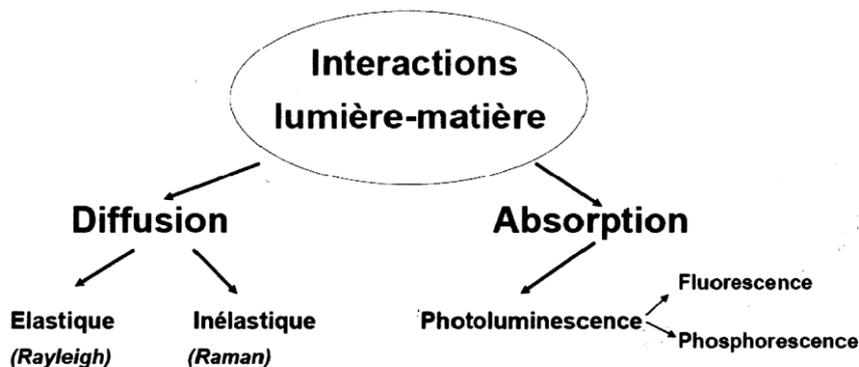


## La Spectrofluorimétrie

### 1.Introduction :

La spectroscopie est l'analyse du rayonnement électromagnétique émis, absorbé ou diffusé par les atomes ou les molécules. Elle fournit des informations sur l'identité, la structure et les niveaux énergétiques des atomes et des molécules du fait de l'interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière.

La spectrométrie de fluorescence ou spectrofluorimétrie permet la mesure et l'étude des spectres de fluorescence.



### 2.La luminescence

La luminescence est le phénomène d'émission de photons à partir d'un atome ou d'une molécule dans un état électroniquement excité. En retournant à son état fondamental à partir de l'état excité, l'énergie perdue par l'atome ou la molécule se transforme en un photon, le phénomène est radiatif.

Ces différents phénomènes dépendent du processus physique qui a provoqué l'excitation de l'atome ou de la molécule.

En fonction du mode d'excitation On distingue :

2.1-**la chimiluminescence** : l'énergie est apportée par une réaction chimique exothermique

2.2-**la thermoluminescence** : l'énergie est apportée par chauffage

2.3-**l'électroluminescence** : l'énergie provient d'une décharge électrique dans des vapeurs ou des gaz (champs électrique)

2.4-**la bioluminescence** : l'énergie est produite par une réaction enzymatique dans des organismes vivants (bactéries, végétaux et animaux).

**2.5- la photoluminescence** : l'énergie provient de l'absorption de photons (fluorescence, phosphorescence)

### **3. Définitions :**

#### **3.1. Photoluminescence :**

La photoluminescence est un phénomène de luminescence due à l'absorption de photons.

Selon la durée de la luminescence, on distingue :

##### **3.1.1. La fluorescence**

La fluorescence est un phénomène de luminescence : des molécules émettent un rayonnement dans toutes les directions grâce à l'énergie reçue d'une lumière incidente. Elle est la propriété des composés cycliques aromatiques. Sa mesure s'effectue à partir de spectrofluorimètres avec lumière incidente UV et lecture à 90° en lumières UV et visible. Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) provenant de la source lumineuse, et de restituer rapidement (quelques nanosecondes) une fraction de cette lumière absorbée sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission) dans le domaine du visible ou proche UV.

Elles émettent à une longueur d'onde supérieure à celle du faisceau incident.

##### **a. Fluorescence naturelle**

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine, etc.), certaines vitamines du groupe B, Pyridoxine (B6), riboflavine (B2), Folates (B9), les polyphénols (catéchine, acide gallique, etc.), la chlorophylle, tryptophane, adrénaline, chloroquinine, digitaline, pénicilline, certains alcaloïdes sont des fluorophores naturels.

