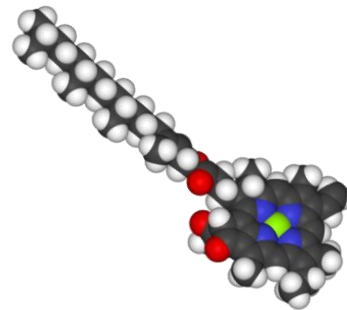


Interlude Physique de la Mesure

Fluorescence

Olivier Fauvarque, Morgan Tardivel, Clothilde Haristoy
REM/RDT/LDCM

DIY Oceanographic Sensing Rendez-vous #2 29 Mars 2024



1. Petit rappel sur la **couleur des objets**
2. Un phénomène d'optique non-linéaire : la **fluorescence**
3. FluorimétrieS
4. Focus sur la **Chlorophylle**
5. Quelques capteurs DIY
6. Fluorescence et **prix Nobel**

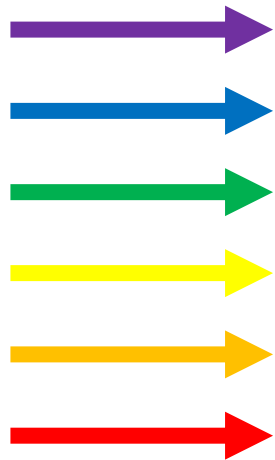
1. Petit Rappel sur la couleur des objets



Ceci n'est pas une tomate.

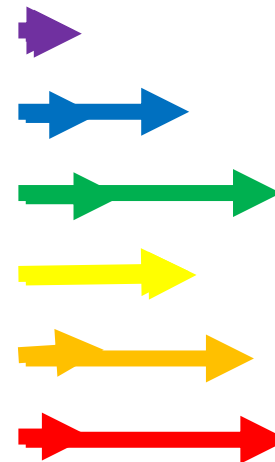


Source
lumineuse

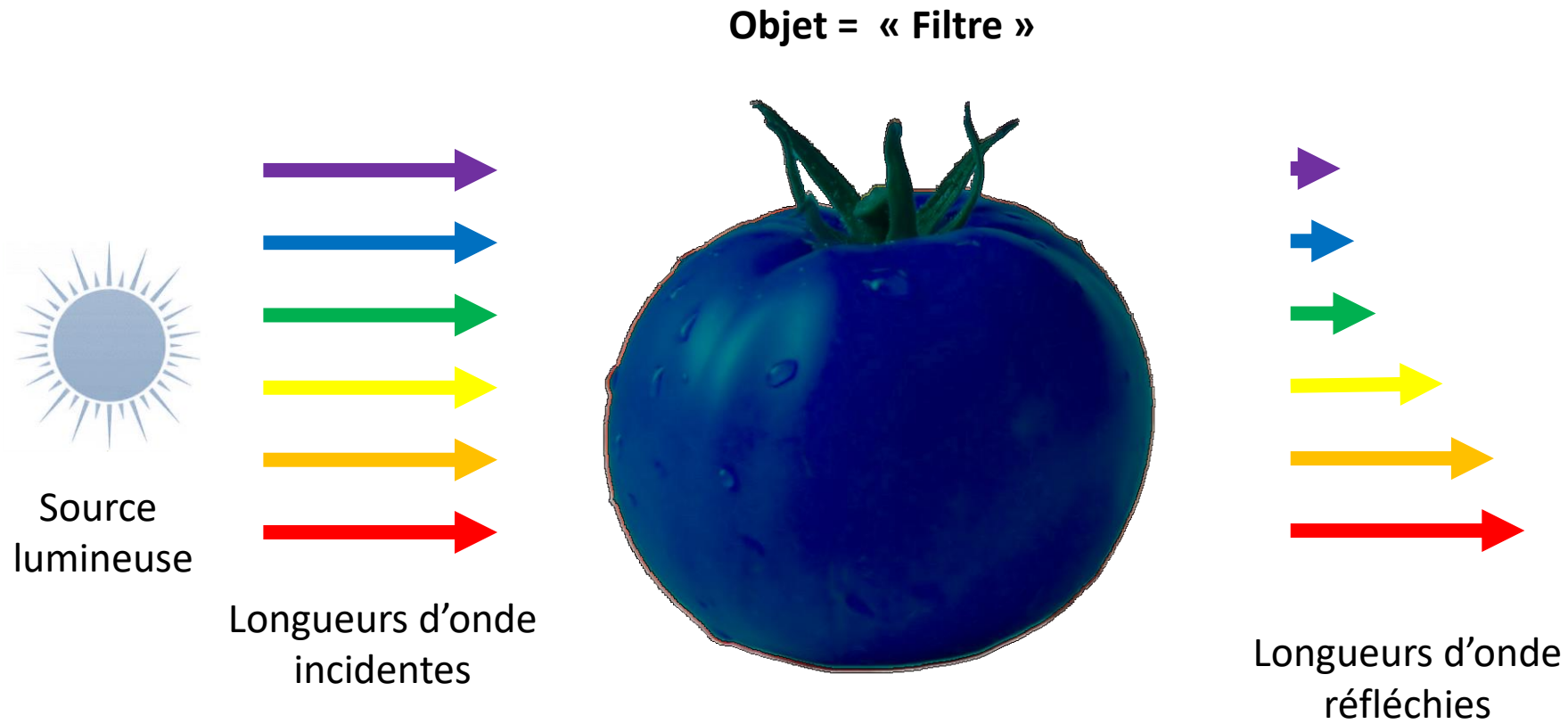


Longueurs d'onde
incidentes

Objet = « Filtre »



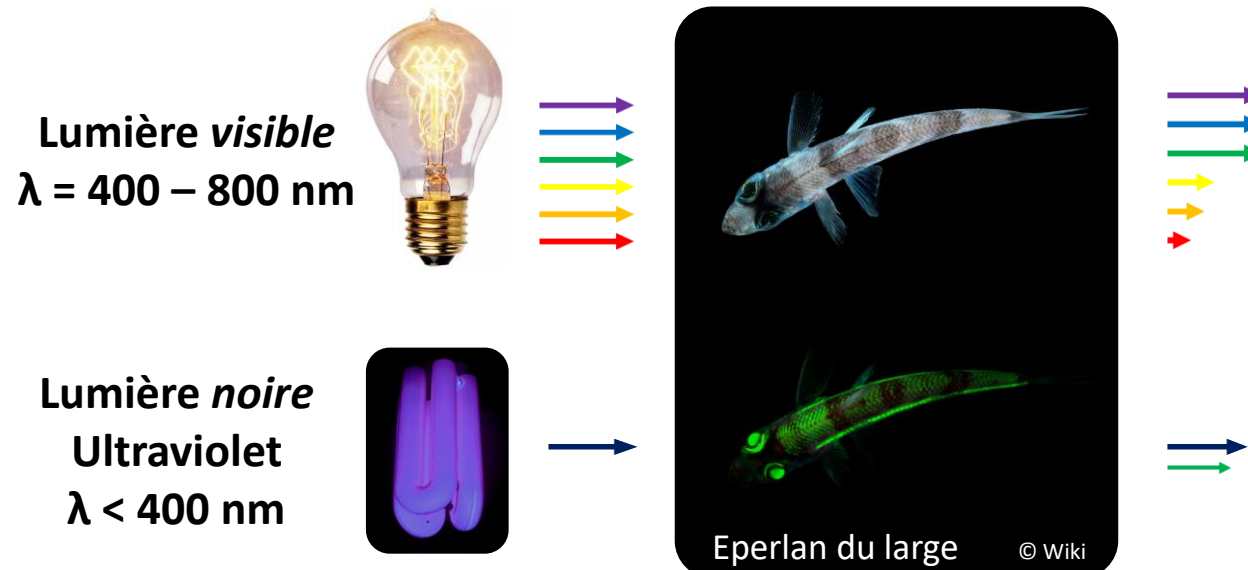
Longueurs d'onde
transmises

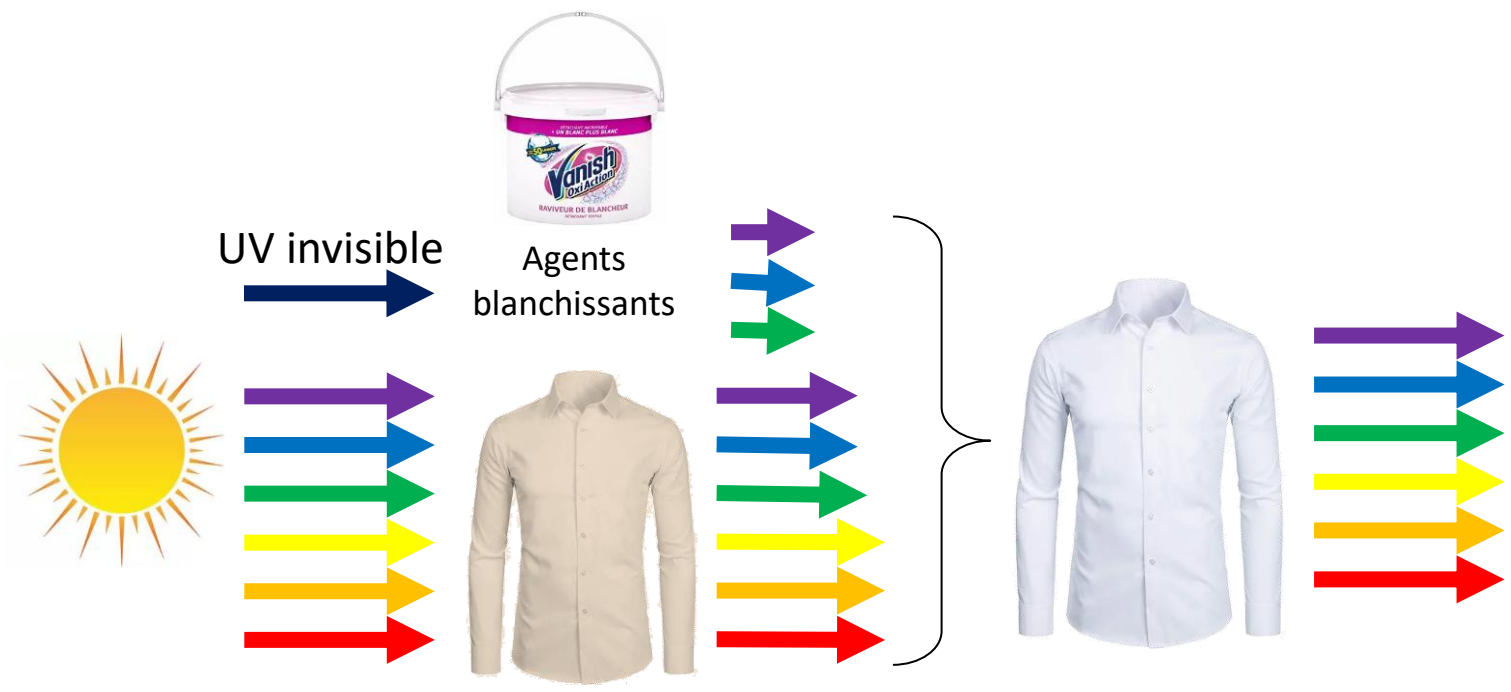
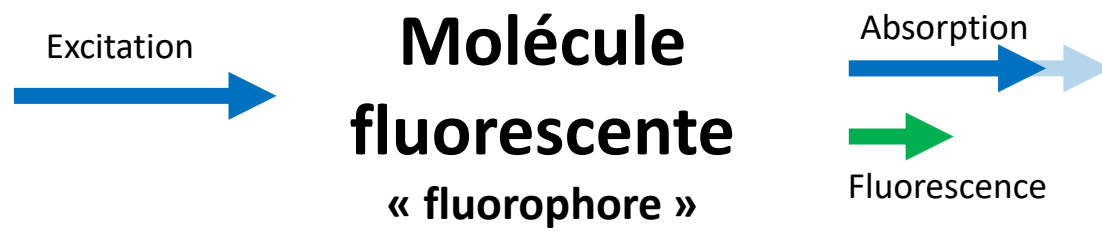


