

Partie III : Spectroscopie de fluorescence (fluorimétrie)

1. Définition de la fluorimétrie

C'est une technique d'analyse utilisant le phénomène de fluorescence. On appelle fluorescence la propriété que possède certaines substances d'émettre (dans toutes les directions) un rayonnement électromagnétique, lorsqu'elles sont excitées par un faisceau lumineux électromagnétique (figure 14). L'excitation est caractérisée par une longueur d'onde λ_E spécifique du composé étudié.

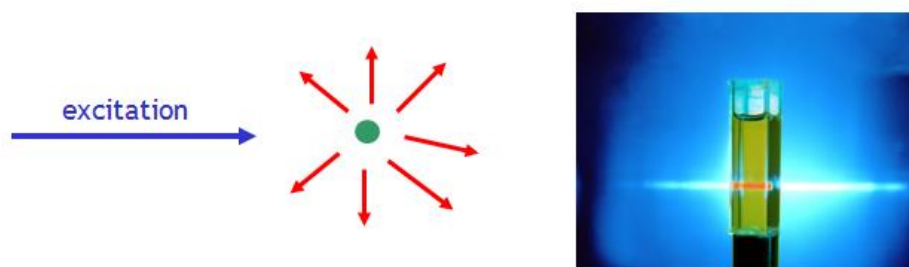


Figure 14 : Phénomène de fluorescence.

2. Excitation d'une molécule par absorption d'un photon

Un photon UV-visible, d'énergie $h \nu_E$ peut provoquer une transition électronique à partir de l'état fondamental d'énergie E_0 vers l'état excité d'énergie E_1 (figure 15). Il y aura simultanément une éventuelle modification des énergies vibrationnelles et rotationnelles. Cette excitation par absorption d'un photon est très rapide (10^{-13} s). Très vite en 10^{-12} s environ, l'énergie vibrationnelle et rotationnelle de l'état électronique excité est perdue au moment des chocs entre molécules de la solution. Cette désexcitation conduit donc les molécules au niveau de plus basse énergie de l'état excité.

3. Désexcitation des molécules excitées

A partir de l'état excité v_0^0 (figure 15) existe trois possibilités de retour qui sont :

- la désexcitation non radiative ;
- la phosphorescence ;
- la fluorescence.

3.1. Désexcitation non radiative

Le passage sur un état vibrationnellement et rotationnellement excité de l'état électronique fondamentale se fait au moment des chocs entre molécules. L'énergie ainsi perdue se dissipe dans le milieu sous forme de chaleur. Ce mode de désexcitation est le seul possible pour de nombreuses molécules.

3.2. Phosphorescence

Elle correspond à un mode de désexcitation complexe. Après la phase d'absorption correspondant au transfert d'un électron dans un niveau E_1 (venant de E_0), on assiste, si la relaxation vibrationnelle est assez lente au retournement de spin de l'électron pour conduire à un état un peu plus stable. De ce fait, le retour ultérieur au niveau fondamental est ralenti puisqu'il implique un nouveau retournement de spin de cet électron (figure 15).

3.3. Fluorescence

Ce mode de désexcitation est un phénomène rare, comme l'est la phosphorescence. Il ne concerne pas toutes les molécules. La perte d'énergie qui accompagne le retour sur un niveau vibrationnel et rotationnel quelconque de l'état électronique fondamental se fait par émission de photons de fréquence ν_F . Ce phénomène se produit de 10^{-9} à 10^{-7} s après l'excitation par le photon de fréquence ν_E . La molécule a perdu depuis longtemps les énergies vibrationnelle et rotationnelle de l'état électronique excité. Cette désexcitation partielle au moment des chocs entre molécules, est le fait que l'énergie retombe sur un niveau vibrationnel et rotationnel quelconque de l'état électronique fondamental explique que l'énergie des photons émise par fluorescence est plus faible que celle des photons qui ont excités les molécules (figure 15).

