

# La fluorescence et ses applications : quelques réflexions

# Ce qui affecte l'émission de fluorescence (spectre, rendement quantique)

Modification de  
l'environnement

Quenching

Photobleaching

Excimères,  
self-quenching

pH

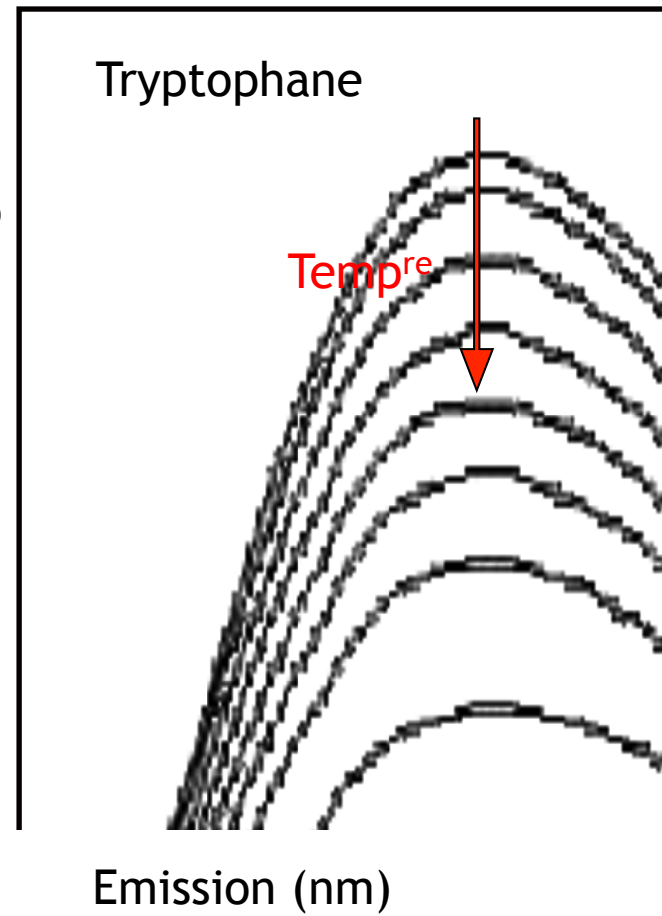
*Filtre interne : non-linéarité de la réponse*

*Turbidité : diffusion*

*Température*

*... etc...*

Intensité  
fluorescence



Température constante indispensable

# Ce qui affecte l'émission de fluorescence (spectre, rendement quantique)

## Quelques applications

Modification de l'environnement	⇒	interactions, liaison de ligands, changements de conformation...
Quenching		accessibilité, FRET
Photobleaching	⇒	FRAP, FLIP
Excimères, self-quenching	⇒	fusion de membranes, hybridation ADN
pH	⇒	compartmentation, potentiels...

*Filtre interne : non-linéarité de la réponse*

*Turbidité : diffusion*

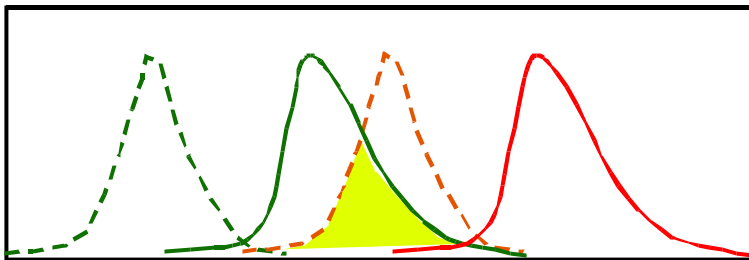
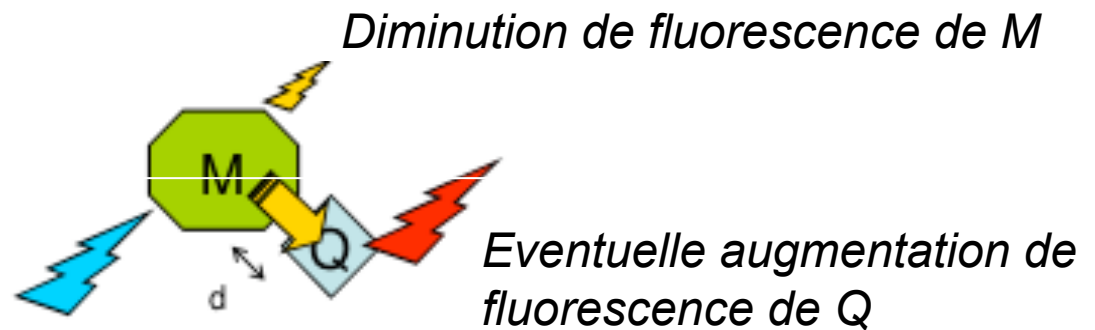
*Température*

