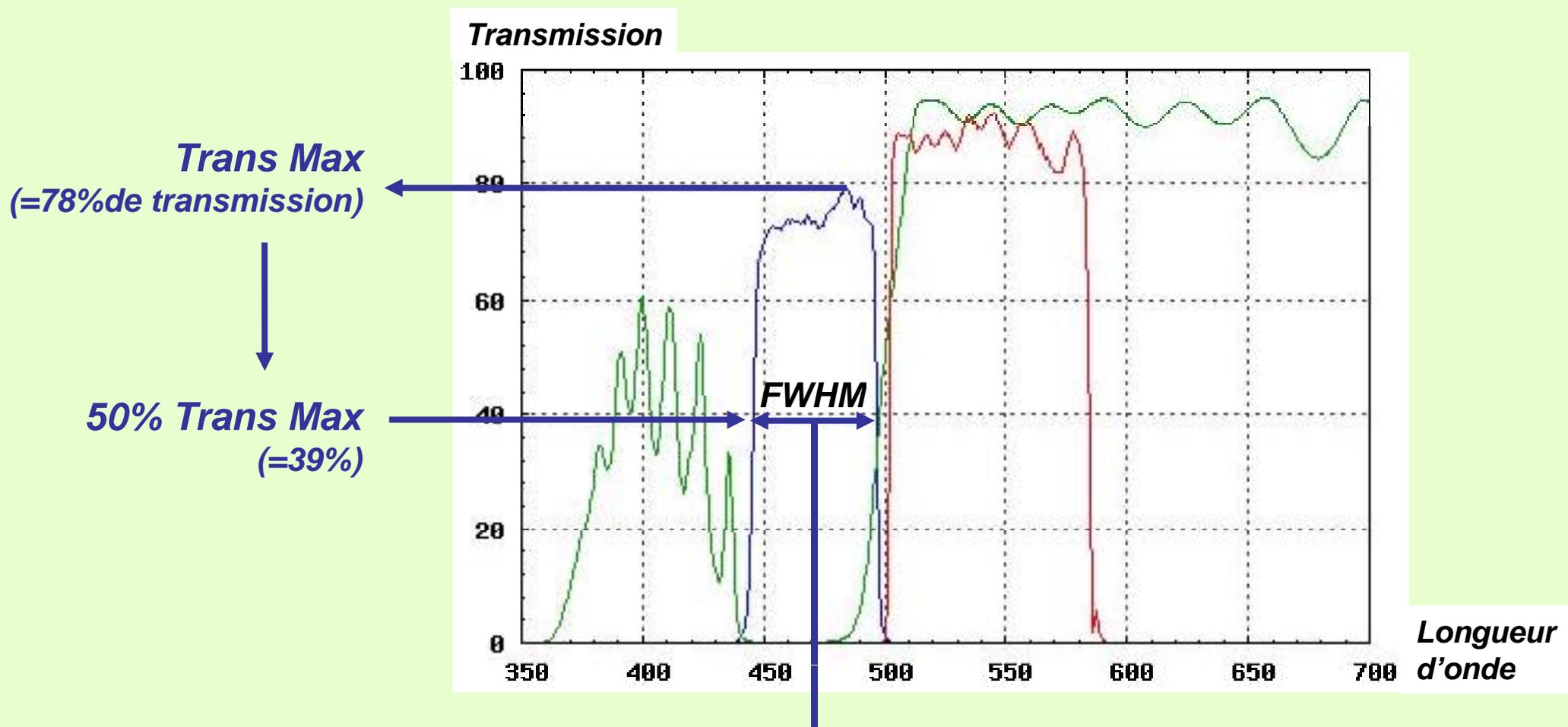


Excitation

Dichroïque

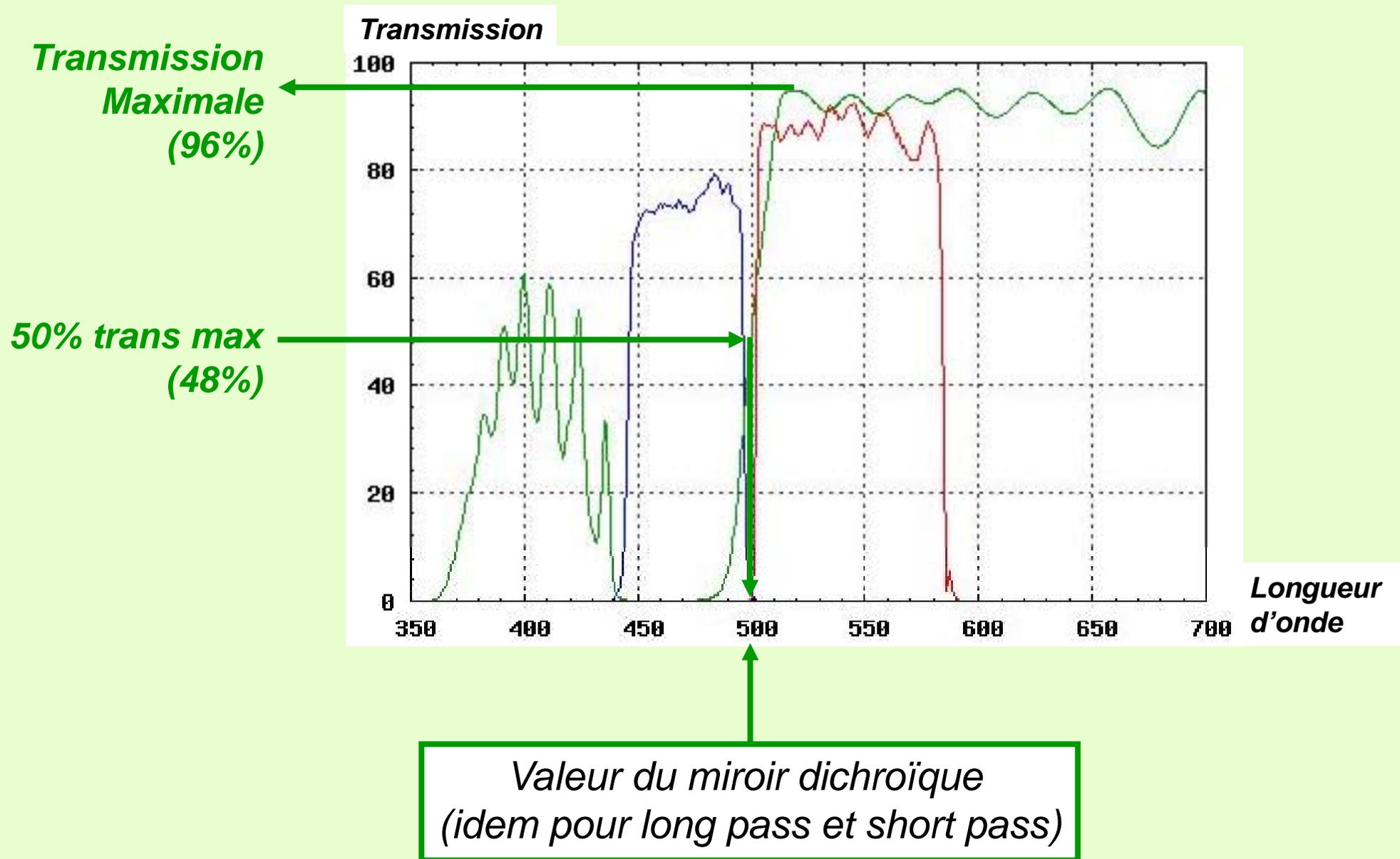
Emission

Caractéristiques band pass

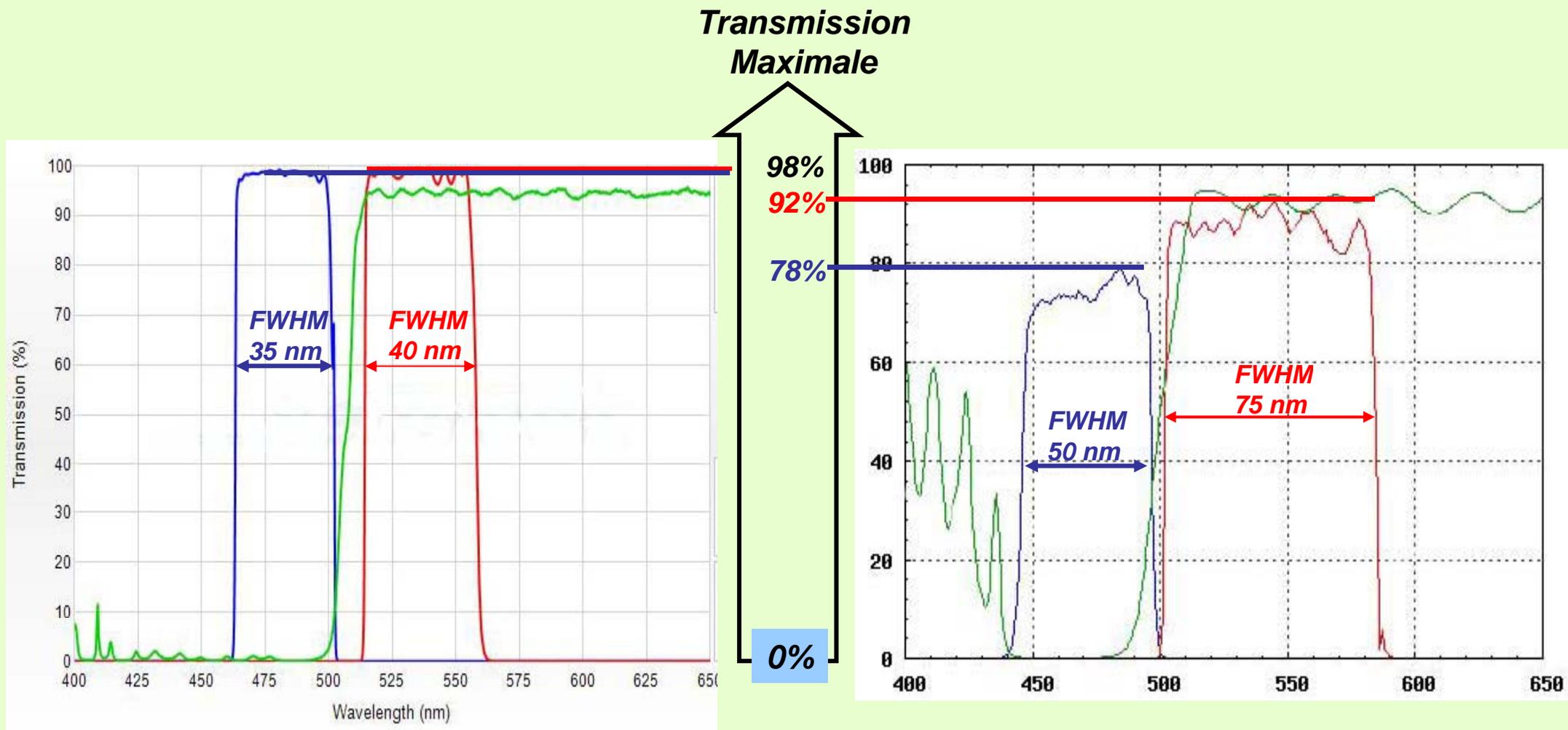


Full-Width-at-Half-Maximum
largeur à mi hauteur
Largeur du spectre à 50% de la valeur maximale de transmissison
bande passante du filtre

Caractéristiques miroir dichroïque (short pass/long pass)