En temps normal, « pas de création de longueurs d'onde »

Optique linéaire

2. Un phénomène d'optique non-linéaire : La Fluorescence

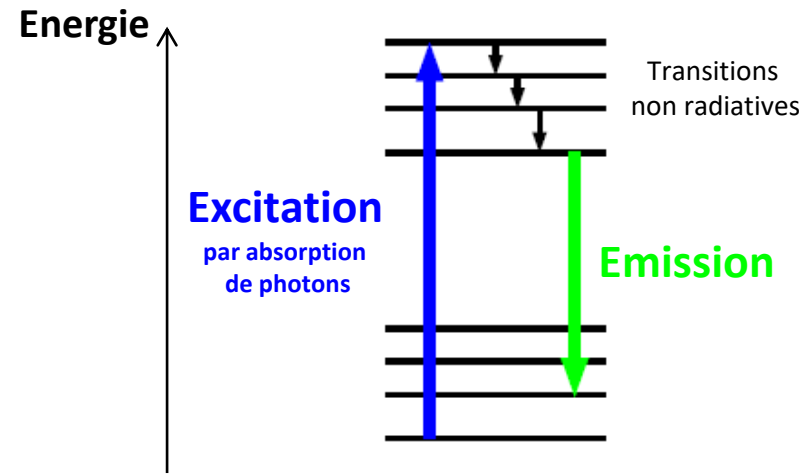






Physique de la Fluorescence

Diagramme de Jablonski



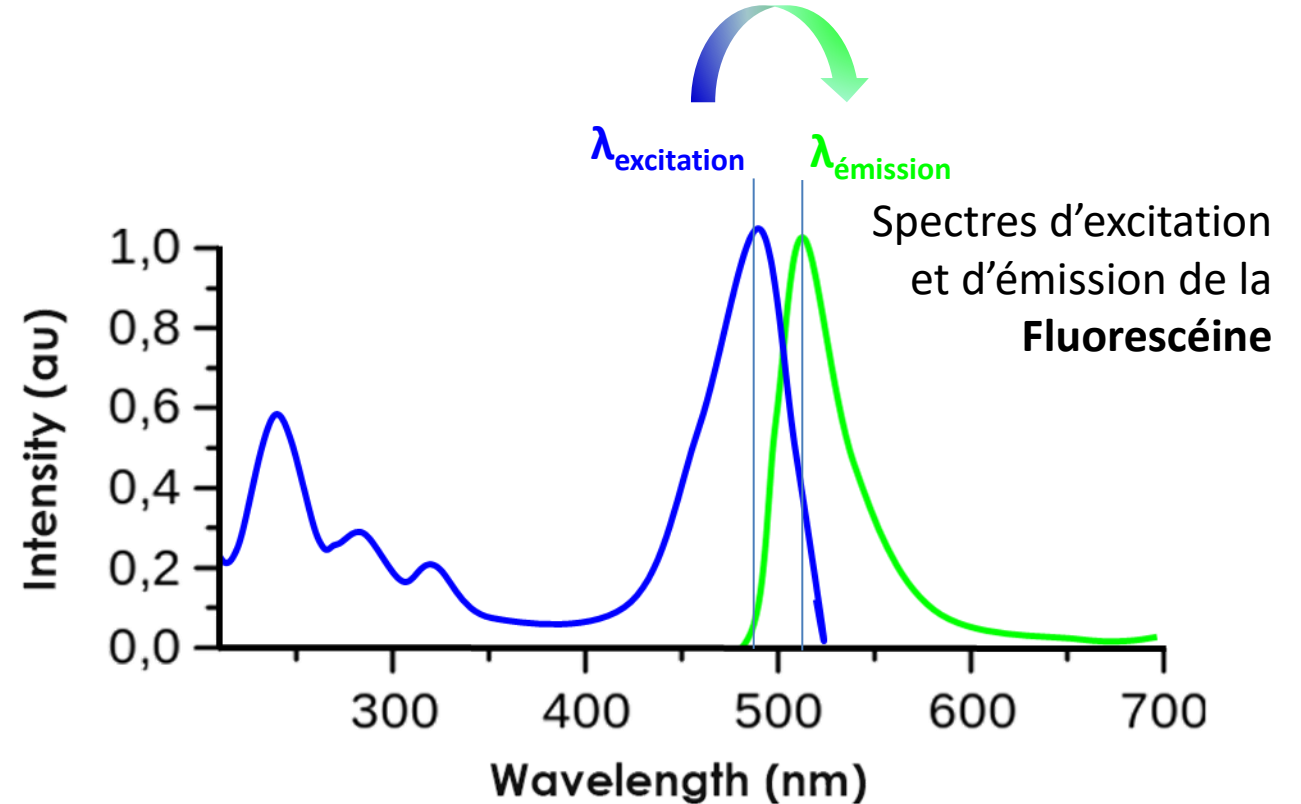
$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda}$$

$$\lambda_{\text{excitation}} < \lambda_{\text{émission}}$$

Longueur d'onde
d'absorption maximale

Longueur d'onde
d'émission maximale

Rendement quantique
Efficacité de la conversion

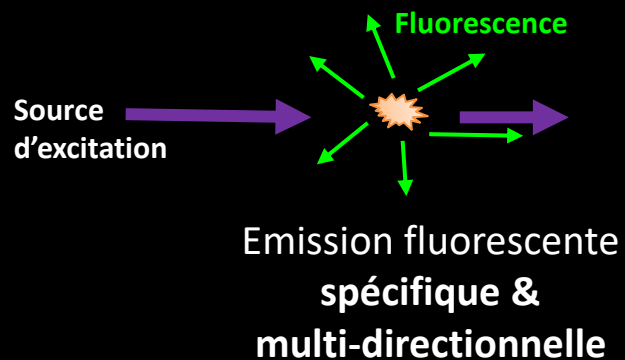


Coefficient d'absorption molaire
du fluorophore ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