*... etc...*

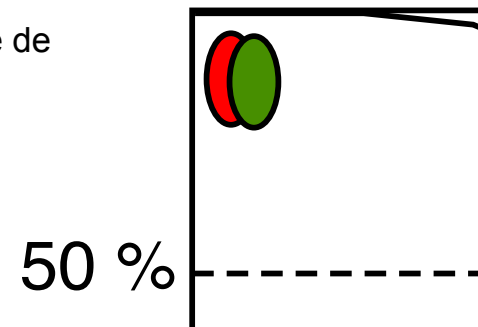
# Quenching

- Réduction de l'intensité de fluorescence en présence d'espèces oxydantes (notamment  $O_2$ ), de sels de métaux lourds ou de composés halogénés
- Le quenching peut résulter du transfert d'énergie de résonance vers un accepteur

## FRET



Efficacité de transfert



# Le quenching de fluorescence

- Statique

le "quencher" forme un complexe non fluorescent avec le chromophore.

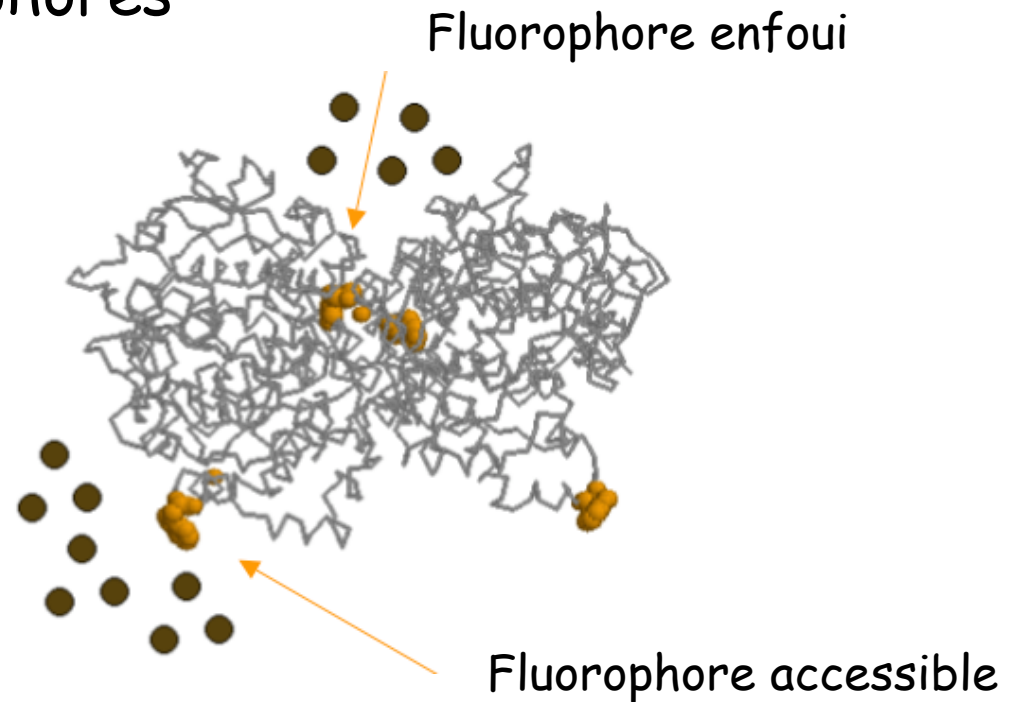
$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$$