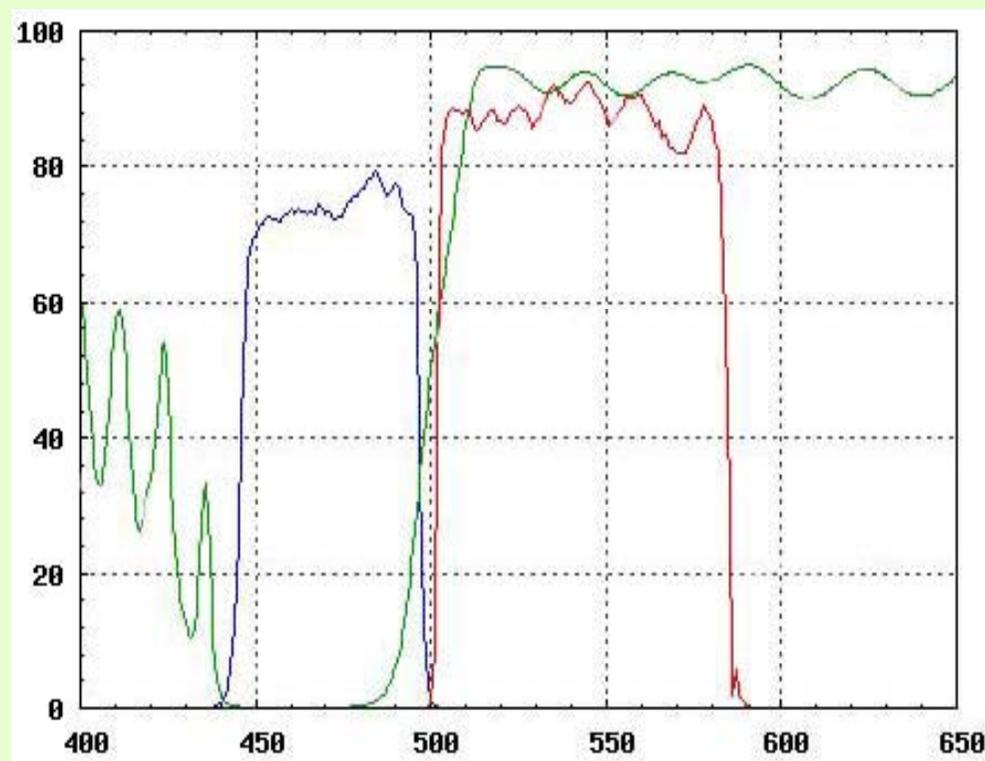
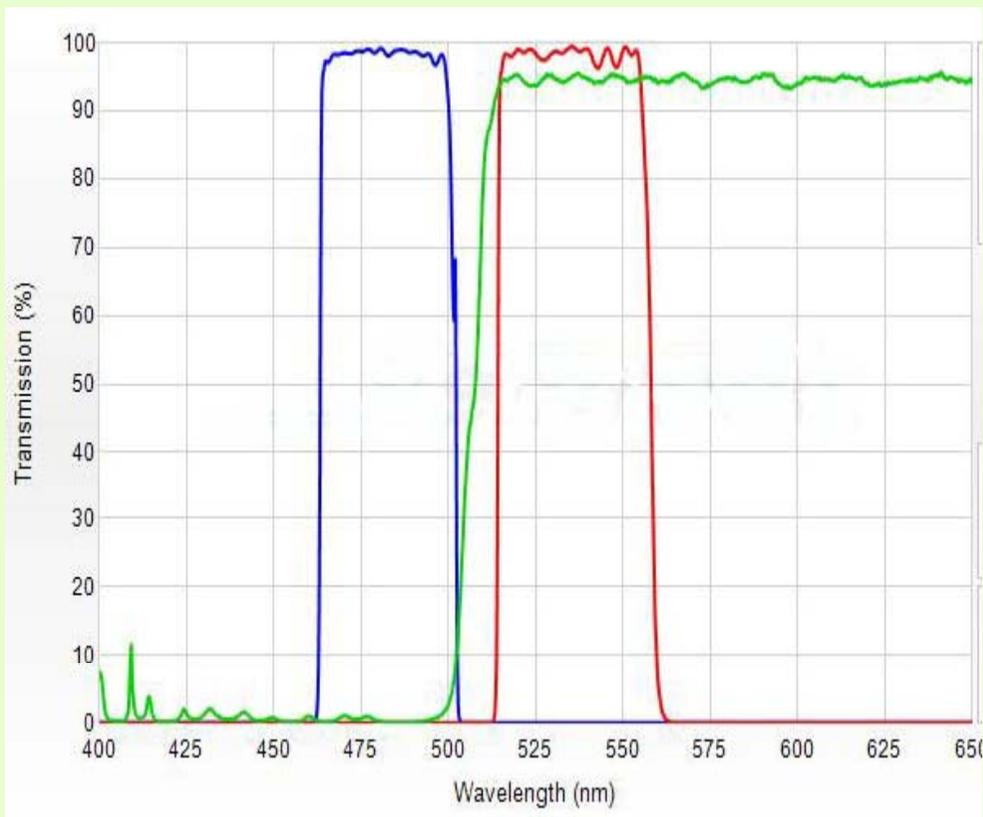
Comparaison de filtres



Pour un même fluorochrome, ces filtres ont:

- des transmission max différentes
- des bandes passantes différentes

Comparaison de filtres



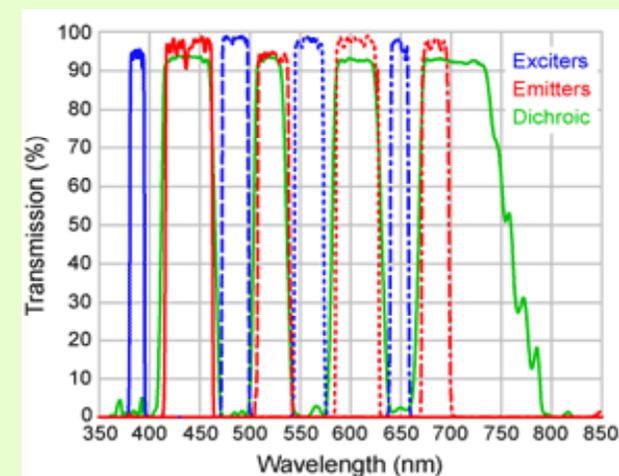
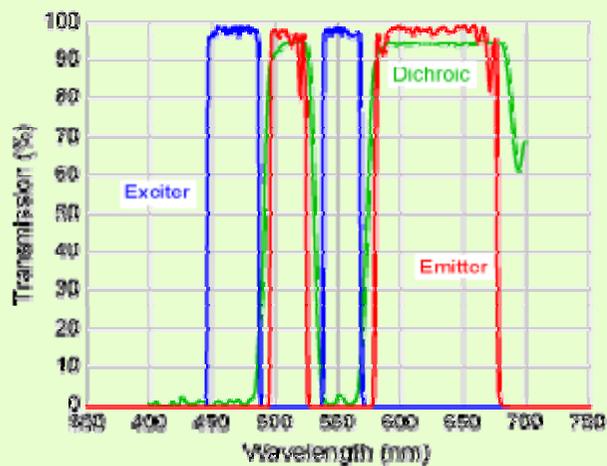
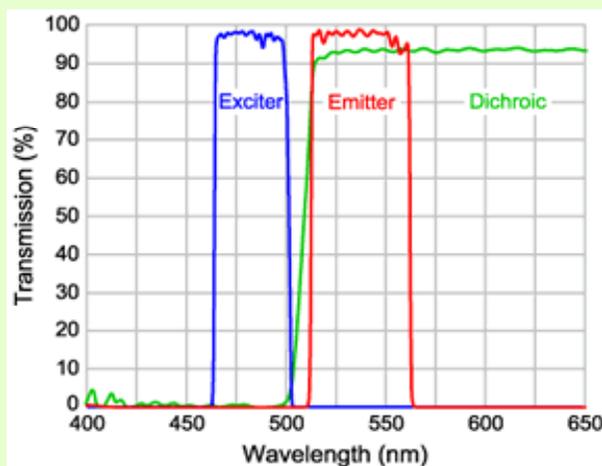
Pour un même fluorochrome, ces filtres ont:

- des transmission max différentes
- des bandes passantes différentes

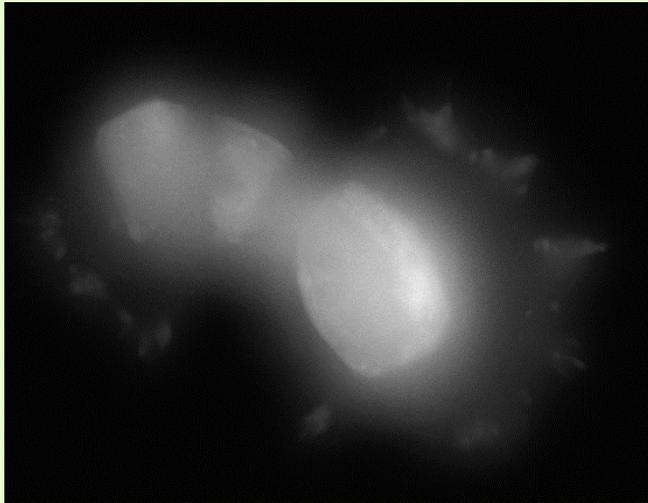
Bien choisir les filtres d'excitation, d'émission et miroir dichroïque selon les fluorochromes à observer

Penser à prendre des filtres à bande passante assez étroite pour éviter les overlaps

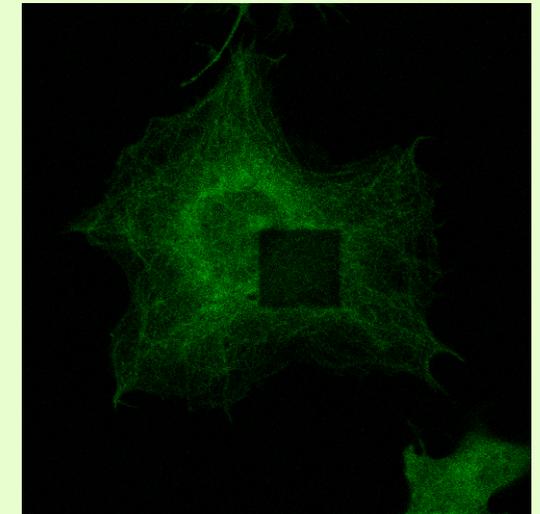
Il existe des blocs filtres multi band (double, triple, quadruple) qui ont plusieurs bandes passantes en excitation, émission et dichroïque. Plus il y a de bandes plus le risque d'overlap est grand.



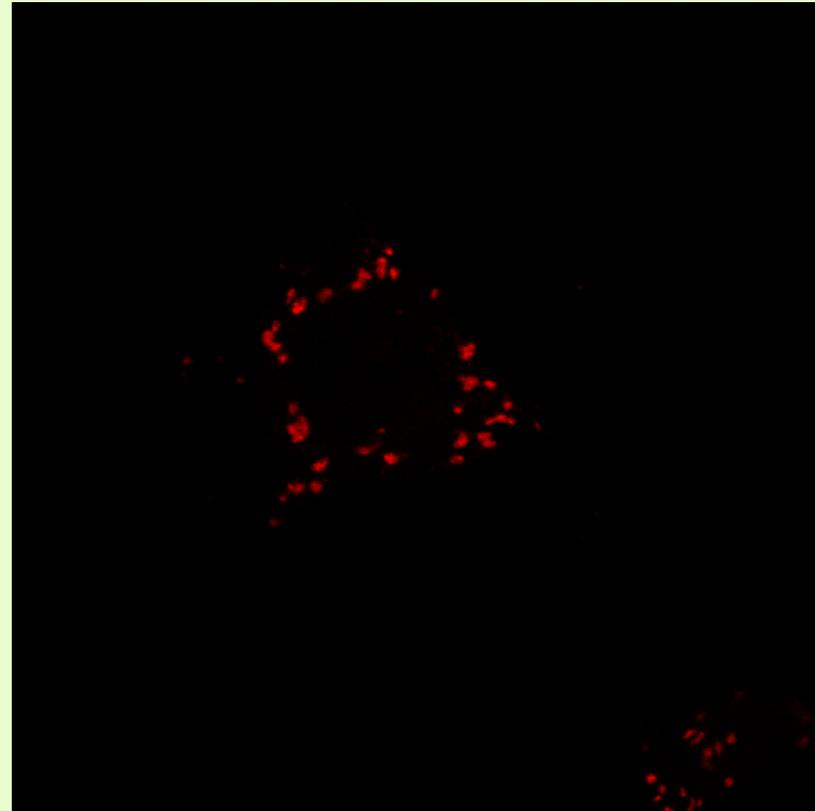
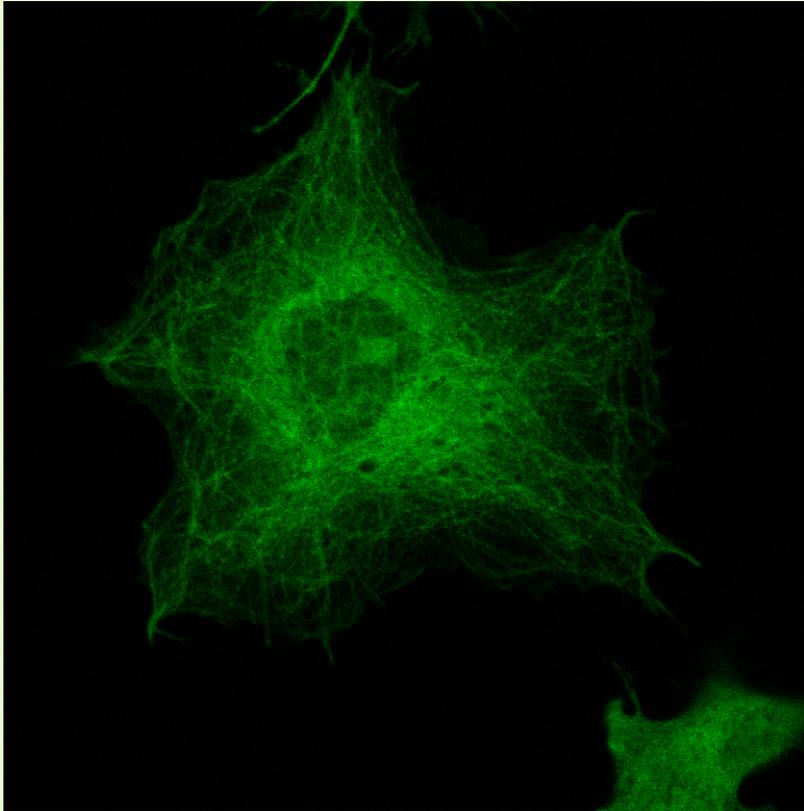
- Photodestruction, phototoxicité de l'échantillon (bloquage des cellules, surchauffe,.....)