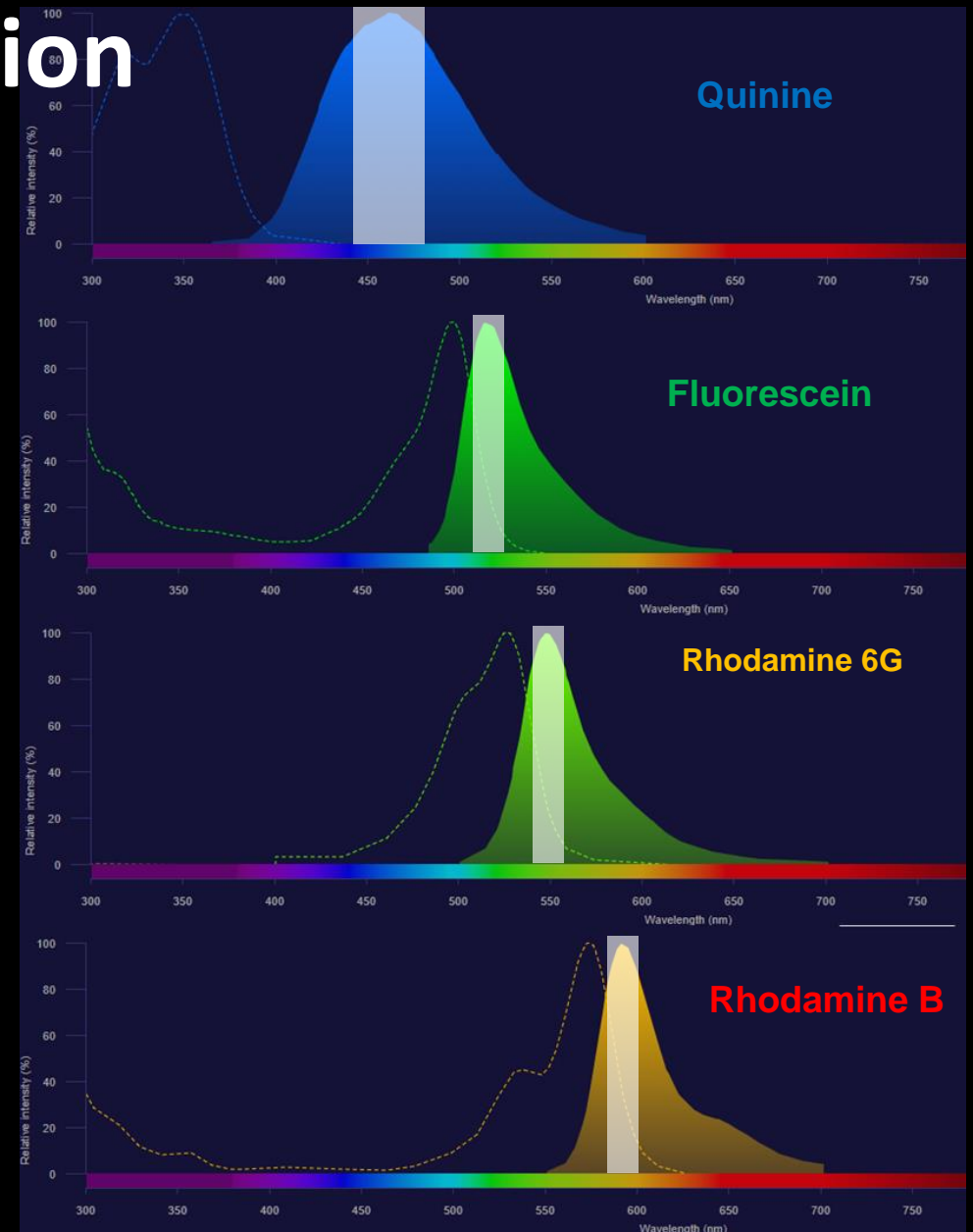
Spectres d'émission & d'absorption



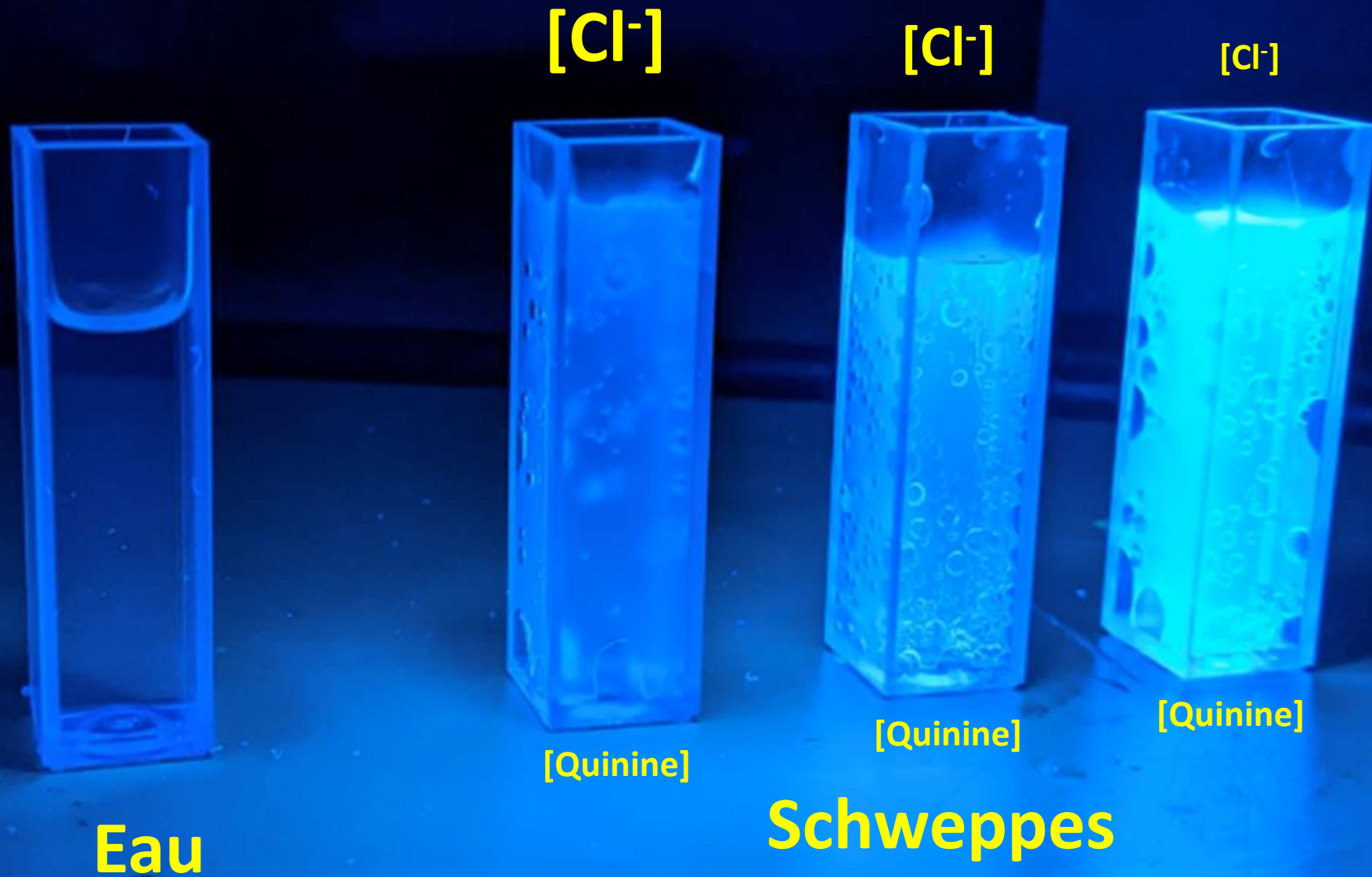
Fluorescence of different substances under UV light. Green is a **Fluorescein**, red is **Rhodamine B**, yellow is **Rhodamine 6G**, blue is **Quinine**, purple is a mixture of **quinine** and **rhodamine 6g**. Solutions are about 0.001% concentration in water. © Wiki



Pour observer la fluo :
→ Dans l'axe : **filtre Passe Bande**
→ Observation à 90° ou rétro diff

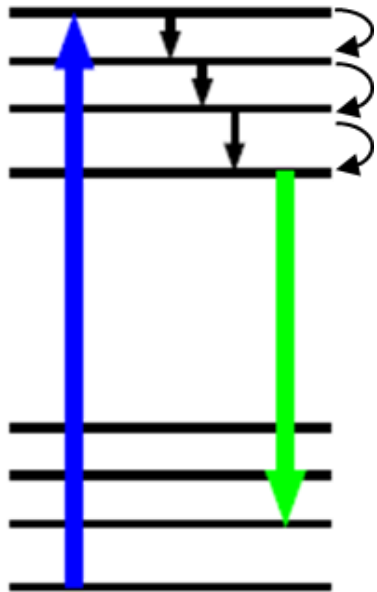


Quenching de Fluorescence

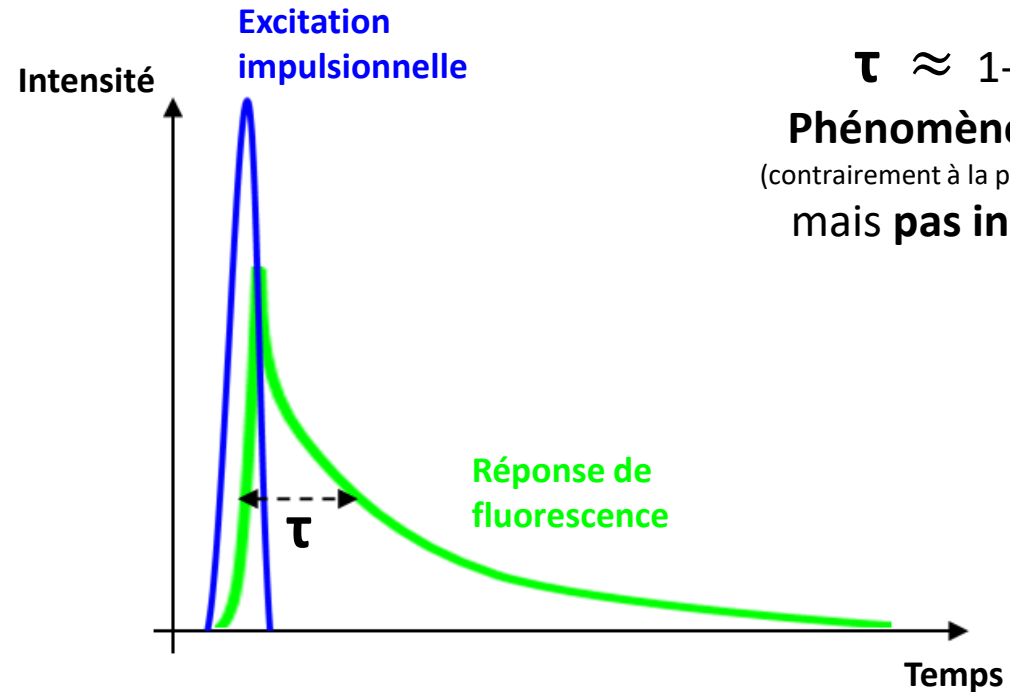


Un dernier paramètre du fluorophore

Durée de vie de l'état excité τ



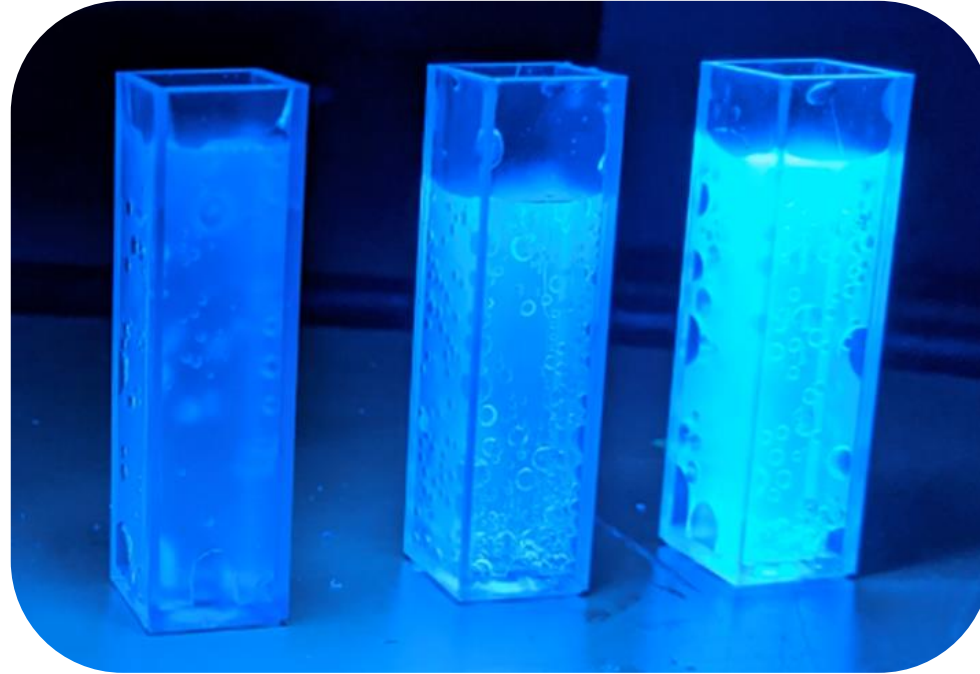
τ : temps passé
aux transitions
non radiatives



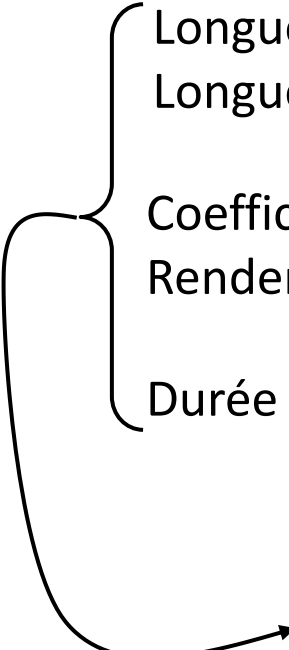
$\tau \approx 1-20$ ns
Phénomène rapide
(contrairement à la phosphorescence)
mais **pas instantané**

3. FluorimétrieS

Que mesurer, en observant quoi ?