- Dynamique (collisionnel) : interactions dipôle-dipôle  
le "quencher" interagit avec le chromophore dans l'état excité  
retour à l'état fondamental sans émission de fluorescence

$$F_0/F = 1 + K_a[Q]$$

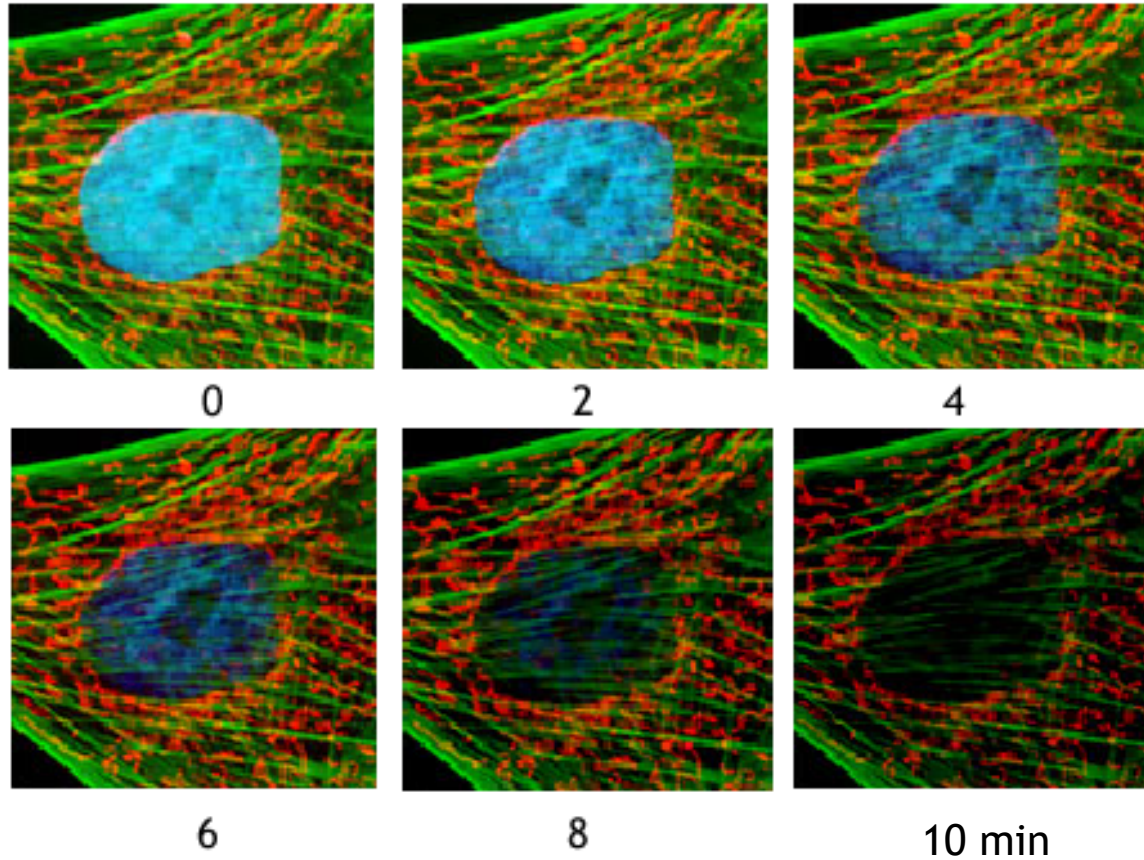
*(Filtre interne, turbidité non considérés ici)*

# Application du quenching : accessibilité de fluorophores



Iodure  
Acrylamide

# Le photobleaching : variable selon les fluorophores



Fibroblastes

Noyaux : Hoechst 33258

Mitochondries :  
MitoTracker Red CMXRos

Actine cytosquelette :  
Phalloidine-Alexa 488

## Comment réduire le photobleaching ?

- en milieu liquide : agitation continue

- en microscopie de fluorescence

- choix du fluorophore
- limiter le temps d'exposition
- réduire l'intensité d'excitation
- utiliser des agents "antifading"

} mais cela  
réduira le signal ...