##### **b. Fluorescence artificielle**

La molécule n'est pas naturellement fluo, on la rend fluo (dérivation) -en la complexant avec une molécule fluorescente

-en oxydant le composé (par bromure de cyanogène)

-en cyclisant la molécule

-en lui greffant des groupements fluorescents

Les vêtements à haute visibilité, les surligneurs fluorescents.

##### **3.1.2. Phosphorescence**

Le terme phosphorescence est une extension de phosphore. Car le phosphore blanc possède la propriété d'émettre de la lumière dans le noir.

Le phénomène de phosphorescence correspond à une propriété de certains matériaux qui peuvent emmagasiner de la lumière et la restituer ensuite petit à petit dans l'obscurité. Dans le cas de la phosphorescence, l'émission de lumière résulte d'une perte d'énergie par des électrons qui ont, au préalable, été excités par une énergie lumineuse. Ils retournent alors à leur niveau d'énergie le plus bas lentement.

### 3.2. Principe de la fluorescence et de la phosphorescence

La phosphorescence et la fluorescence ont de nombreuses applications dont la fluorimétrie qui est une méthode de dosage. Pour bien comprendre le phénomène, il est utile d'étudier le diagramme de Jablonski. C'est un diagramme énergétique comparant les phénomènes de retour à l'équilibre par fluorescence et phosphorescence.

#### 1. Origine de la photoluminescence

1- Domaine spectral

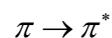
Le visible : 400-800 nm

Le proche ultraviolet : 200-400 nm

#### 2- Domaine énergétique :

Les énergies électroniques et vibrationnelles

3-Transitions électroniques :



**En fluorescence :** Les transitions électroniques se font entre deux états énergétiques de même multiplicité.

**En phosphorescence :** Les transitions électroniques se font entre deux états énergétiques de multiplicités différentes.

#### 4. Règle de multiplicité :

##### 1. Nombres quantiques électroniques

Chaque électron est caractérisé par les nombres quantiques :

- Principal « **n** »

- Secondaire « **l** »

- Magnétique (spin) « **m** » ( $m = \pm 1/2$ )

##### 2. La multiplicité

La multiplicité **M** définit deux états électroniques : Singulet ou Triplet

**M = 2S + 1** Avec **S** = Somme de « **m** » des électrons d'une orbitale moléculaire

Etat Singulet :  $M = 1$

Etat Triplet :  $M = 3$

On distingue ainsi les états électroniques suivants :

**Etat fondamental**

Spin =  $\frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$

Multiplicité de spin  $2S+1 = 2 \times 0 + 1 = 1$  état singulet

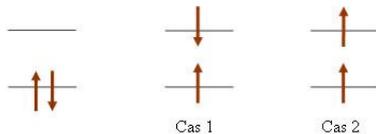
**Etats excités**

Cas 1 : Spin =  $\frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$

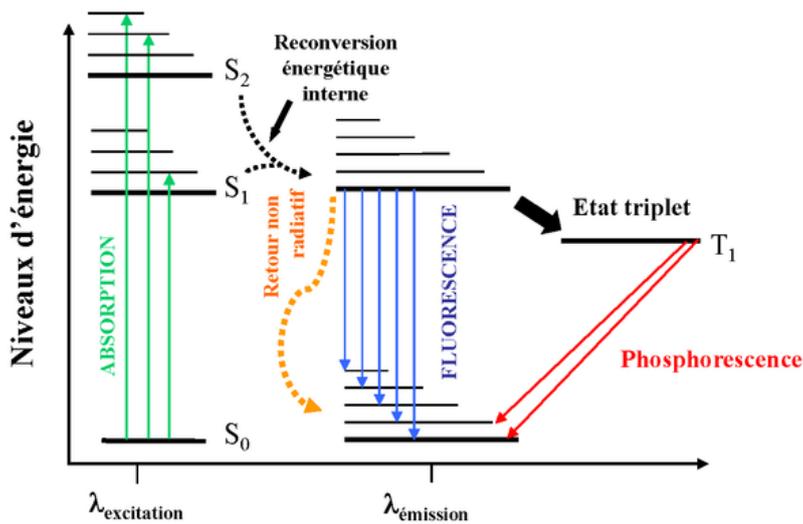
Multiplicité de spin  $2S+1 = 2 \times 0 + 1 = 1$  état singulet