FluorimétrieS



Longueur d'onde d'absorption maximale
Longueur d'onde d'émission maximale

Coefficient d'absorption molaire
Rendement quantique

Durée de vie de l'état excité

5 paramètres qui dépendent :

- du **fluorophore** &
- de son **environnement**
pH, $[\text{Cl}^-]$, T° , pCO_2 , etc.

Trois types de fluorimétries :

- Fluorimétrie en **intensité**

Observable : Intensité lumineuse

- **Spectroscopie** de fluorescence

Observable : spectre ou $I(\lambda)$

- ***Fluorescence LifeTime Measurement***

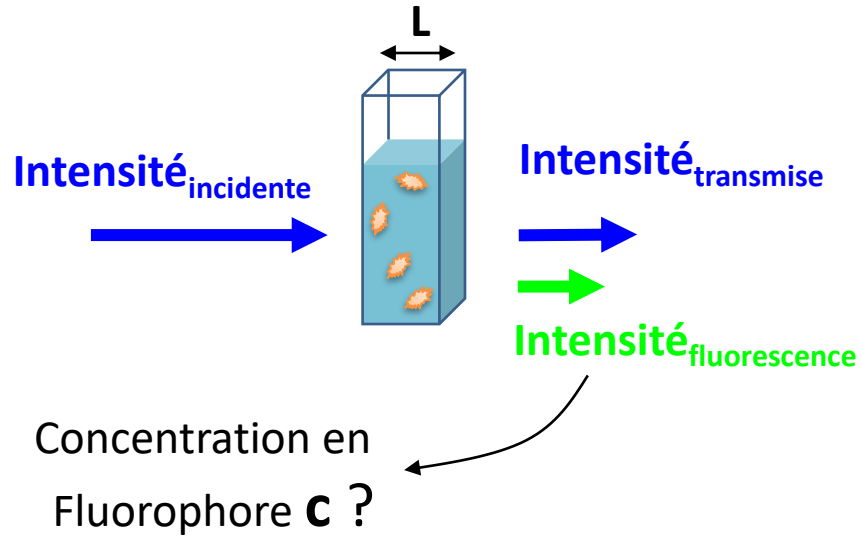
Observable : ... ça dépend ...

Ce qu'on peut mesurer :

- **Concentration** du fluorophore
- Son **environnement** s'il joue sur un des 5 paramètres

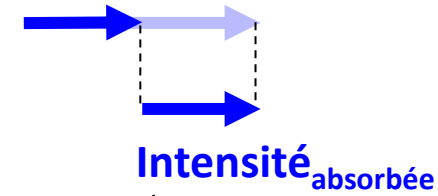
Fluorimétrie en intensité

Principe de la mesure



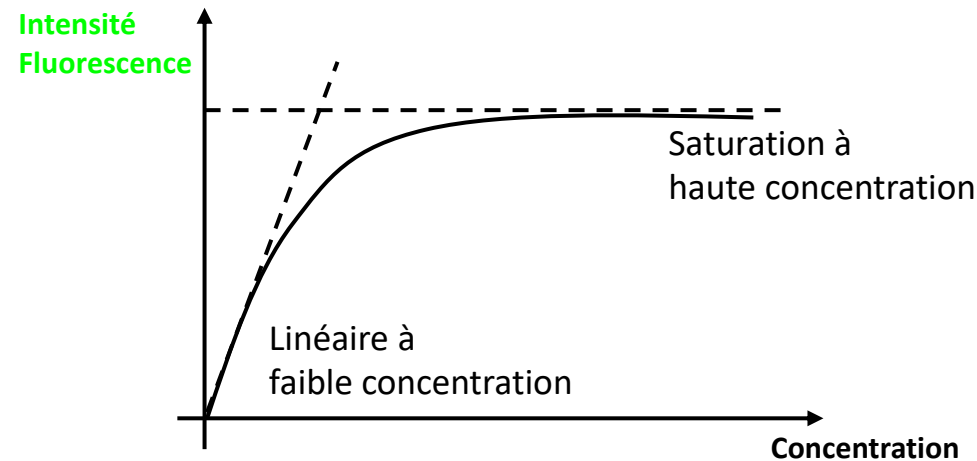
Loi de Beer-Lambert

$$\text{Intensité}_{\text{transmise}} = \text{Intensité}_{\text{incidente}} e^{-L \epsilon c}$$



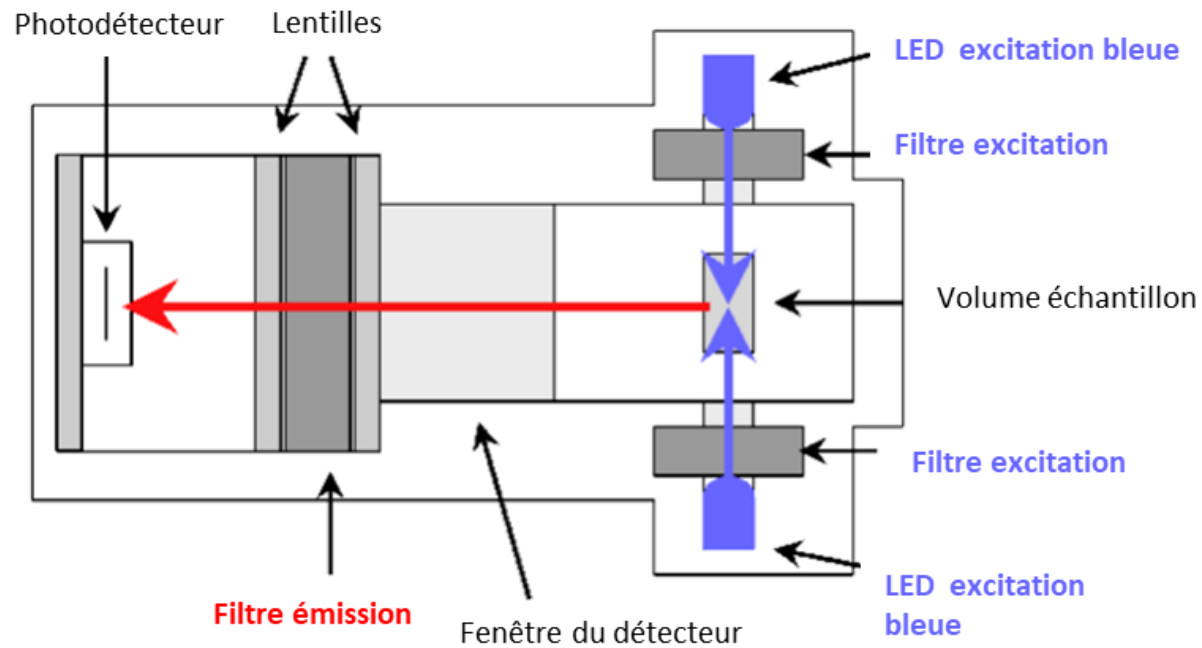
x Rendement quantique

$$\text{Intensité}_{\text{fluorescence}} = K \text{ Intensité}_{\text{incidente}} (1 - e^{-L \epsilon c})$$