## Agents anti "fading" les plus courants (neutralisation des ROS)

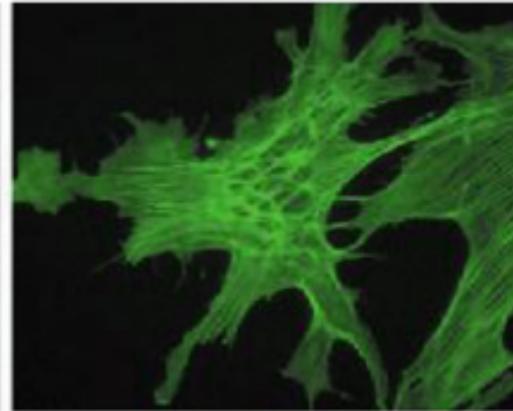
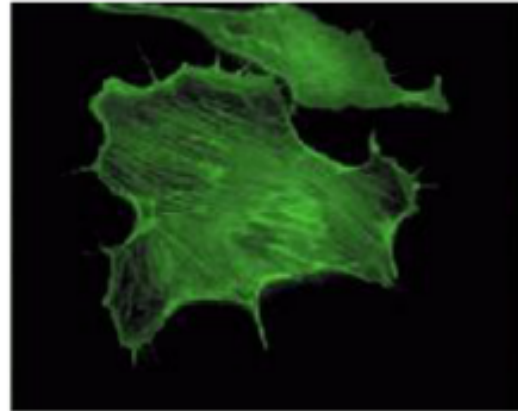
DIY (Sigma)  
P-phenylenediamine  
N-propyl gallate  
DABCO

Slowfade  
Prolong Antifade  
Vectashield

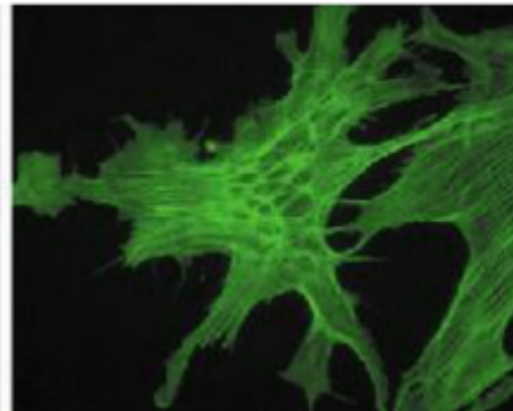
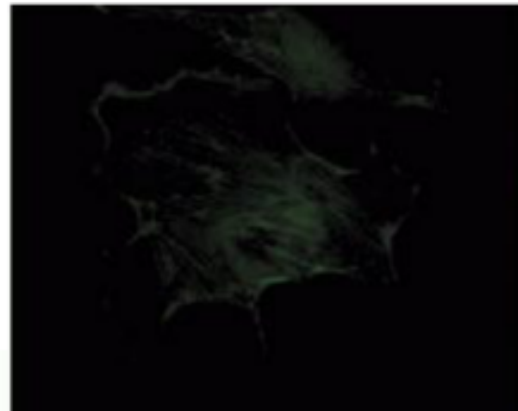
Molecular Probes (Invitrogen)  
Molecular Probes (Invitrogen)  
Vector Laboratories

Phalloïdine-fluoresceine

id + Prolong Antifade

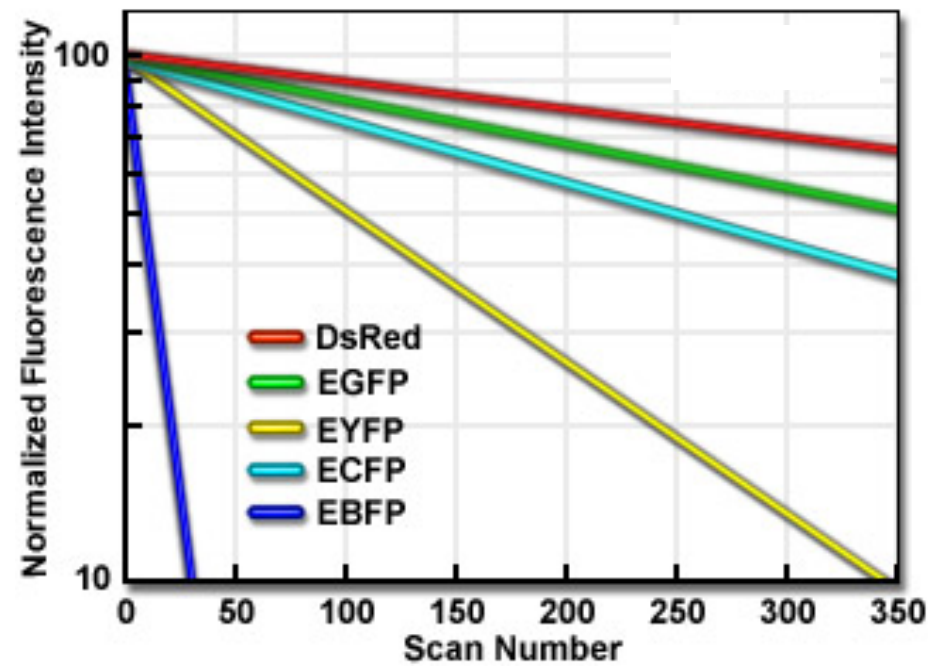
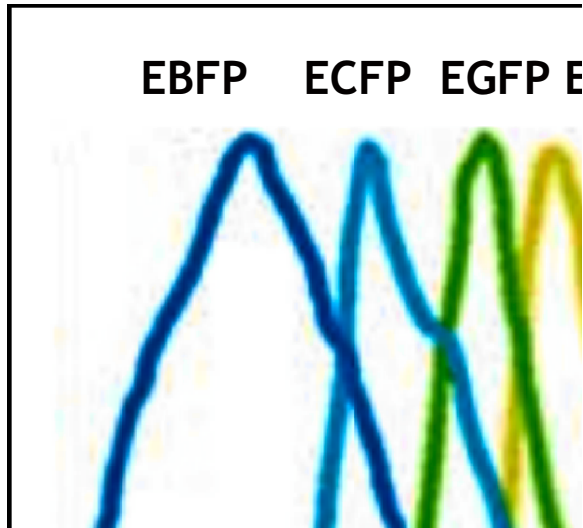