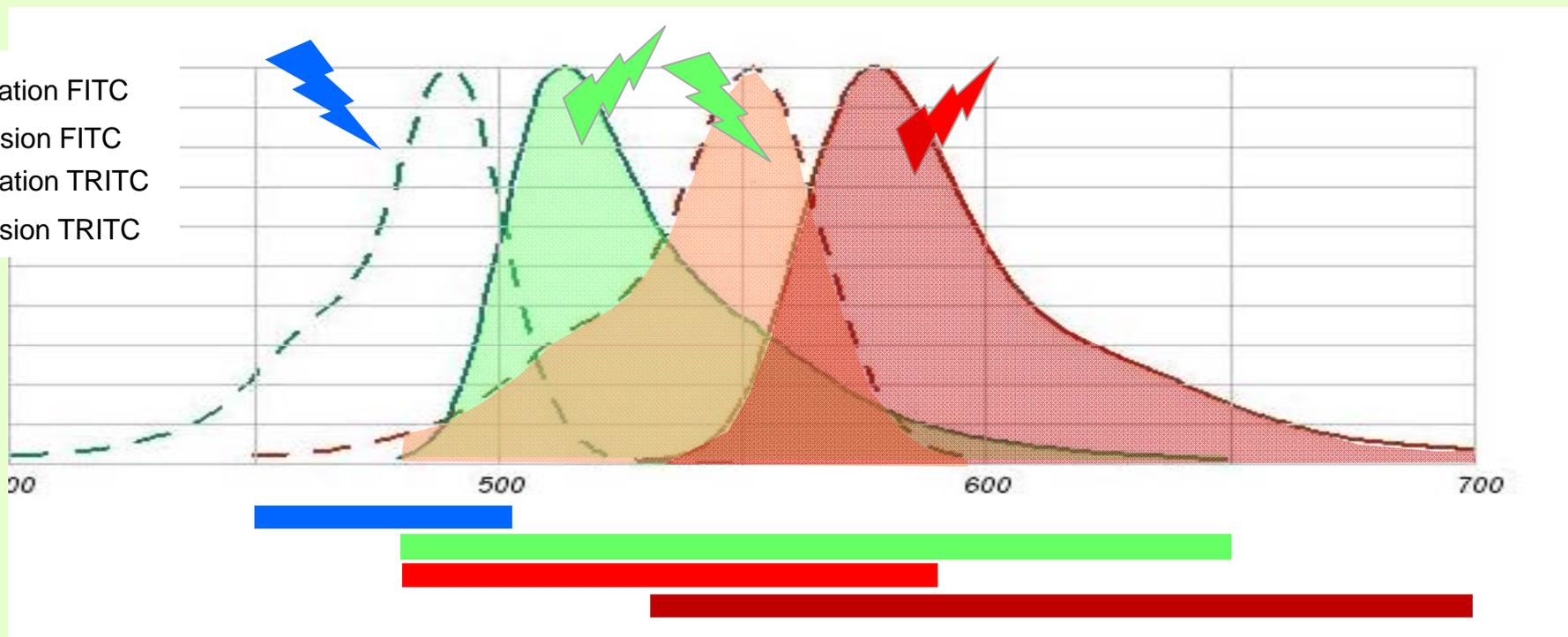
- Photobleaching du fluorochrome (photobleaching): perte du signal, irréversible



- Du à la préparation (fixation, montage...)
- Du au filtre (overlap)

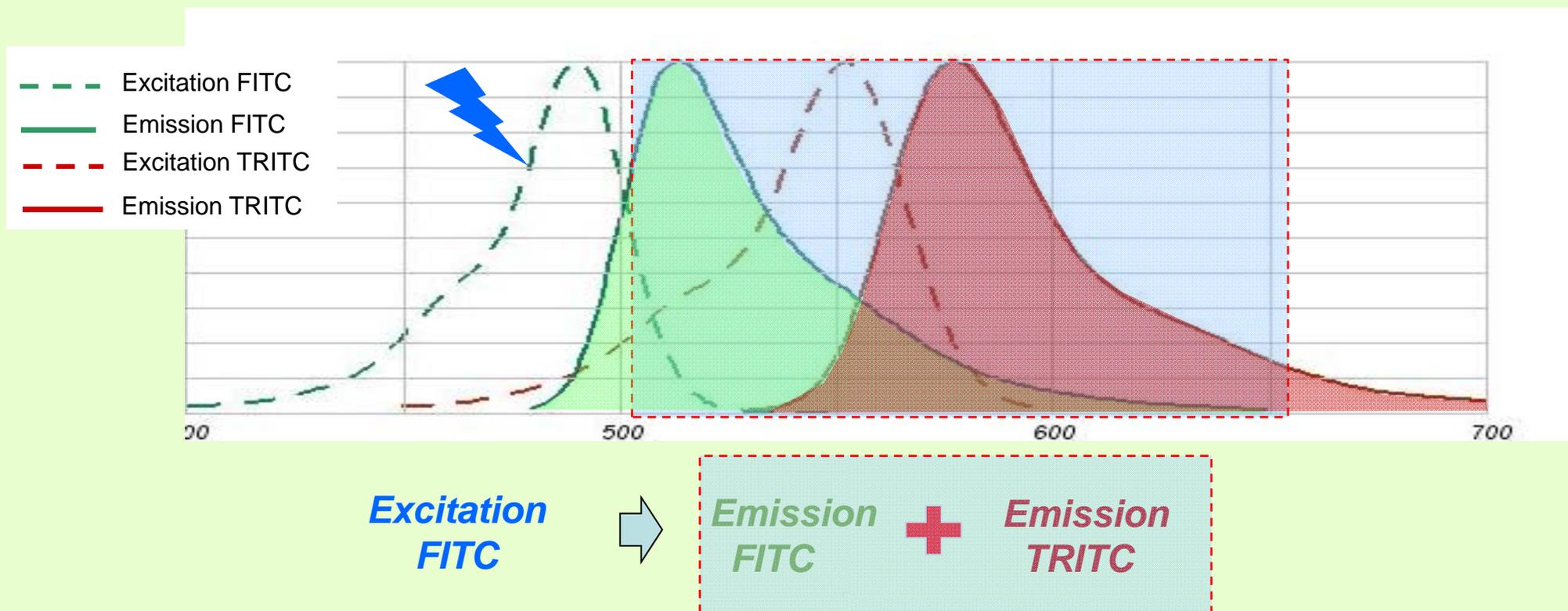


D'un point de vue fluorescence...