Diagramme de Jablonski

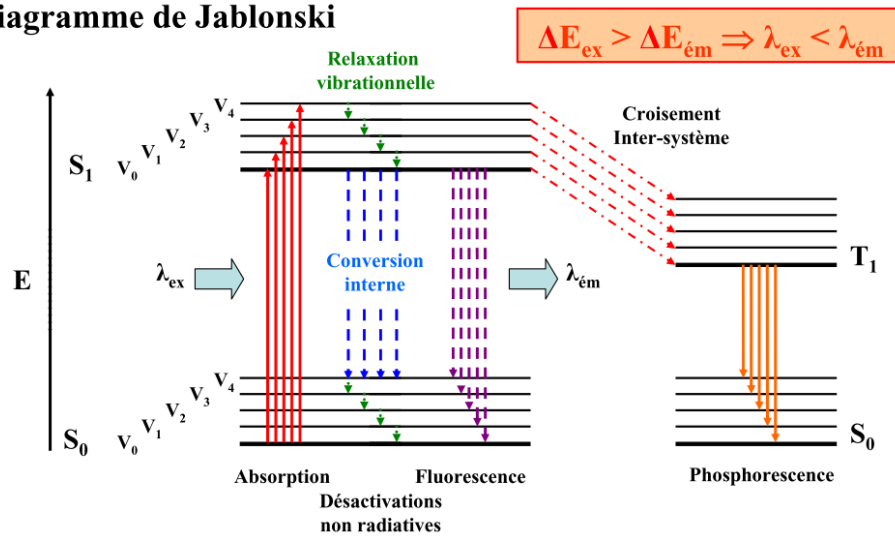


Figure 15 : Diagramme de Jablonski.

4. Spectre d'excitation et spectre d'émission

4.1. Spectre d'excitation

C'est l'ensemble des rayonnements qui ont conduit à l'état excité. C'est un spectre de bande. Pour obtenir ce spectre, on mesure le flux émis F en fonction de la longueur d'onde d'excitation et en fixant la longueur d'onde d'émission.

4.2. Spectre d'émission

C'est l'ensemble des rayonnements émis lors du retour à l'état fondamental. C'est un spectre de bande. Pour obtenir ce spectre, on mesure le flux émis F en fonction de la longueur d'onde d'émission, mais la longueur d'excitation est fixe (figure 16).

Déplacement de Stokes = distance entre les maxima d'excitation et d'émission

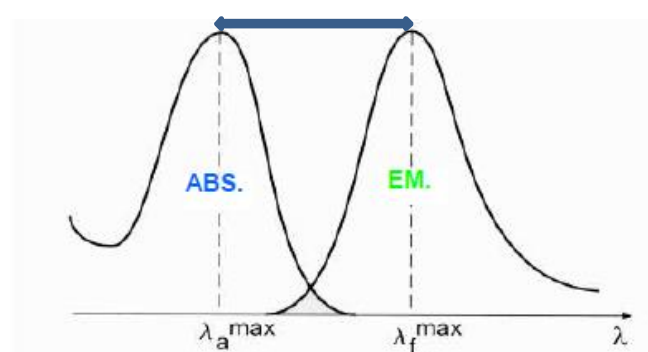


Figure 16 : Spectres d'absorption (ABS) et d'émission (EM).

5. Substances fluorescentes

Pour qu'une molécule fluoresce, elle doit pouvoir absorber les photons de la UV-visible, elles contiennent des chromophores insaturés à liaison délocalisée.

Les transitions électroniques concernées sont de type $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ et ces molécules s'appellent fluorophores. Il peut y avoir plusieurs transitions dans une même molécule.

Parmi ces fluorophores :

- ✓ Molécules biologiques : tryptophane, NADH, FAD
- ✓ Molécules organiques attachées : cystéines-SH, lysine-NH₂, FAD
- ✓ Intercalants de l'ADN : BET, YOYO
- ✓ Indicateurs fluorescents : molécules organiques qui deviennent fluorescentes en présence d'un cofacteur Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , O_2 , pH
- ✓ Nanocristaux : sondes inorganiques.

6. Facteurs influençant la fluorescence

L'établissement d'une relation entre le flux émis par fluorescence (I_f) et la concentration nous servira à mettre en évidence un certain nombre de facteurs qui influencent la fluorescence. Nous aurons besoin d'abord de la notion du rendement quantique.

6.1. Notion du rendement quantique

L'étude du principe de la fluorescence nous laisse entrevoir que plus les transitions électroniques sont fréquentes plus la fluorescence est importante. Il y a en fait une relation de proportionnalité entre le flux (I_f) et le flux absorbé.