Cas 2 : Spin =  $\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$

Multiplicité de spin  $2S+1 = 2 \times 1 + 1 = 3$  états triplet



**5. Diagramme de Jablonski :**



**Figure 1 : Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski montrant la différence entre fluorescence et phosphorescence**

Une molécule fluorescente (fluorophore) peut absorber l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et la restituer sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Les

molécules qui fluorescent sont en majorité cycliques, rigides et possédant des liaisons (délocalisation des électrons).

Différents types de dissipation de l'énergie en excès peuvent alors se produire. Ce sont des **phénomènes de relaxation** :

**1- Relaxation radiative (rayonnante)**

**2- Relaxation non radiative (non rayonnante)**

- Conversion interne
- Relaxation vibrationnelle

**3- Autres types de processus de fluorescence**

- Fluorescence de Stokes
- Diffusion de Rayleigh
- Diffusion Raman
- Fluorescence de résonance

**Relaxation radiatives (rayonnante) : fluorescence**

**a - Relaxation directe :**

Retour à l'état fondamental avec émission de radiations.

La **fluorescence moléculaire** se produit par émission d'un photon (à  $\lambda_{em}$ ) dont l'énergie correspond à la transition entre l'état électronique  $S_1$  et l'un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental  $S_0$ . L'excès d'énergie vibrationnel par rapport à  $S_0$  est à nouveau perdu par un processus de relaxation vibrationnelle.

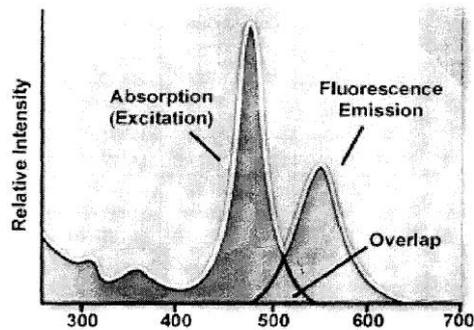
C'est un phénomène rapide : il faut entre  $10^{-9}$  et  $10^{-7}$  seconde pour qu'une molécule retourne à l'état fondamental.

**b - Relaxation après changement de multiplicité :**

Passage d'un état excité Triplet  $T_1$  à l'état fondamental Singulet  $S_0$ .

- Désactivation par émission de lumière de longueur d'onde plus grande que celle de la lumière initialement absorbée ou celle émise par fluorescence.

Il s'agit de la **Phosphorescence**.



## 2. relaxation non radiative :

Dissipation de l'énergie sous forme de chaleur.

### - Conversion externe :

Transfert de l'énergie au solvant ou à la matrice.

### - Relaxation vibrationnelle :

Transfert de l'énergie au niveau vibrationnel le plus bas du même niveau énergétique excité.

### - Conversion interne :

Transfert de l'énergie du niveau vibrationnel le plus bas d'un état excité à un état électronique inférieur.

### - Conversion inter-système :

Changement de multiplicité nécessitant un retournement de spin et évolution d'un état excité Singulet à un état excité triplet d'énergie voisine et de durée de vie plus longue.