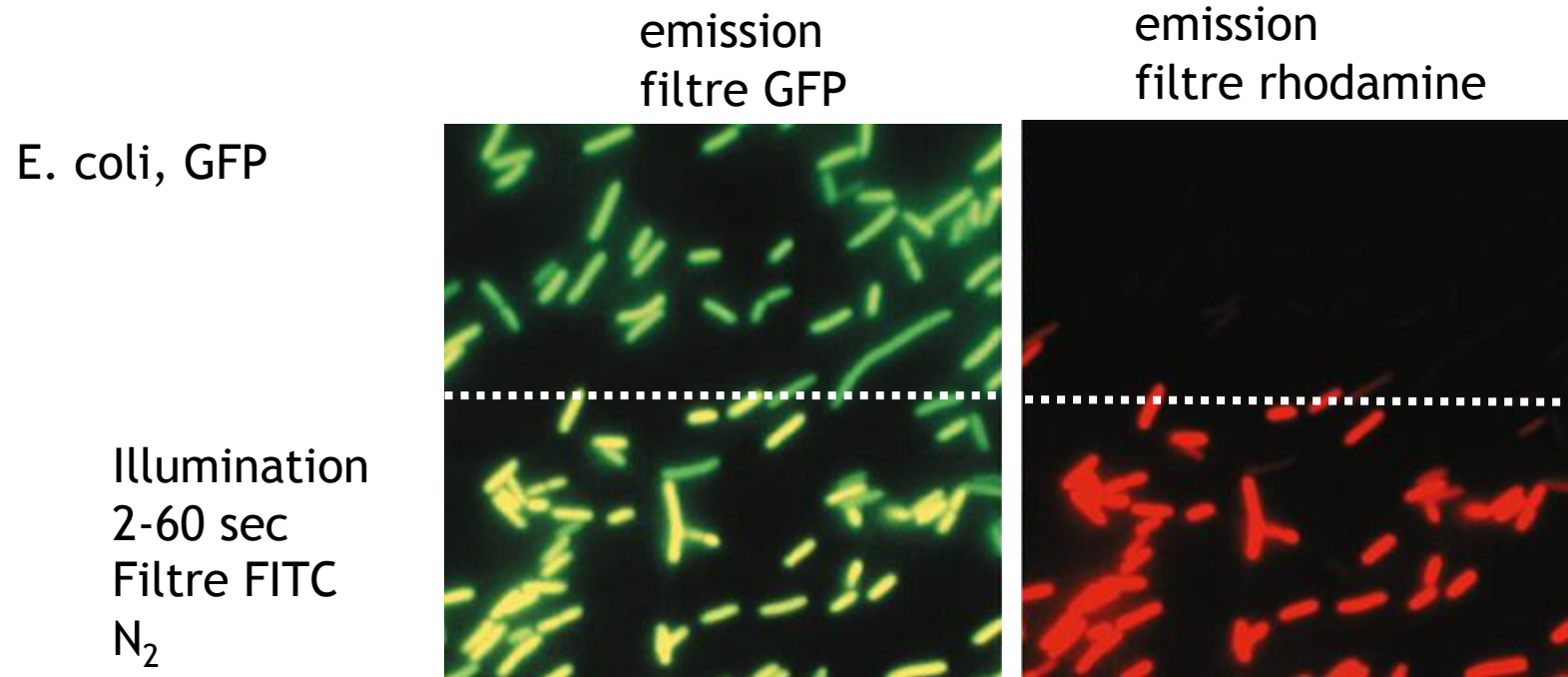
30 secondes  
illumination



*Molecular Probes Invitrogen*

# Le photobleaching des variants de