Le coefficient de proportionnalité s'appelle le rendement quantique et il est toujours < 1 .

$$Q = I_f / I_{\text{abs}}$$

Il dépend de :

- la nature des molécules ;
- la longueur d'onde d'excitation et de celle d'émission ;
- Il est élevé par les longueurs d'onde maximales (λ_{max}).

Exemples

Quinine = 0,55 ; Rhodamine = 0,69 ; Fluorescéine = 0,85 **Substances fortement fluorescentes.**

Benzène = 0,07 ; Phénol = 0,08 **Substances faiblement fluorescentes.**

6.2. Relation entre F et C

La relation entre F et $I_{\text{abs}} = ?$

$$Q = F / I_{\text{abs}} \quad F = Q \cdot I_{\text{abs}} \quad (1)$$

$$I_{\text{abs}} = I_0 (1 - T) \quad (1)$$

D'après la loi de Beer-Lambert :

$$A = \text{Log } I_0 / T = \epsilon C l$$

$$\ln I_0 / T = \text{Log } I_0 / T \cdot \ln 10 = \epsilon C l \ln 10 \\ = 2,3 \epsilon C l$$

$$-\ln T / I_0 = 2,3 \epsilon C l \quad T / I_0 = e^{-2,3 \epsilon C l}$$

$$T = I_0 \cdot e^{-2,3 \epsilon C l} \quad (2)$$

On remplace (2) dans (1) $I_{\text{abs}} = I_0 (1 - I_0^{-1} e^{-2,3 \epsilon C l})$

$$I_{\text{abs}} = I_0 (1 - e^{-2,3 \epsilon C l}) \quad (3)$$

Quand $x \rightarrow 0$, $e^x \approx 1+x$

Quand $c \rightarrow 0$, $e^{-2,3 \epsilon C l} \approx 1 + (-2,3 \epsilon C l)$.

Remarque

Dans la fluorescence, il est toujours préférable de travailler avec des solutions diluées ($C \rightarrow 0$), mais il ne faut jamais conserver une solution diluée.

Quand $C \rightarrow 0$, $F = 2,3 Q I_0 \epsilon C l$

En solution diluée, il existe une relation de proportionnalité entre la concentration et l'intensité de fluorescence $F = KC$.

Cette relation est à la base des applications analytiques quantitatives de la fluorimétrie mais la relation entre F et C est :

$$F = Q I_0 (1 - e^{-2,3 \epsilon C l})$$

6.3. Facteurs influençant la sensibilité de la fluorimétrie

La sensibilité d'une méthode est égale au rapport :

$$\text{Sensibilité} = \text{Signal électrique}/C$$

Ici, le signal électrique est proportionnel à F :

Toute modification de F/C affecte donc la sensibilité :

$$F/C = 2,3 Q \cdot 0$$

6.4. D'autres facteurs influençant la fluorescence

Le pH, la température, le solvant, la photodécomposition, sources de contamination, etc.

7. Phénomène de quenching

Le phénomène de quenching est la diminution quantitative d'un fluorophore par les conditions environnementales comme la force ionique, l'effet des solvants ou la présence d'autres fluorochromes qui réduisent l'efficacité d'émission. Le quenching correspond à une relaxation non-radiative des électrons excités vers l'état fondamental (figure 17).

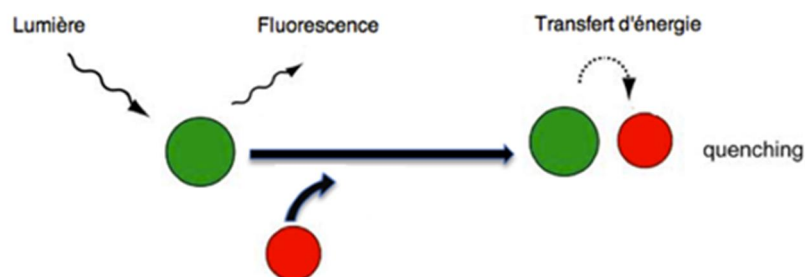


Figure 17: Quenching de la fluorescence.

Dans certains cas, on observe une diminution de fluorescence aux fortes concentrations : on parle de phénomène de quenching. Ce phénomène est gênant en analyse quantitative car une même fluorescence peut provenir de deux concentrations C_1 et C_2 différentes.