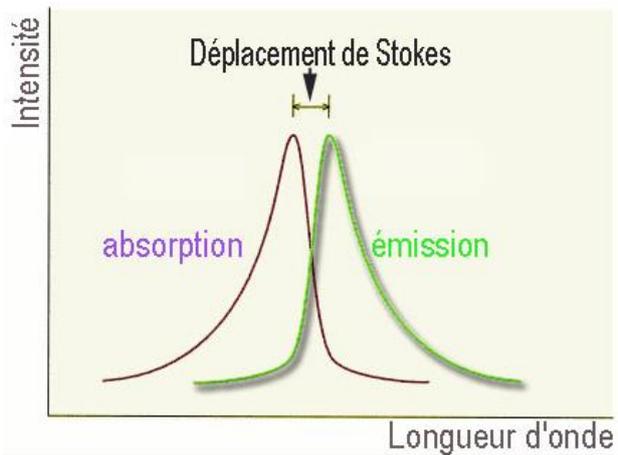
## 6. Aspect du spectre :

### Spectres d'émission (absorption) et d'excitation de fluorescence

Chaque molécule fluorescente présente deux spectres caractéristiques :

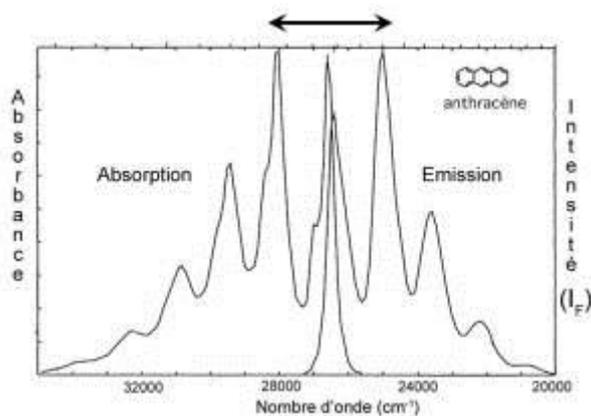
- **un spectre d'absorption qui** permet de déterminer l'efficacité relative des différentes longueurs d'onde des rayonnements incidents sur la fluorescence
- **un spectre d'émission** qui montre l'intensité relative des rayonnements émis à différentes longueurs d'onde

Chaque bande observée dans le spectre d'absorption (excitation) aura une bande d'émission (ou de fluorescence) correspondante. Ces deux bandes seront approximativement des images miroirs l'une de l'autre. Cependant, plus le composé est complexe, plus la bande de fluorescence est large et moins la symétrie des spectres sera avérée.



$$\lambda_{\max} \text{ excitation} < \lambda_{\max} \text{ emission}$$

Le déplacement vers de plus grandes longueurs d'onde est appelé déplacement de Stokes



#### Exemple :

- Energies  

$$E_e < E_a \iff \lambda_e > \lambda_a$$
 (e pour émission et a pour absorption)
- Déplacement de Stokes  $\longleftrightarrow$
- Symétrie miroir

#### 7. Propriété quantitative :

##### Caractéristiques des fluorophores

Un fluorochrome ou fluorophore est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux

aromatiques conjugués ou encore des molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons  $\pi$ .

### 1. Coefficient d'extinction (ou absorption molaire) $\varepsilon$ :

Reflète la probabilité d'absorption d'une molécule à une longueur d'onde donnée entre 5000 et 250 000  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$  = 80 000  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$  pour 488 nm pour la fluorescéine

### 2. Rendement quantique de fluorescence :

On définit le rendement quantique de fluorescence comme étant le rapport de l'intensité de fluorescence émise sur l'intensité absorbée.

Soit :

$\Phi_f$ : le rendement quantique de fluorescence

$I_f$ : l'intensité de fluorescence émise (nombre de photons de fluorescence émis )

$I_a$ : intensité absorbée (nombre de photons absorbés )

$$\Phi_f = I_f/I_a$$

$$\Phi_F = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}}$$

$\Phi_F$  Grandeur sans dimension 0,05 à 1

$\Phi_f$  représente le rapport entre le nombre de photons émis ( $I_f$ ) sur le nombre de photons absorbés ( $I_a$ ).