la GFP





Illumination 488 nm / 30 msec

0

0.08 s

0.35 s

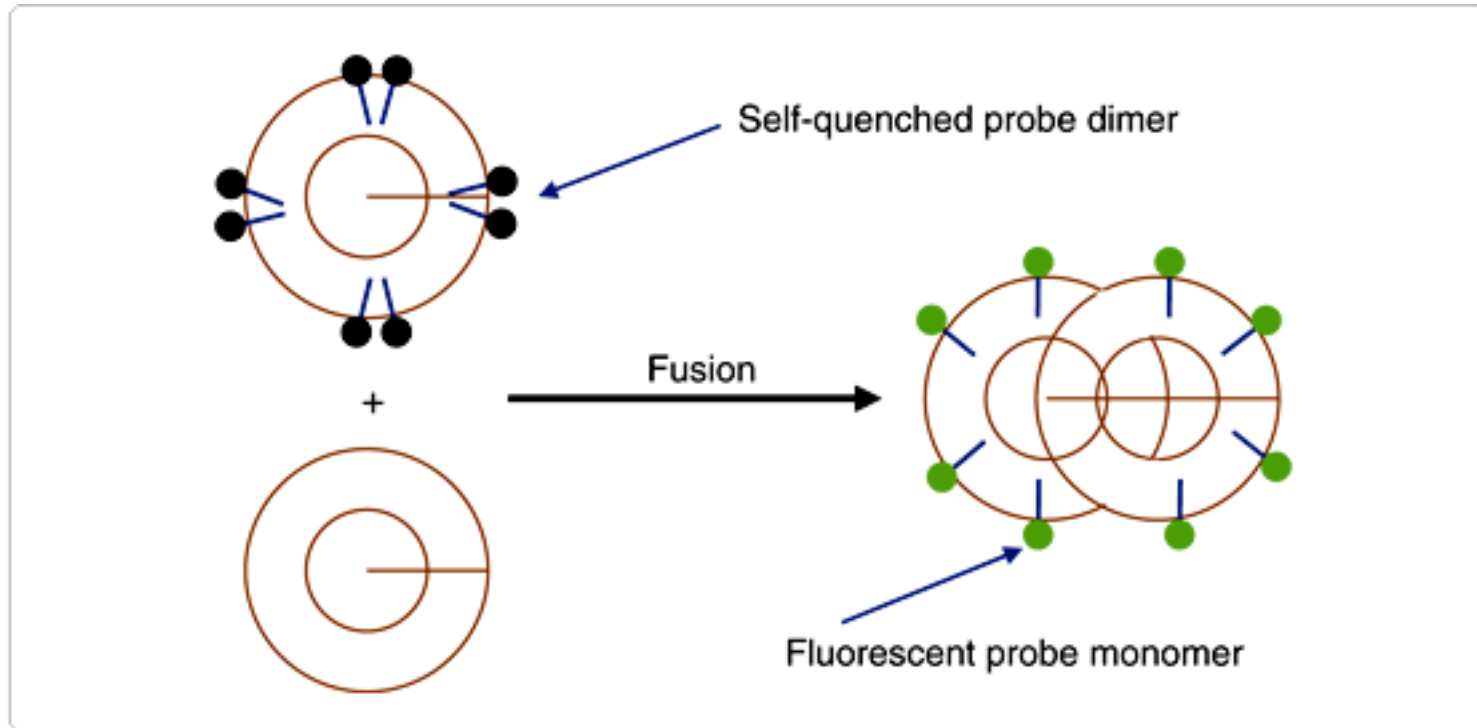
0.62 s

4.7 s

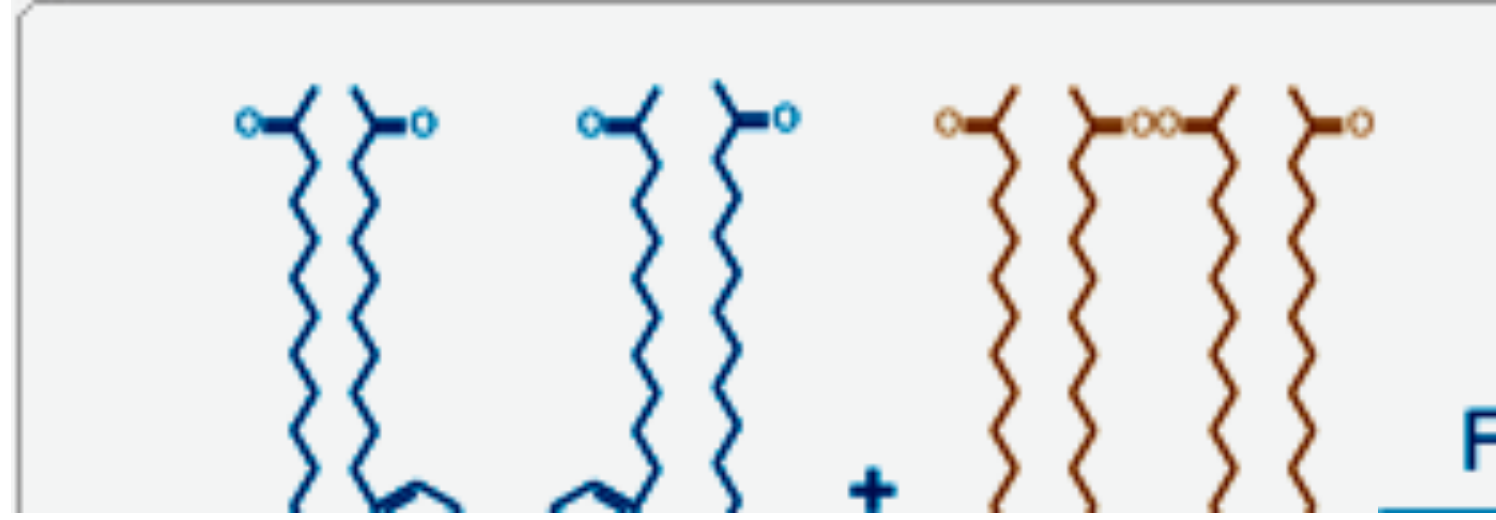