Fluorimétrie en intensité

Un design typique de capteur



Fluorimètre Chlorophylle Sea Point

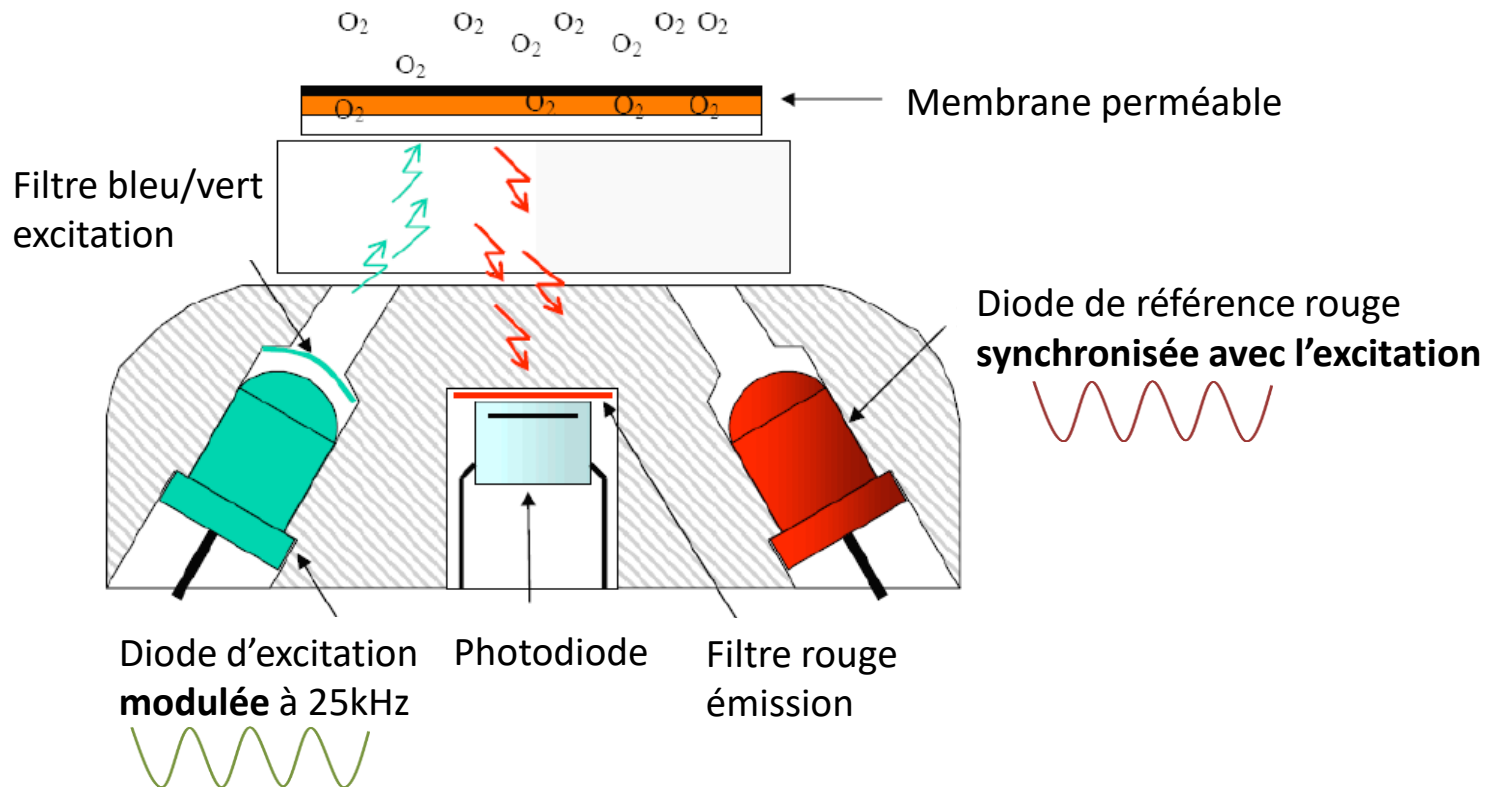
© L. Delauney Ifremer

Fluorimétrie en temps de vie

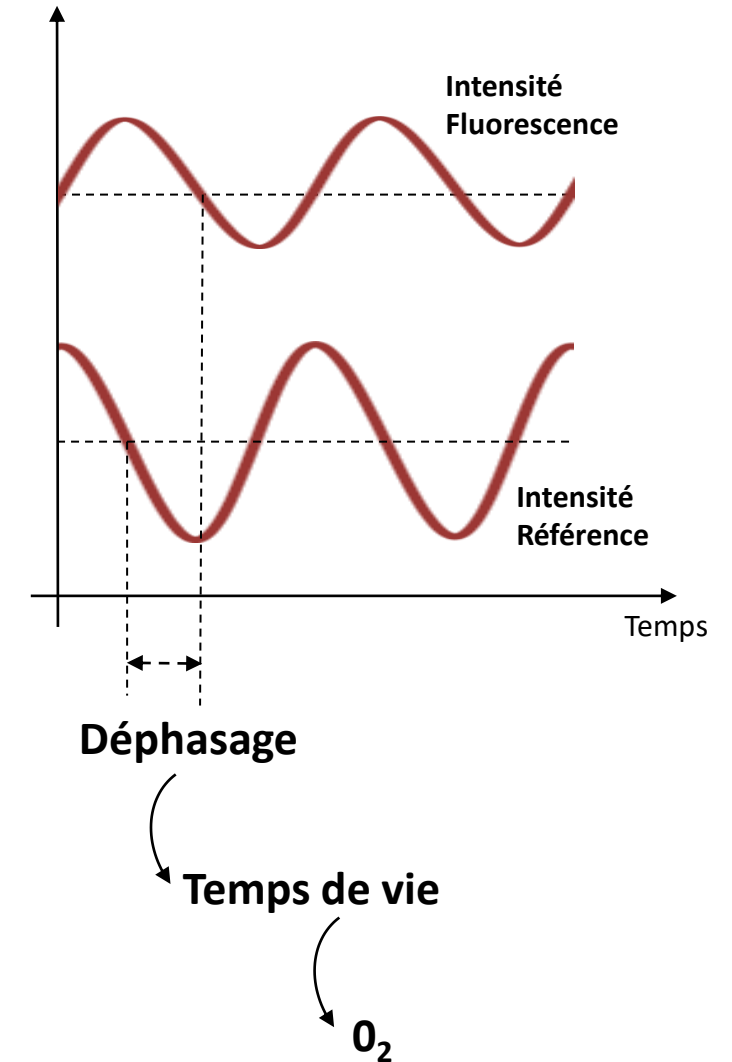
Exemple d'un capteur d'O₂ dissous

Complexe Platine-Porphyrine → **Fluorophore** enchâssé dans une membrane perméable au dioxygène.

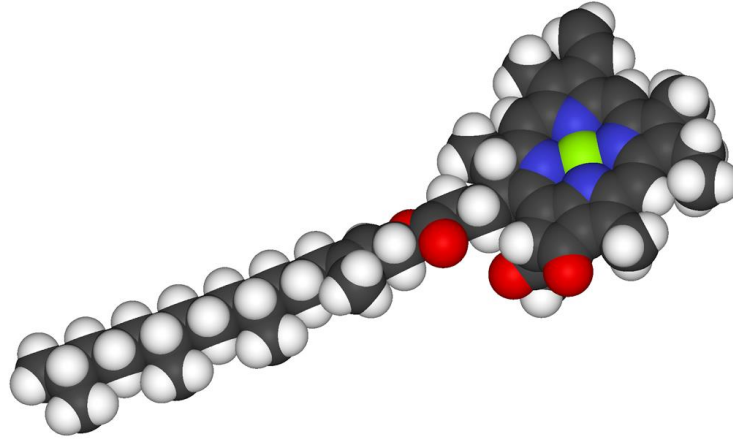
Concentration O₂ ↔ Temps de vie de son état excité



Signal Photodiode =
Fluorescence + Référence



4. Focus sur la Chlorophylle



Pourquoi la chlorophylle ?



Pigments photosynthétiques des **micro-algues** → **Chlorophylle A,B et C**

Indicateur de la **production primaire** & de la population de **phytoplancton**

A low-cost and portable fluorometer based on an optical pick-up unit for chlorophyll-a detection. *Sensors* Chen et Al. (2024)

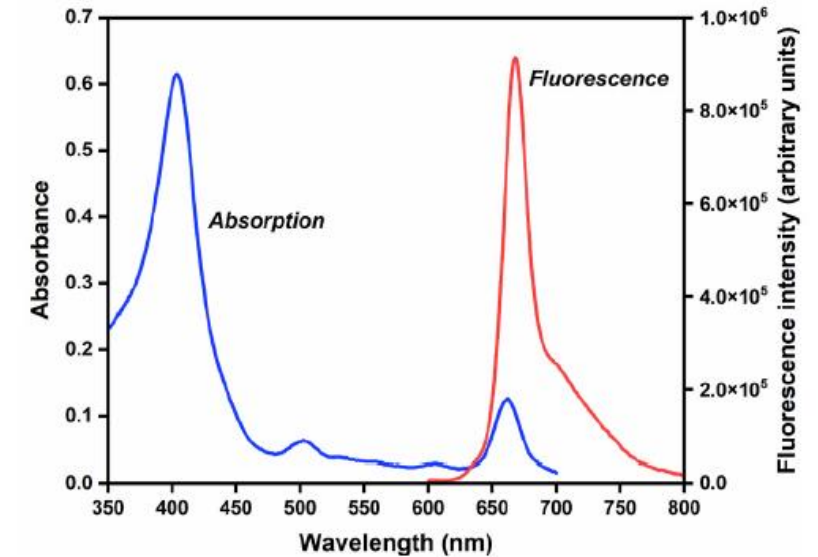
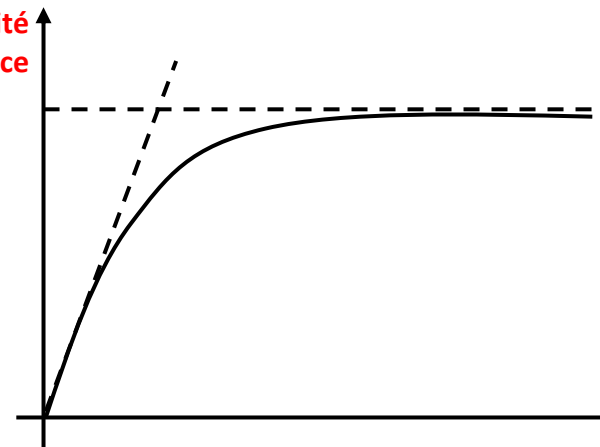


Fig. 1. The absorption and fluorescence emission spectra of chlorophyll-a in a 95 % ethanol solution.

Quantité à mesurer : **[Chlorophylle]**
→ Fluorimétrie en **intensité**

Intensité
de fluorescence



Unité ?

arbitrary Unit

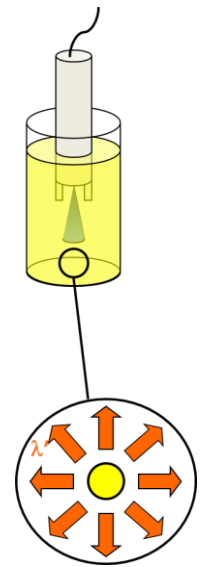
Etalonnage

Concentration
en Chl - a,b,c

Le défi de l'étalonnage

Quel substance pour étalonner les fluorimètres ?

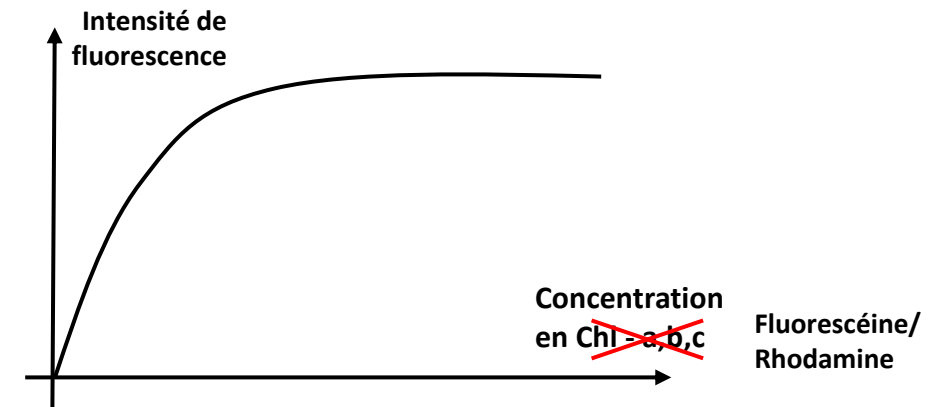
- 1) **Chlorophylle-a pure** dans l'acétone ?
- 2) Fluorophore plus pratique : **Fluorescéine** !



Sonde multi-
paramètres WiMo

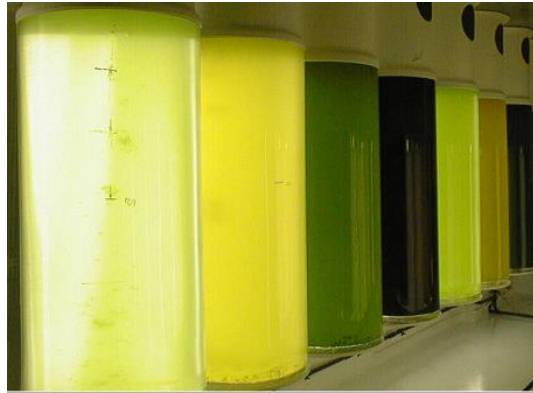
nke
INSTRUMENTATION

PARAMÈTRES INTÉGRÉS	GAMME	PRÉCISION	RÉSOLUTION
 Fluorescence (Fluo) Chlorophylle A	0 à 500 ppb**	Linéarité: $r^2 > 0.99$ pour Rhodamine WT	0.03 ppb**
 Fluorescence (Fluo) Phycocyanine	0 à 4500 ppb**	Linéarité: $r^2 > 0.99$ pour Rhodamine WT	0.1 ppb**
 Fluorescence (Fluo) Phycoérythrine	0 à 750 ppb**	Linearity: $r^2 > 0.99$ pour Rhodamine WT	0.1 ppb**



L'étalonnage permet de déterminer la **dérive du capteur** ou une perte de linéarité mais pas la fonction de transfert $[\text{Chl-a}] \leftrightarrow \text{Intensité de fluorescence}$.