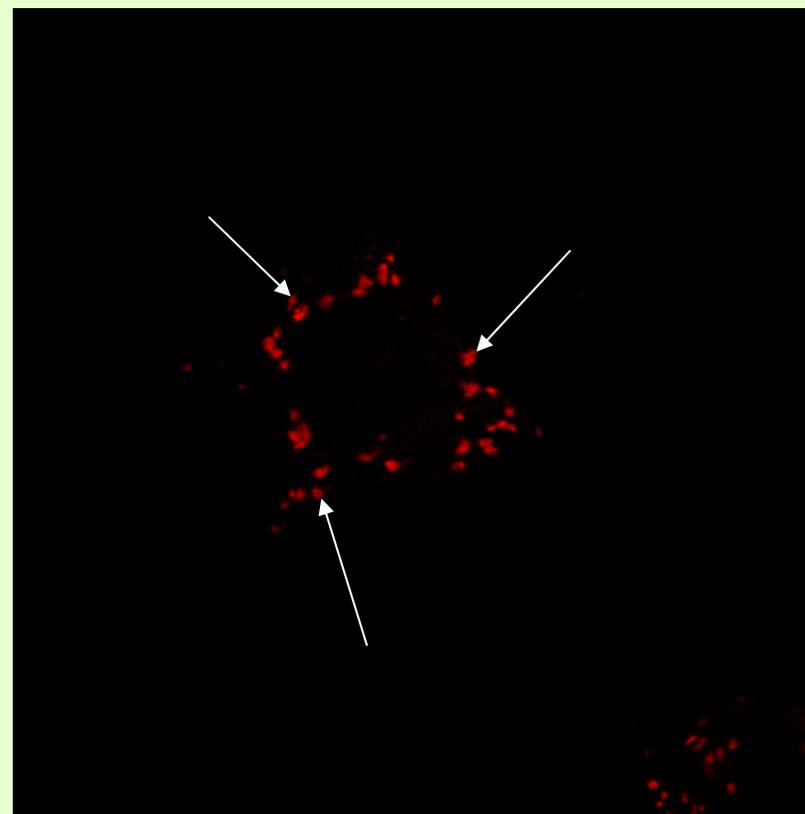
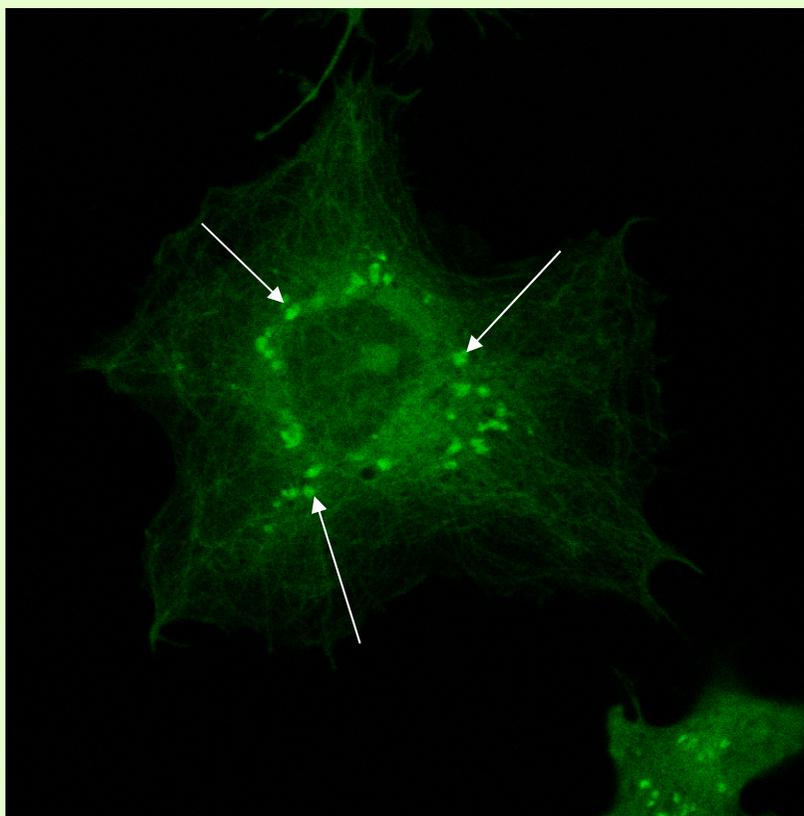


Double marquage FITC/TRITC

Si je choisis un filtre d'émission assez large pour récupérer toute la fluo du FITC



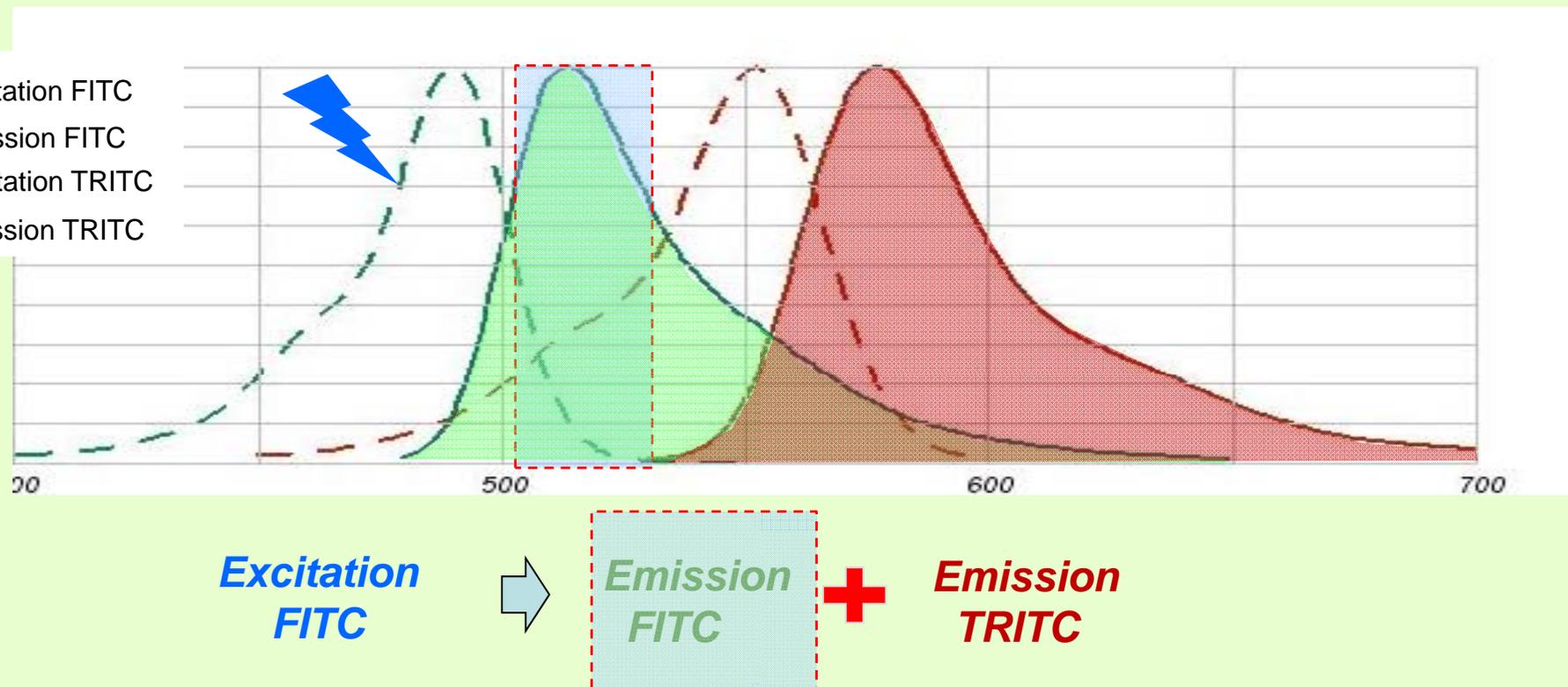
Filtre d'émission FITC trop large >> récupère émission aussi TRITC