$\Phi_f$  est indépendant de l'intensité lumineuse, plus la valeur de  $\Phi_f$  est élevée, plus le composé est fluorescent.

$$0 \leq \Phi_f \leq 1$$

$\Phi_f$  dépend de la substance, du solvant, et de la température (diminuer quand la température augmente)

$\Phi_f$  ne dépend pas l'intensité de la source lumineuse  $I_0$  et de la longueur d'onde d'excitation

### 3. Intensité de fluorescence :

Dépend de la longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{ex}$  alors que l'allure du spectre de fluorescence est indépendante de cette dernière Pour une solution diluée :

$$I_f = \Phi_F . I_a = \Phi_F . ( I_0 - I_t )$$

$$I_f = \Phi_F \cdot I_0 \cdot \left( 1 - \frac{I_t}{I_0} \right)$$

$$I_f = \Phi_F \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-A})$$

$$10^{-A} = 1 - 2.303A + \frac{(2.303A)^2}{2!} - \dots + \dots$$

$I_f$  = Intensité de fluorescence

$I_a$  = Intensité de rayonnement absorbé

$I_0$  = Intensité de rayonnement incident

$I_t$  = intensité du rayonnement transmis

A = absorbance ( $A = \log I_0/I_t = \epsilon_\lambda \cdot L \cdot C$ )

$$I_f = K \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot (2.3 \cdot \epsilon_\lambda \cdot L \cdot C)$$

$$I_f = K' \cdot C$$

$$K' = K \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot (2.3 \cdot \epsilon_\lambda \cdot L)$$

Le facteur  $K'$  regroupe les paramètres propres au composé et à l'appareillage

**L'intensité de fluorescence dépend de :**

- l'intensité  $I_0$  de la source

- l'appareillage

La longueur d'onde d'excitation

- la concentration de la solution fluorescente

### **8. Durée de vie de fluorescence ou temps de déclin**

Durée de vie moyenne de l'état excité : plus ce temps est court, plus la sensibilité du fluorochrome est élevée.

$$\tau = \Phi \cdot \tau_N$$

Avec :

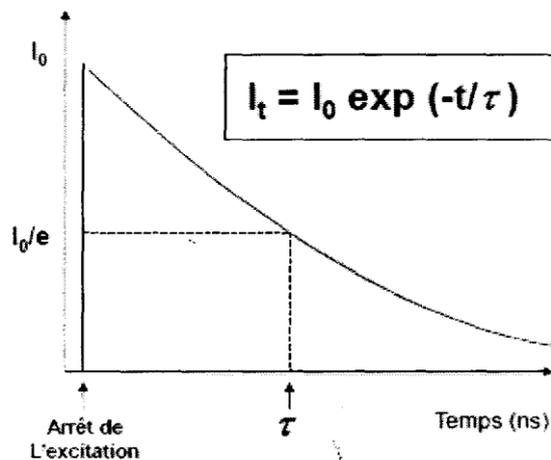
$\tau$  : durée de vie de fluorescence

$\Phi$  : rendement quantique

$\tau_N$  : constante de temps intrinsèque de l'état excité (fluorescence seule)

Le temps de vie radiatif est caractéristique de chaque espèce moléculaire fluorescente, il est de 1 à 100 ns

Décroissance exponentielle de l'intensité de fluorescence à l'arrêt de l'excitation

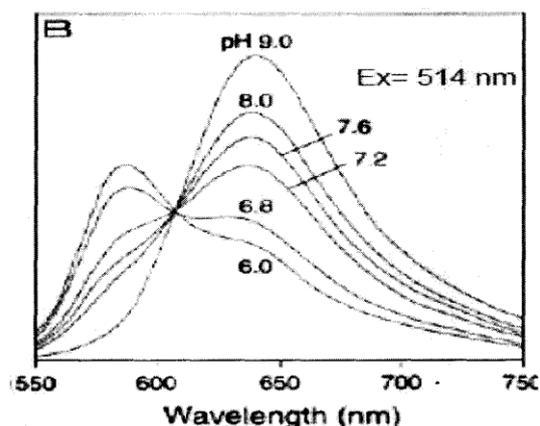


- Plus  $\tau$  est court, meilleure sera la fluorescence
- $\tau$  varie en fonction de l'environnement : solvant, pH...
- l'environnement, la nature du solvant, la température et le pH.