Cette extinction peut s'expliquer par :

- l'augmentation du nombre de chocs entre molécules favorise les désexcitations non radiatives ;

- les molécules excitées transfèrent alors leurs énergies à des molécules non excitées diminuant ainsi le rendement quantique Q ;
- les molécules excitées peuvent réagir entre elles pour former des dimères ou des trimères non fluorescents.

8. Temps de vie de fluorescence

C'est la durée pendant laquelle un fluorophore demeure dans un état excité. Il est de l'ordre de la nanoseconde pour la plupart des fluorochromes. Il se mesure par la relation suivante :

$$I(t) = I_0 e^{(-t/\tau)}$$

- $I(t)$: Intensité de fluorescence mesurée au temps t ;
- I_0 : Intensité de fluorescence immédiatement après excitation ;
- τ : Durée de vie du fluorochrome.

Plus le temps de vie de fluorescence est court, plus la sensibilité du fluorochrome est meilleure. Ce temps varie en fonction de l'environnement: milieu, pH

9. Appareillage

On mesure généralement la puissance rayonnée par fluorescence à 90° du faisceau incident. C'est ce rayonnement de fluorescence envoyé dans toutes les directions qu'on analyse en fluorimétrie.

Cette technique peut être appliquée à des molécules naturellement fluorescentes ou rendues fluorescentes par adjonction d'un réactif ; il faut en particulier que la concentration soit très faible.

L'instrumentation d'un fluorimètre (spectrofluorimètre) est classique et comporte cinq parties :

- Source lumineuse : généralement une lampe à arc xénon ;
- Monochromateur ou filtre ;
- Compartiment à échantillon ;
- Monochromateur ou filtre ;
- Détecteur : photomultiplicateur ou photodiode (figure 18).

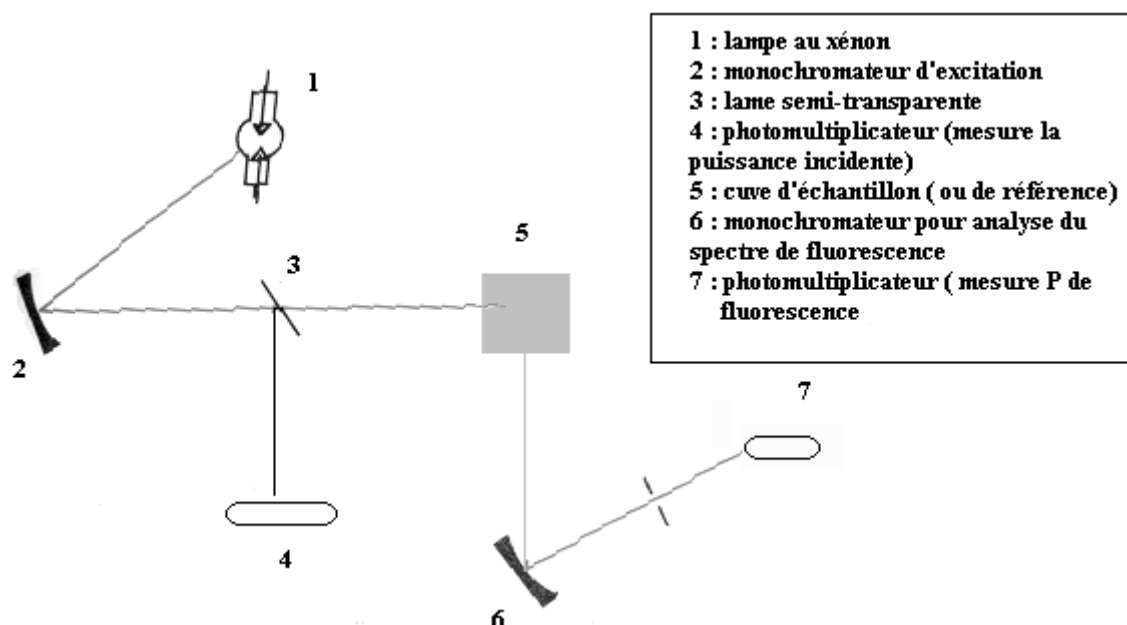


Figure 18 : Schéma d'un spectrofluorimètre.