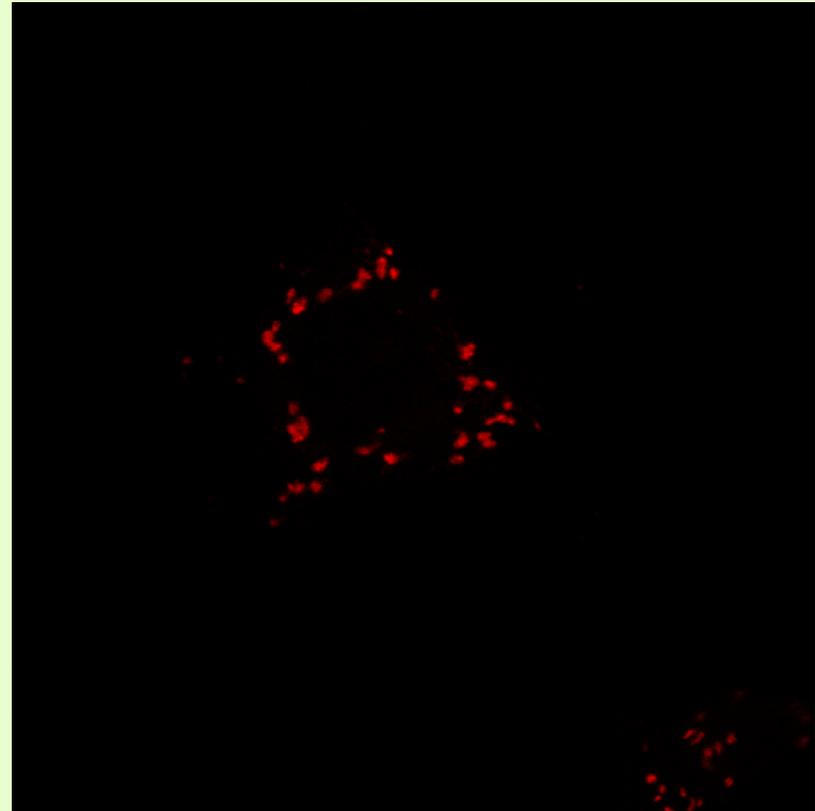
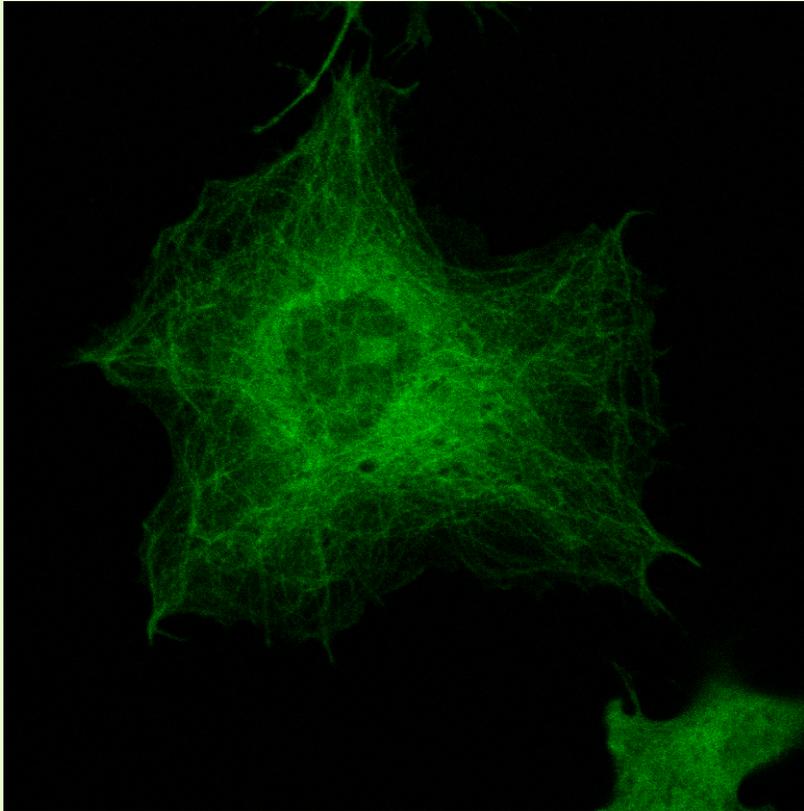


Passage du TRITC dans le filtre FITC: on voit les spots

Double marquage FITC/TRITC

Filtre d'émission FITC restreint, qui s'arrête là où commence la fluorescence du TRITC >> je ne récupère QUE l'émission du FITC (même si le TRITC émet aussi de la fluorescence)



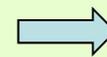


Dans la vraie vie....parfois...