## 9. Effets de l'environnement sur la fluorescence moléculaire

### 1. Effet de pH :

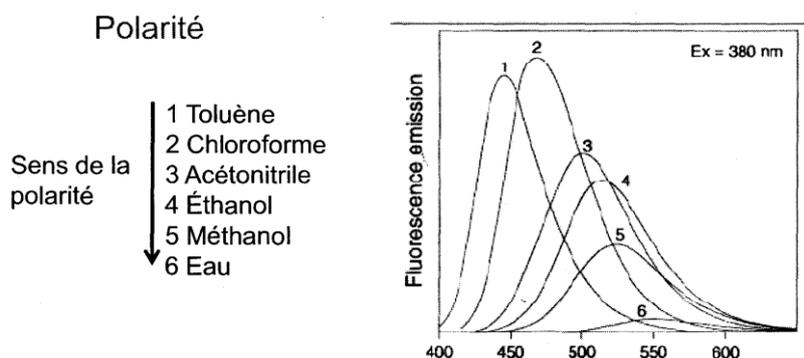
Modifications du rendement quantique et spectres d'émission et d'excitation



Spectres d'émission de fluorescence dépendant du pH

## 2. Effet de polarité

Quand la polarité augmente  $\lambda$  émission augmente



Exemple d'émission de fluorescence du 6-bromoacétyl-2-diméthyllaminonaphthaène

Par ailleurs des phénomènes de « Quenching » (extinction) peuvent se produire en présence d'autres composés à des concentrations importantes. En effet les collisions entre molécules entraînent des pertes d'énergie non radiatives et donc une baisse de la fluorescence.

## 10. Emission parasite en fluorimétrie

Des émissions radiatives parasites dues au solvant peuvent gêner la lecture de la fluorescence si les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont proches :

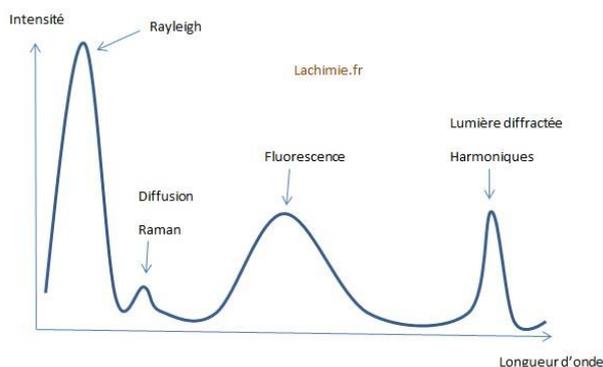
### 1. La diffusion Rayleigh :

Le solvant réémet une partie de l'intensité incidente à la même longueur d'onde

## 2. La diffusion Raman :

Il y a excitation des molécules du solvant (énergie de vibration). Le retour à l'état fondamental s'effectue avec émission de photons à de plus grande longueur d'onde. Elle est beaucoup plus faible que la diffusion Rayleigh.

C'est une collision non élastique. Observation d'une émission à des longueurs d'onde supérieures à celles à d'excitation.



## 11. Quenching de fluorescence

On appelle quenching l'effet physicochimique qui détermine une diminution de l'émission de fluorescence par transfert d'énergie à une autre molécule (le quencher).