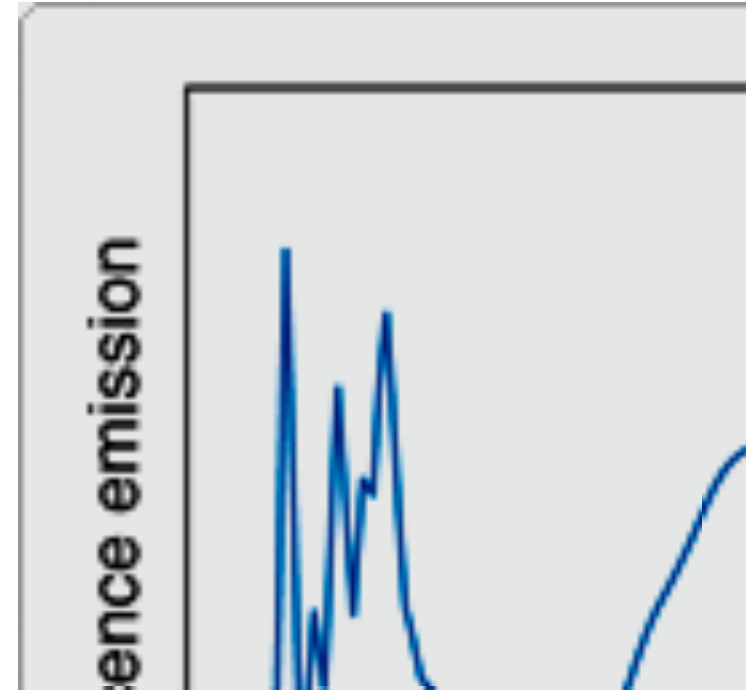








Octadecyl Rhodamine B



## Excitation and Emission Spectral Profiles