⚡ signal TRITC > signal FITC



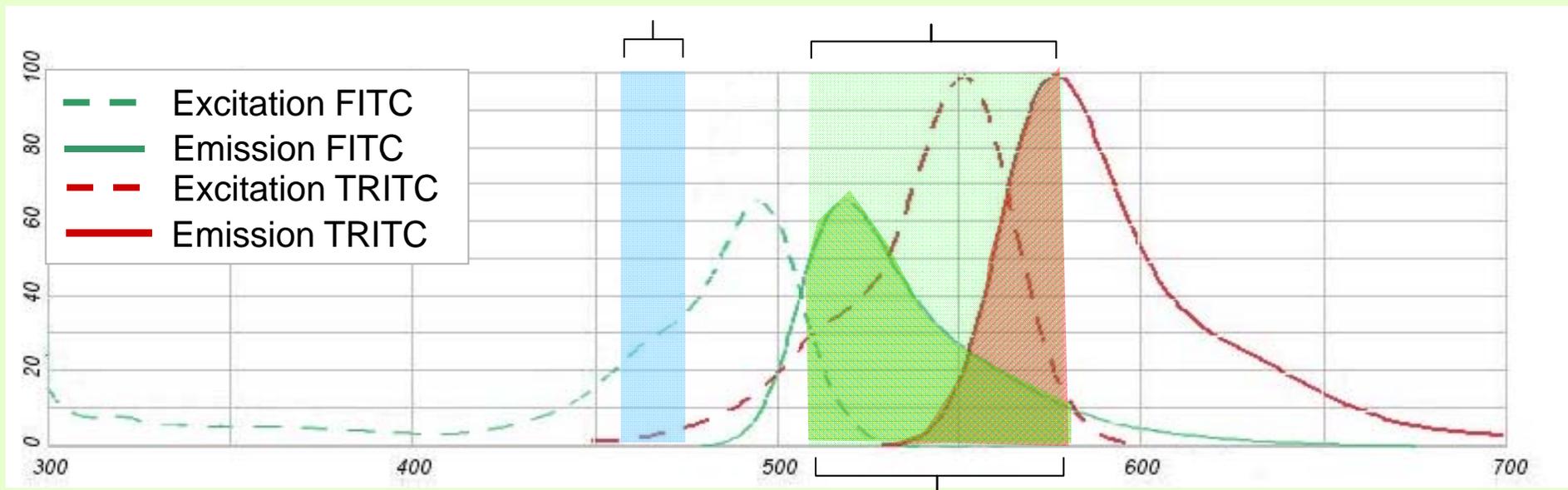
⚡ Filtres d'émission inadéquats



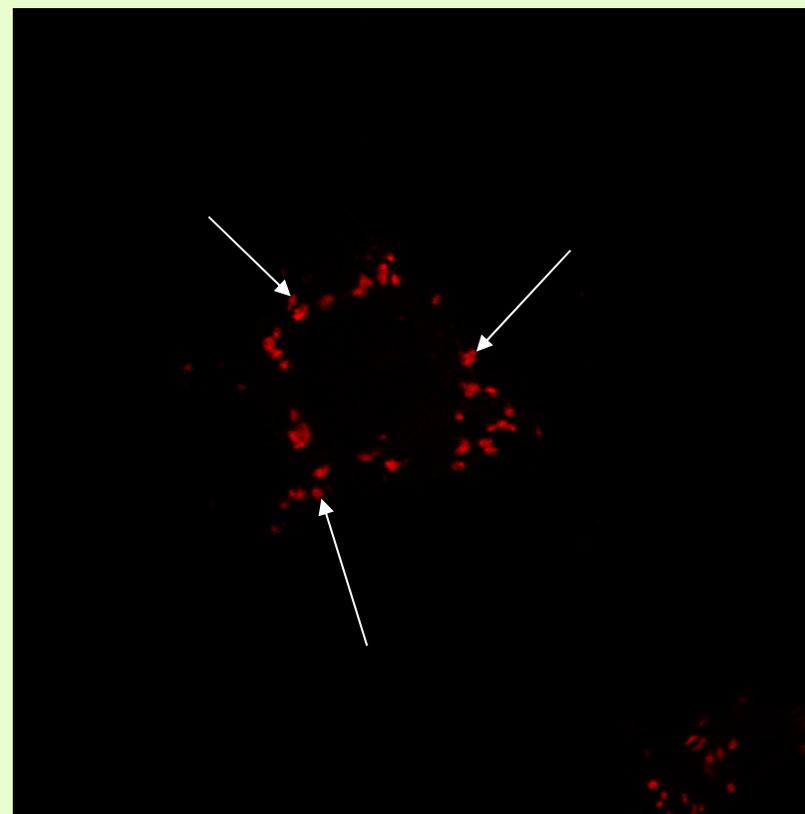
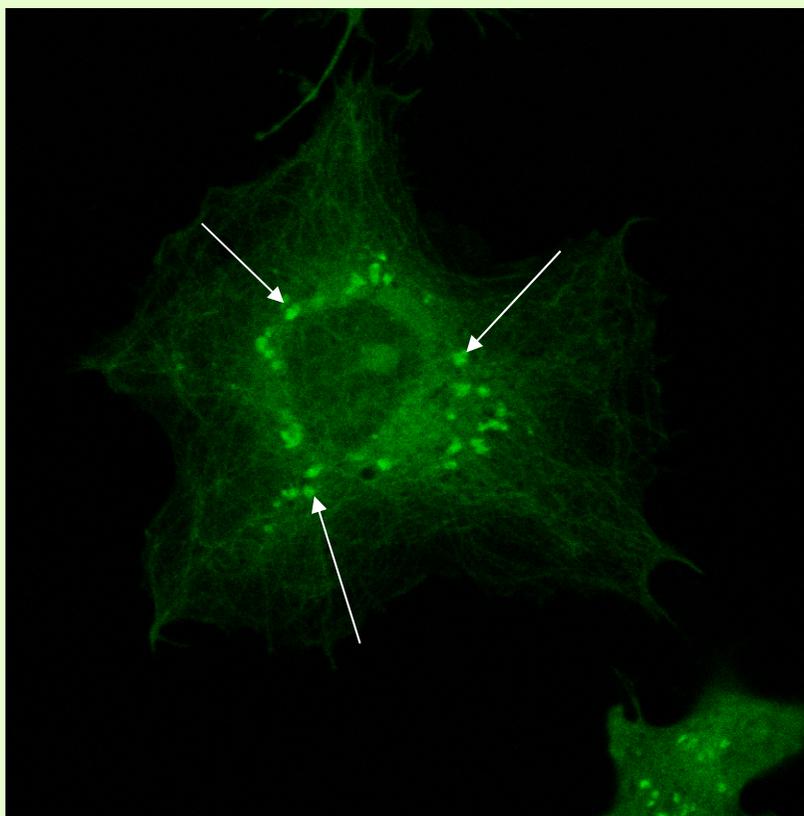
(parce que le marquage TRITC est plus fort et/ou parce que le filtre d'excitation du FITC n'est pas centré sur son Emax)

Filtre excitation
FITC pas sur Emax

Filtre émission
FITC trop large



Détection FITC+TRITC



Passage du TRITC dans le filtre FITC: on voit les spots