Le quenching est la collision correspond au phénomène suivant :

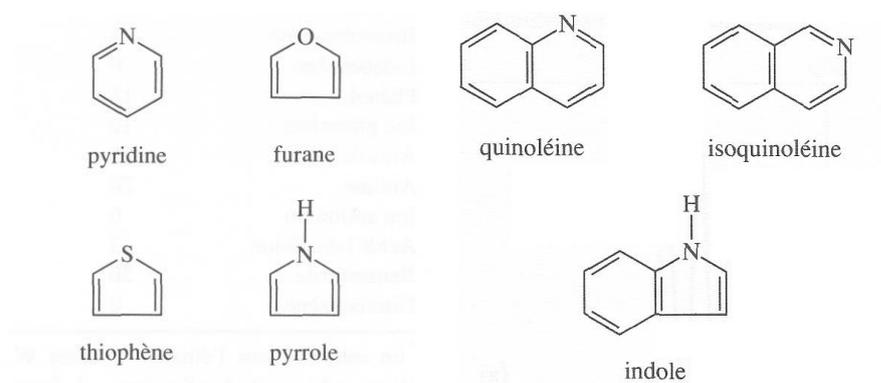
- Le quencher entre en collision par diffusion avec le fluorophore excité, à la suite de ce collision, l'énergie d'excitation est transférée au quencher et le fluorophore.
- Le quenching par formation d'un complexe (quenching dit statique)

Un complexe se forme entre le quencher et le fluorophore et le complexe n'est pas fluo.

## 12. Fluorescence et Structure

Les composés qui contiennent des noyaux aromatiques produisent l'émission fluorescente Moléculaire la plus intense et donc la plus utilisée.

- La plupart des hydrocarbures aromatiques non substitués sont fluorescents en solution et le Rendement quantique ↗ avec le nombre de cycles et leur degré de condensation.
- Les hétérocycles simples ne présentent pas de fluorescence



Quelques exemples de molécules aromatiques qui ne sont pas fluorescentes.

Quelques exemples de molécules aromatiques qui sont fluorescentes.

### 13. Les appareils de fluorescence

Un fluorimètre, tout comme un photomètre, utilise des filtres comme sélecteur de longueurs d'onde.

**1-Source lumineuse :** Lampe au xénon, deutérium, laser

**2-Monochromateur d'excitation :** Sélection de  $\lambda_{\text{photon d'excitation}}$

**3-Cuve :**

Visible : Verre ou plastique

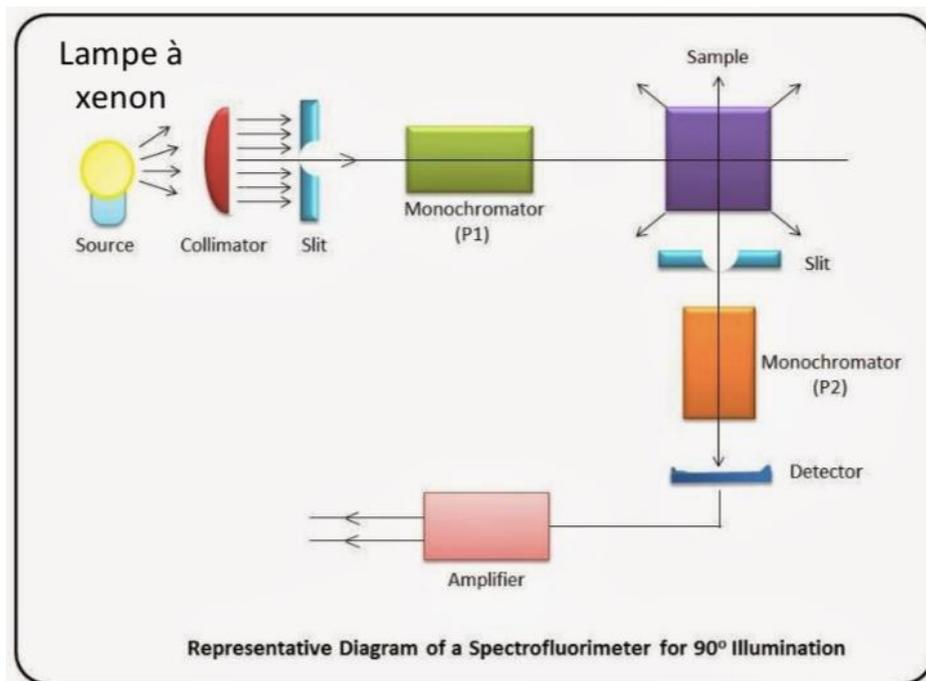
UV : Quartz

**4-Monochromateur d'émission :** Sélection de  $\lambda_{\text{photon d'émission}}$  (placé dans une direction perpendiculaire à celle de la source)