10. Application

Le succès de la fluorescence est lié à sa grande sensibilité de détection. La grande sensibilité et la sélectivité de cette technique ont permis de développer de nombreuses applications, notamment dans le domaine de l'analyse des médicaments, des substances naturelles et de leurs métabolites dans les milieux biologiques. La sensibilité des dosages par fluorimétrie est de 100 à 1000 fois plus grande que celle des dosages par absorptiométrie. Les dosages fluorimétriques impliquent deux longueurs d'ondes caractéristiques de la substance à mesurer: une λ_{exc} donnée et λ_{em} donnée. Ceci améliore a priori les capacités de tels dosages à éviter les interférences par rapport aux dosages absorptiométriques qui sont réalisés à une longueur d'onde d'absorption donnée.

La fluorimétrie est utilisée dans de nombreux domaines:

- Physique
- Chimie
- Biochimie
- Biologie
- Médecine
- Industrie pharmaceutique
- Environnement

En biologie, cette technique est utilisée pour :

- 1- Localisation subcellulaire de lipides et de protéines (*ex vivo*)
- 2- Étude dynamique du trafic intracellulaire
- 3- Étude des interactions moléculaires
- 4- Étude de la viscosité membranaire
- 5- Étude du repliement d'une protéine (dénaturation / renaturation)
- 6- Étude du séquençage de l'ADN
- 7- Analyse génétique par hybridation
- 8- Dosages mettant en œuvre des réactions enzymatiques et faisant intervenir le couple $\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$
- 9- Dosages de substances mettant en œuvre des réactions Ag/Ac et des Ag ou des Ac marqués par des fluorochromes = dosages par immunofluorescence.
- 10- Fluorimétrie quantitative en cytométrie de flux

En général, les molécules biologiques (protéines, acides nucléiques, etc.) ne sont pas fluorescentes dans le visible (quelques exceptions: flavines, NADH, GFP, etc.). Certains acides aminés ont néanmoins des propriétés de fluorescence dans l'UV (tryptophane). On attache spécifiquement des marqueurs fluorescents.

Exercices

Exercice n°1

Une solution de 9-aminoacridine dans l'eau, conduit à une intensité de fluorescence qui, mesurée à 465 nm, est de 60% par rapport à un témoin de fluorescence externe. Un échantillon de ce composé dont la concentration est de 0,1 ppm dans le même solvant, conduit dans les mêmes conditions, à une fluorescence de 40% (l'eau présente une fluorescence négligeable).

Calculer la valeur de la concentration de l'échantillon en ppb.

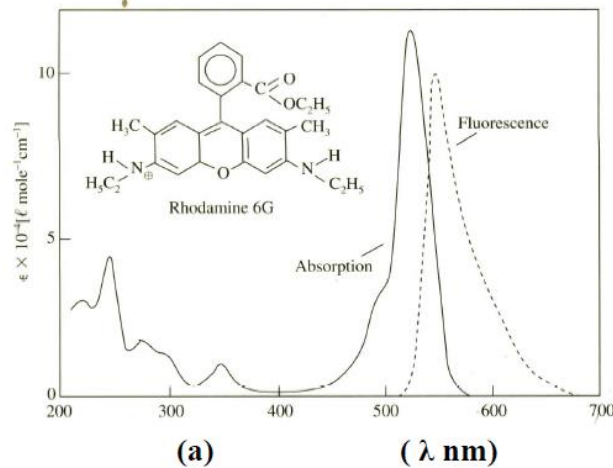
Solution

La concentration de la solution de l'échantillon est :

$$C = (60 \cdot 0,1) / 40 = 0,15 \text{ ppm, soit } 150 \text{ ppb.}$$

Exercice 2

La rhodamine est l'un des fluorochromes les plus utilisés notamment en immunochimie. Elle émet dans le rouge des longueurs d'onde du spectre visible. Voici le spectre d'absorption et de fluorescence de ce fluorochrome.



-Interprétez ce spectre.

Solution

-Le spectre en ligne continue présente le spectre d'absorption de la rhodamine avec un λ_{max} à 520 nm.

-Le spectre en ligne discontinue présente le spectre d'émission de fluorescence de la rhodamine avec un λ_{max} à 550 nm.

- Nous remarquons qu'il y a un décalage du spectre d'émission de fluorescence par rapport au spectre d'absorption ; et un décalage de la longueur d'onde vers des longueurs d'onde plus élevées, cela est dû à la diminution de l'énergie absorbée avant qu'elle soit restituée sous forme de fluorescence.