Notion de *Proxy*



La mesure effectuée par le fluorimètre ne renseigne pas directement sur la concentration en Chlorophylle.

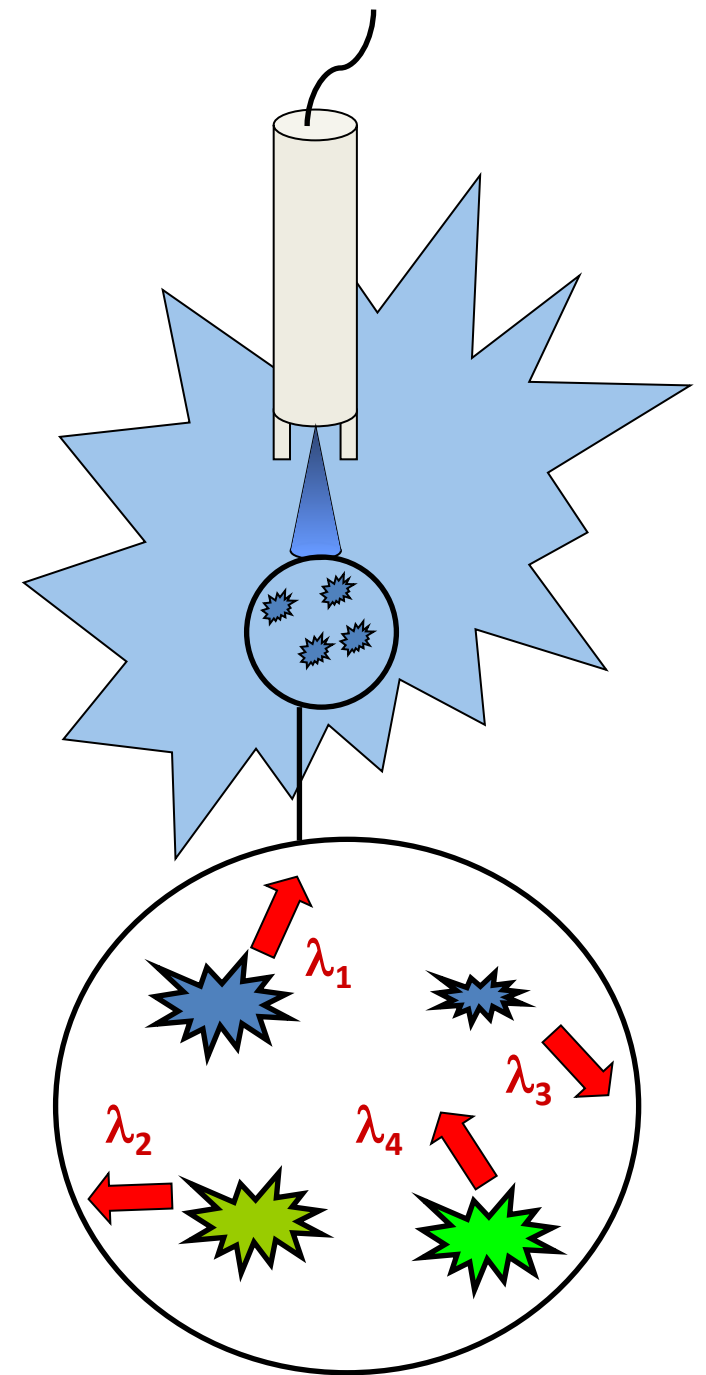
De plus, la **fluorescence du phytoplancton** est **variable** : espèce, maturité, état, éclaircissement, angle d'observation, ...

+ **Éléments fluorescents différents** :
Isotropie de diffusion de la fluorescence, λ de fluorescence

Fluorescence

« **Proxy** » de la **Chlorophylle**

« **Proxy** » du Phytoplancton



Conclusions sur la Chlorophylle



Biogeochemical-Argo
Science & Implementation Plan

3.1.4 Chlorophyll fluorescence

Chlorophyll pigment biomass is routinely assessed at high vertical resolution using chlorophyll fluorometers (excitation in the blue with emission in the red part of the visible spectrum). **Conversion from fluorescence to chlorophyll** involves a variety of **corrections and assumptions** [Cullen, 1982], but given its relationship to light attenuation (measured with radiometers in daylight) and ocean color, the **value can be constrained with an error of about 30%**. Given the **large dynamic range** of chlorophyll in the ocean (**0.01-50 mg Chl a m^{-3}** in the surface oceans) this parameter has been found to be extremely useful for studies of net primary production and phytoplankton population dynamics.

Technique de référence

HPLC (Chromatographie Liquide de Haute Performance)
Nécessite un **prélèvement**

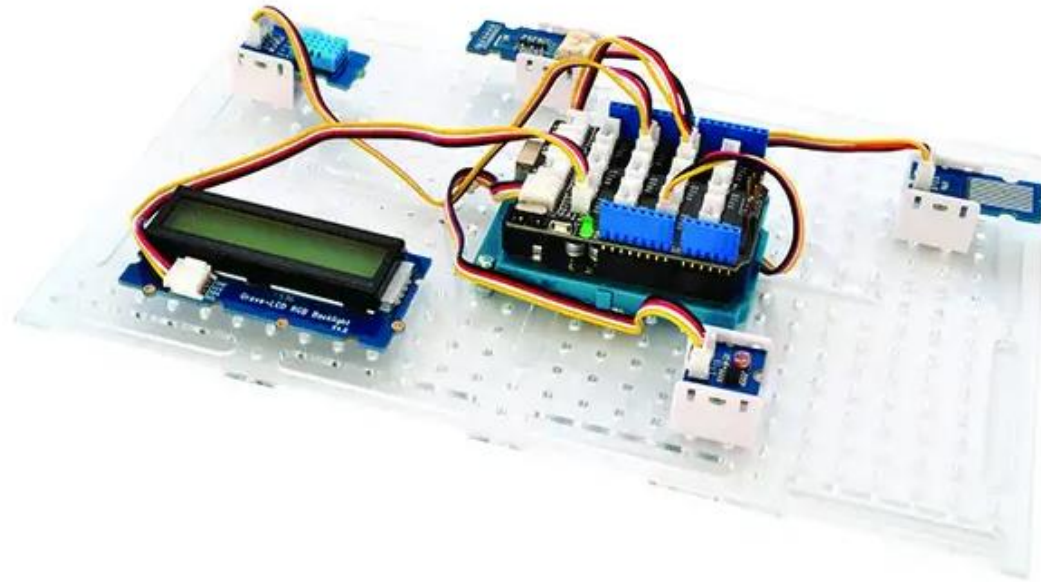
Capteurs Chl *in situ*

**Séries
temporelles**

**Alarme pour
prélèvement**

Surveillance efflorescence

5. Quelques capteurs DIY de fluorescence



Article

SmartFluo: A Method and Affordable Adapter to Measure Chlorophyll *a* Fluorescence with Smartphones

Anna Friedrichs ^{1,*}, Julia Anke Busch ^{1,2}, Hendrik Jan van der Woerd ³ and Oliver Zielinski ¹

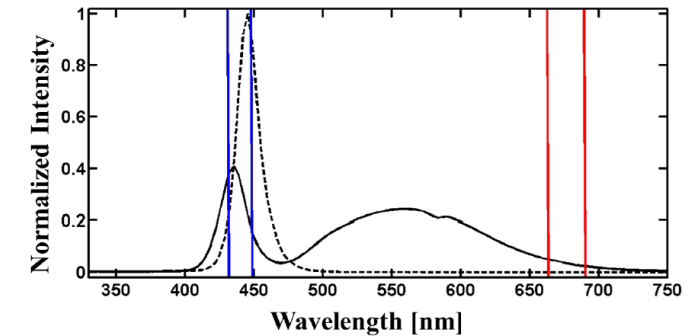
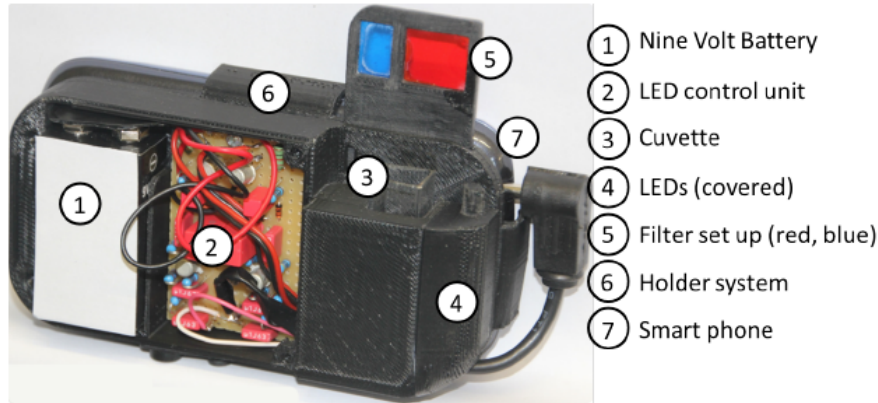
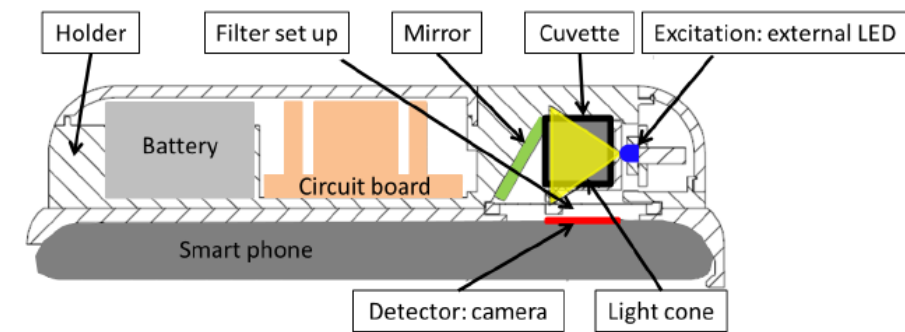


Figure 2. Spectra of internal smartphone LED (black continuous line) and external blue LED (black dashed line) including interesting spectral blue and red wavelength ranges (lined with blue and red lines, respectively).