**5-Détecteur :** photomultiplicateur

Mesure du faisceau émis perpendiculairement au faisceau incident, pour éviter que la lumière venant de la source ne fausse pas les mesures.

**6-Système de recueil et d'analyse des données**



Le faisceau de l'échantillon traverse d'abord un monochromateur primaire (P1) (monochromateur d'excitation) qui transmet le rayonnement qui provoque la fluorescence. Le rayonnement fluorescent est émis par l'échantillon dans toutes les directions, mais il s'observe le plus facilement perpendiculairement au faisceau incident ; aux autres angles. Le rayonnement émis atteint un détecteur photoélectrique après avoir traversé un monochromateur secondaire P2 (monochromateur d'émission) qui isole le pic de fluorescence sélectionné par la mesure.

#### 14. Applications des méthodes de fluorescence

La spectrofluorimétrie est une méthode sensible et spécifique qui est utilisée, aussi bien dans le contrôle de qualité, qu'en biochimie, ou dans l'étude du métabolisme des médicaments.

Les applications principales de la fluorimétrie concernent surtout l'analyse des produits alimentaires, des produits pharmaceutiques, des prélèvements médicaux et des produits naturels. La sensibilité et la sélectivité de la méthode en font un outil particulièrement bien adapté à ces domaines.

Elles sont de 2 types :

##### 1. Méthodes directes :

Elles sont basées sur la réaction de l'analyte avec un agent chélatant pour former un complexe fluorescent.

## **2. Méthodes indirectes :**

Elles dépendent de la diminution ou désactivation (quenching) de la fluorescence d'un réactif causée par sa réaction avec l'analyte. La désactivation est surtout utilisée pour le dosage des anions.

## **3. Méthodes utilisées pour les espèces organiques et biochimiques**

Dosage de substances organiques comme :

- l'adénine, l'acide anthranilique, des hydrocarbures polycycliques aromatiques, la cystéine,

La guanidine, l'indole, des naphthols, des protéines, l'acide salicylique, le scatole, le tryptophane, l'acide urique et le warfarin.

- Des produits médicaux :

L'adrénaline, l'alkyl morphine, la chloroquine, la digitaline, le diéthylamide de l'acide lysergique (LSD), la pénicilline, le phénobarbital, la procaine et la réserpine.

## **4. Applications quantitatives :**

### **Études des spectres :**

- L'analyse quantitative nécessite une très faible quantité de substance de l'ordre du microgramme par prise d'essai

- limite de détection : la limite de détection est de l'ordre  $10^{-9}$  mol/l

### **Études des substances végétales :**

Chlorophylle, la phéophytine, huiles, flavonoïdes....

### **Imagerie moléculaire de fluorescence (biomédical)**

-visualiser les molécules qui dépassent la limite de résolution du microscope optique

### **- Diagnostic clinique :**

- Dosages par immunofluorescence de tissus, microbiologie, pathologie, cytogénétique

-Extraire des informations sur le fluorophore et son environnement (interactions entre protéines)

### **-Détecteur en HPLC**

### **-Détecteur en Electrophorèse Capillaire**

### **Conclusion**

Les techniques de spectrofluorescence sont très sensibles. La fluorescence est fortement influencée par son environnement immédiat tels que la température, la polarité, le pH .... Ce sont des méthodes d'analyse globale comme des empreintes soit d'un fluorophore ou plusieurs fluorophores, d'une matrice, d'un processus.