(a) Prototype SmartFluo



(b) Schematic view of SmartFluo

Figure 1. Open view **(a)** and schematic drawing **(b)** of the SmartFluo prototype.

A Low-Cost Fluorescent Sensor for pCO₂ Measurements

Xudong Ge, Yordan Kostov, Robert Henderson, Nicholas Selock and Govind Rao *

chemosensors

ISSN 2227-9040

www.mdpi.com/journal/chemosensors

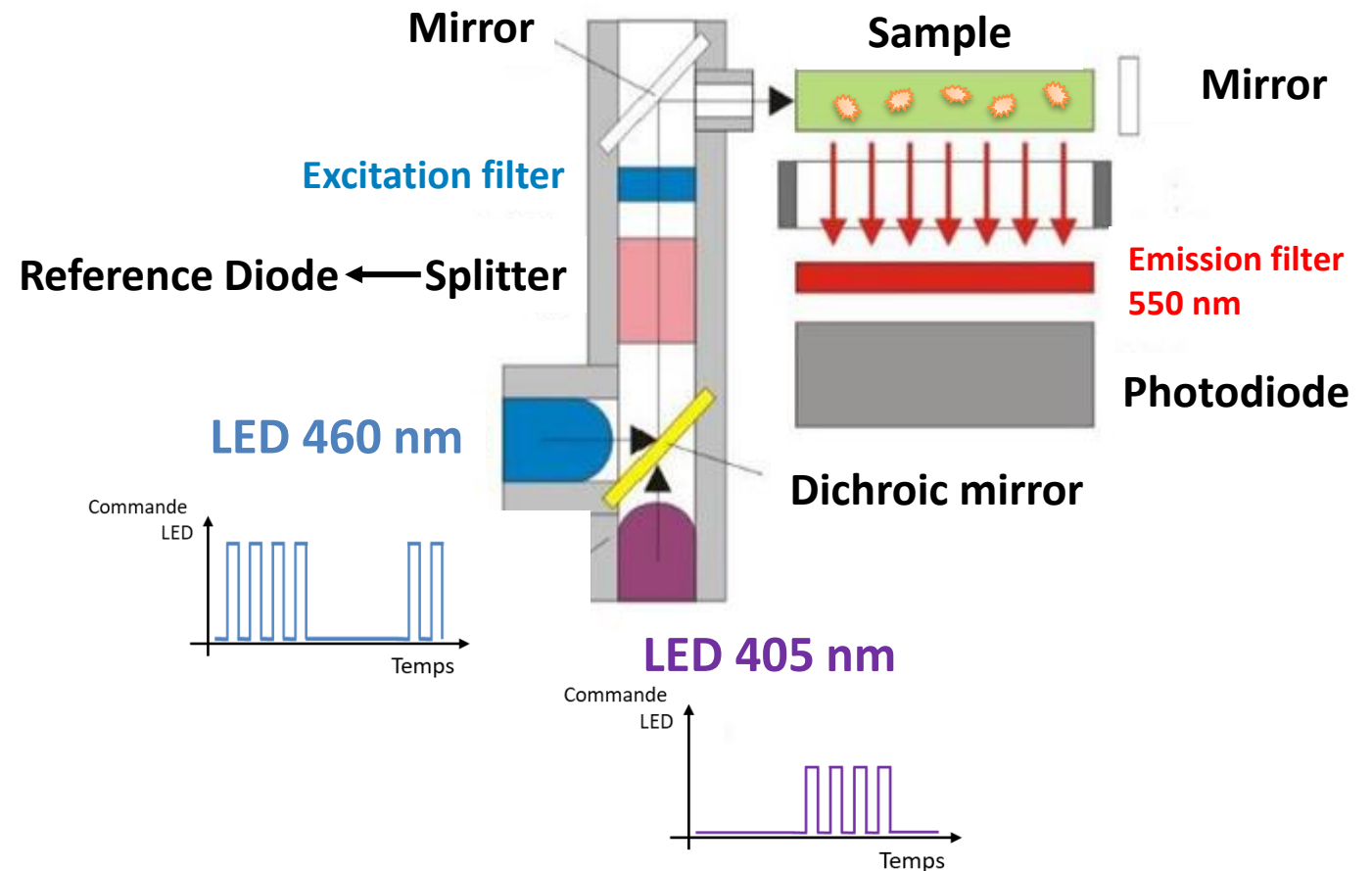
Fluorophore sensible à pCO₂ 🌟

Deux mesures de fluorescence en intensité → Rapport lié à pCO₂

Filtre excitation + Miroir Aller/Retour 90° + Filtre émission

Diode de référence pour compenser les dérives des Leds

Modulation/Démodulation pour optimiser le Signal-to-Noise Ratio

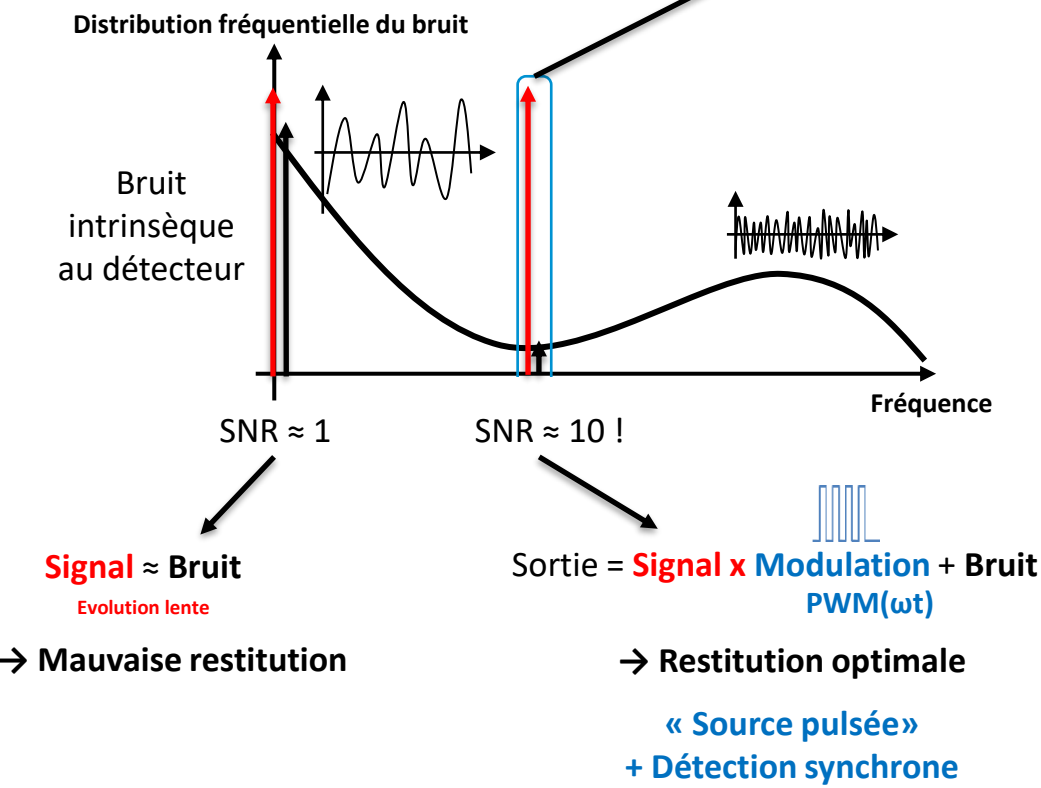


Rappel sur la détection synchrone

- Limiter la quantité de bruit électronique

Qualité de restitution de l'information :
Rapport **signal** sur **bruit** (SNR)

Sortie = **Signal entrée** + Bruit



Filtre passe-bande étroit
→ **Complexe à réaliser**

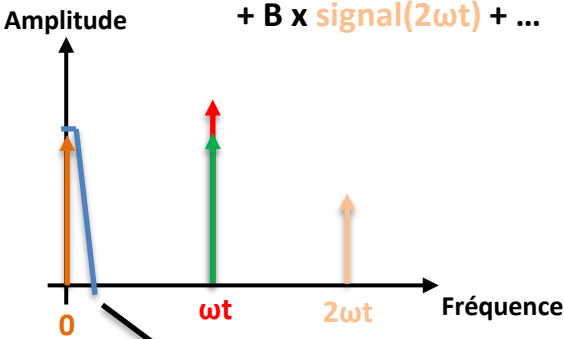
Utilité de la détection synchrone:

Entrée 1 = (**Signal** x **Modulation**)
x PWM(ωt)

Entrée 2 = **sin**(ωt)

=

Sortie = A x **signal**(0 ωt)
+ B x **signal**(2 ωt) + ...



Filtre passe-bas
→ Facile à réaliser avec
une fréquence de
coupure basse

Projet	EOV / EBV	Matériel Principal	Dénomination	Article scientifique	Coût	Dissémination
<u>SmartFluo: A Method and Affordable Adapter to Measure Chlorophyll <i>a</i> Fluorescence with Smartphones</u>	Chlorophylle a	Smartphone	Open source Low cost	2017	30 € - 70 € + smartphone	Espagne, Irlande, Allemagne, Norvège
<u><i>In situ</i> Measurements of Phytoplankton Fluorescence Using Low Cost Electronics</u>	Chlorophylle a	Arduino	Low cost	2013	150 \$	États-Unis (rivière)
<u>A low-cost and portable fluorometer based on an optical pick-up unit for chlorophyll-<i>a</i> detection</u>	Chlorophylle a	Arduino Lecteur DVD	Low cost	2023	140 \$	N.C
<u>A Low-Cost Fluorometer Applied to the Gulf of Saint Lawrence Rhodamine Tracer Experiment</u>	Rhodamine	Custom PCB	Low cost	2023	750 \$	Quebec

Projet	Profondeur max	Gamme de mesure	Erreur de mesure	Erreur systématique	Fiabilité, Répétabilité	Capteur de comparaison
<u>SmartFluo: A Method and Affordable Adapter to Measure Chlorophyll <i>a</i> Fluorescence with Smartphones</u>	Surface	Min : 10 µg/L Max : 250 µg/L	1 DN/s < e < 80 DN/s DN : Digit number	N.C	4,5 DN/s	LS 55, PerkinElmer (r² = 0.98)
<u><i>In situ</i> Measurements of Phytoplankton Fluorescence Using Low Cost Electronics</u>	2 m	Min : 0,3 µg/L Max : 100 µg/L	e ≥ 0,3 µg/L	4 % comparer à un instrument commercial	N.C	WETStar (r²=0,886)
<u>A low-cost and portable fluorometer based on an optical pick-up unit for chlorophyll-<i>a</i> detection</u>	Surface	Min : 0,35 µg/L Max : 100 µg/L	e ≤ 4 µg/L	< 4 %	N.C	N.C
<u>A Low-Cost Fluorometer Applied to the Gulf of Saint Lawrence Rhodamine Tracer Experiment</u>	500 m	Min : 0,2 µg/L Max : 60 µg/L	0,11 mV ≤ e ≤ 0,37 mV	2 %	N.C	Turner Cyclops-7 et AML X2Change (r²=0,99)

Merci pour votre attention !

Si on le temps...

6. Fluorescence & Prix Nobel



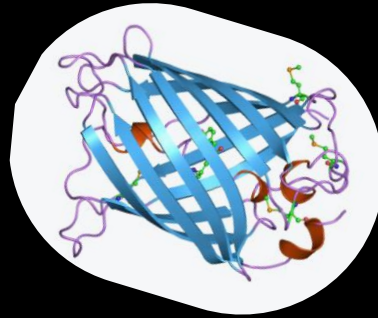
Un marqueur protéinique fluorescent

Osamu Shimomura
Martin Chalfie
Roger Tsien

Prix Nobel de
Chimie 2008

Green Fluorescent Protein

$\lambda_{\text{excitation}} = 395 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{émission}} = 509 \text{ nm}$



Ingrid Moen, Charlotte Jevne, Jian Wang, Karl-Henning Kalland, Martha Chekenya, Lars A Akslen, Linda Sleire, Per Ø Enger, Rolf K Reed, Anne M Øyan and Linda EB Stuhr: *Gene expression in tumor cells and stroma in dsRed 4T1 tumors in eGFP-expressing mice with and without enhanced oxygenation*. In: *BMC Cancer*. 2012, 12:21. [doi:10.1186/1471-2407-12-21](https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-21) PDF

Microscopie confocale & Résolution angulaire

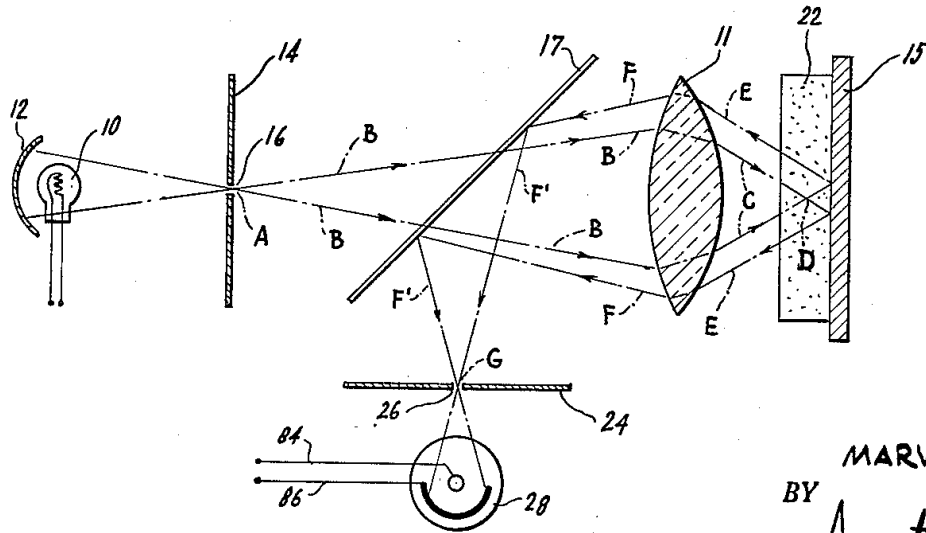
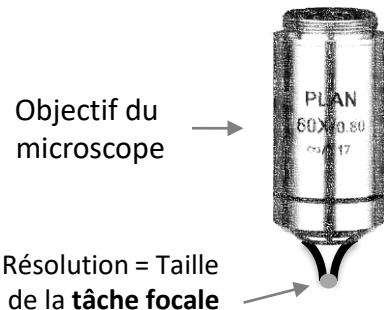


FIG. 3.

INVENTOR.
MARVIN MINSKY
BY
Ameter & Levy
ATTORNEYS

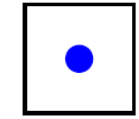
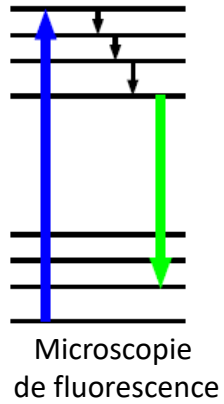


$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

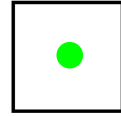
Limite de résolution fondamentale
 $\approx 200 \text{ nm}$



Microscopie STimulated Emission D epletion

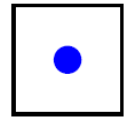
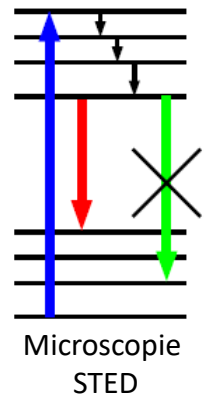


Stimulation



Fluorescence

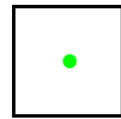
Taille de la tâche focale
« Résolution angulaire »
200 nm



Stimulation



Déplétion

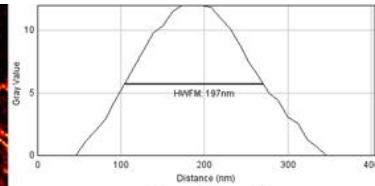
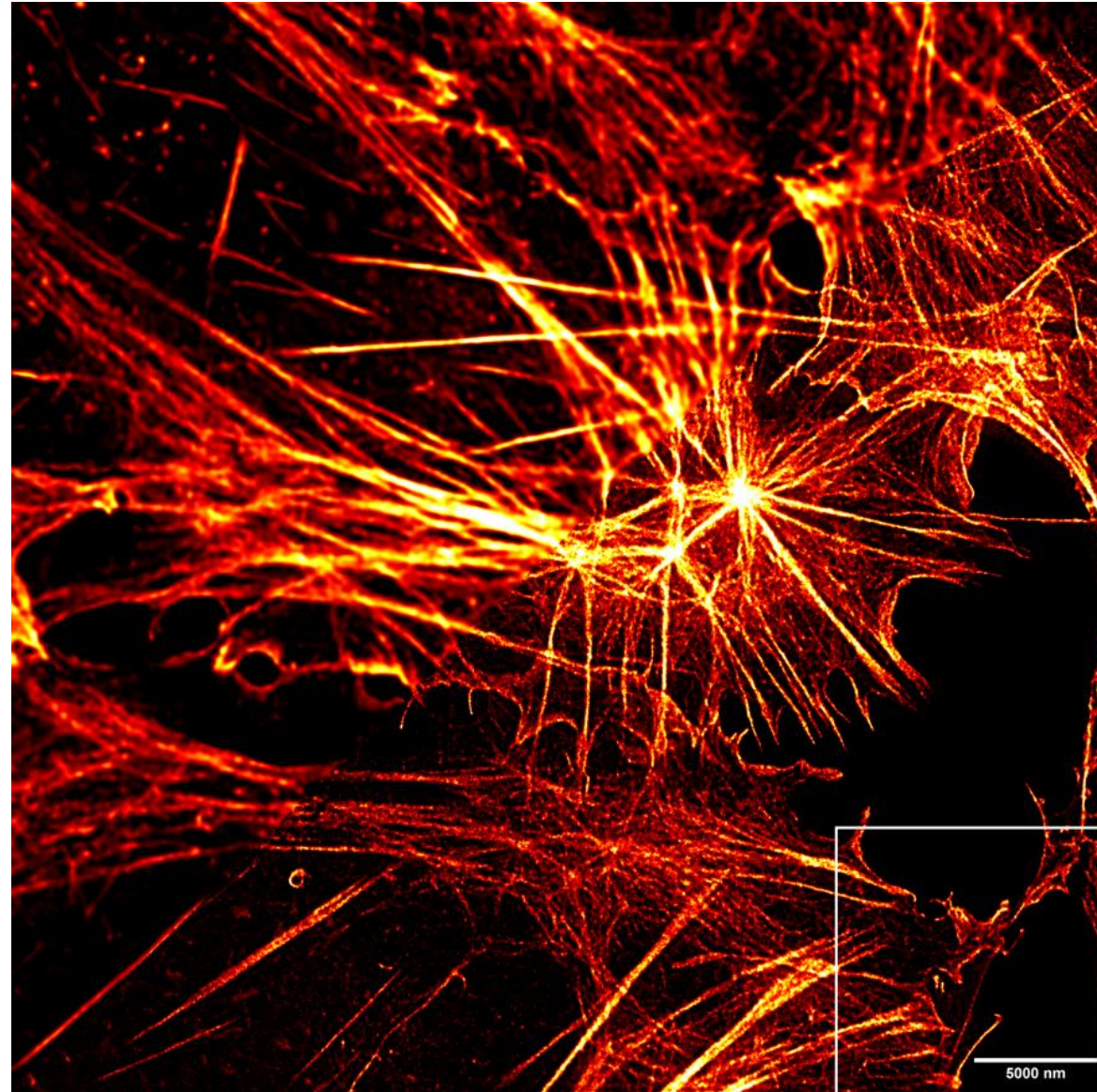


Fluorescence

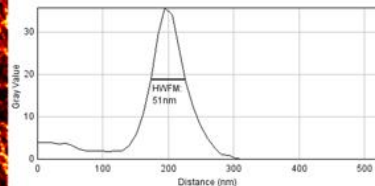
Taille de la tâche focale $\searrow \swarrow$
« **Super Résolution** »
20 nm

Stefan W. Hell
Eric Betzig
William Moerner

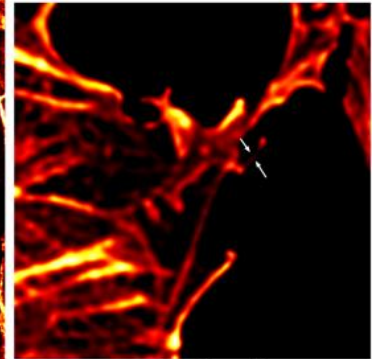
**Prix Nobel de
Chimie 2014**



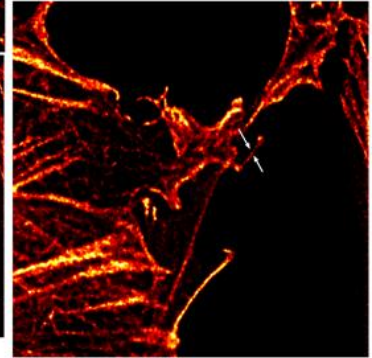
Confocal



STED



Confocal



STED