

SPECTROFLUORIMETRIE D'ABSORPTION EMISSION MOLECULAIRE

1 Principe = aspect qualitatif

1.1 Rappels sur le rayonnement visible :

1.2 Principe de la fluorescence

2 Aspect quantitatif

2.1 Rendement quantitatif de fluorescence

2.2 Intensité de la fluorescence

2.3 Expression des spectres

3 Molécules concernées

4 Appareillage

5 Phénomènes parasites

5.1 Phénomènes liés à l'appareillage

5.2 Phénomènes liés aux mesures en solution

5.3 Phénomènes liés à l'échantillon (phénomènes internes, externes)

6 Applications analytiques de la fluorescence

6.1 Applications qualitatives

6.2 Applications quantitatives

7 Conclusion

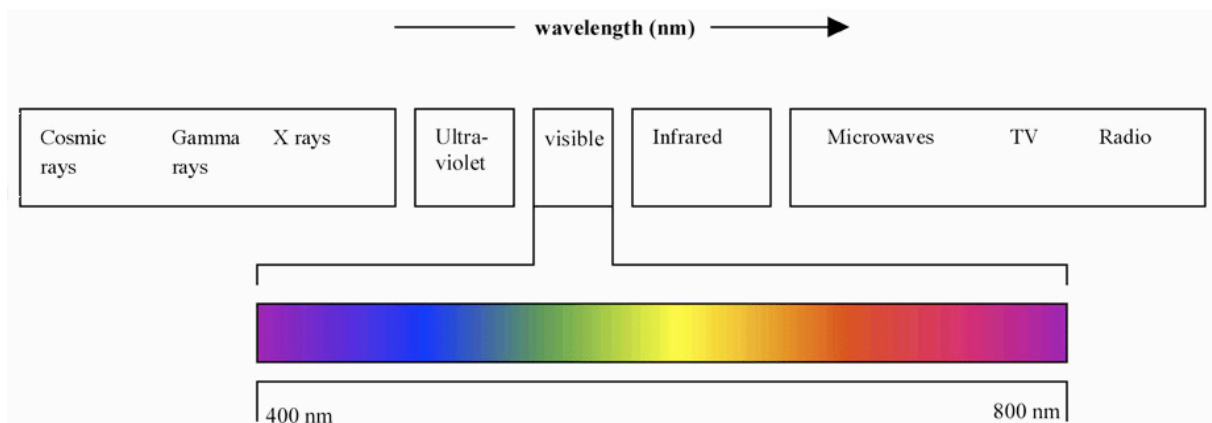
Introduction

- La fluorescence est définie comme l'émission de lumière par des molécules sans dégagement de chaleur.
- Selon la source d'apport d'énergie, on distingue :
 - La chimiluminescence → Energie fournie par une réaction chimique
 - Bioluminescence → Energie fournie par une réaction enzymatique
 - Fluorescence → Energie fournie directement par absorption photonique / lumière
- La grande sensibilité et la sélectivité de cette technique ont permis de développer de nbsses applications, notamment dans le domaine de l'analyse des médicaments, des substances naturelles et de leurs métabolites dans les milieux biologiques.

1 Principe : aspect qualitatif

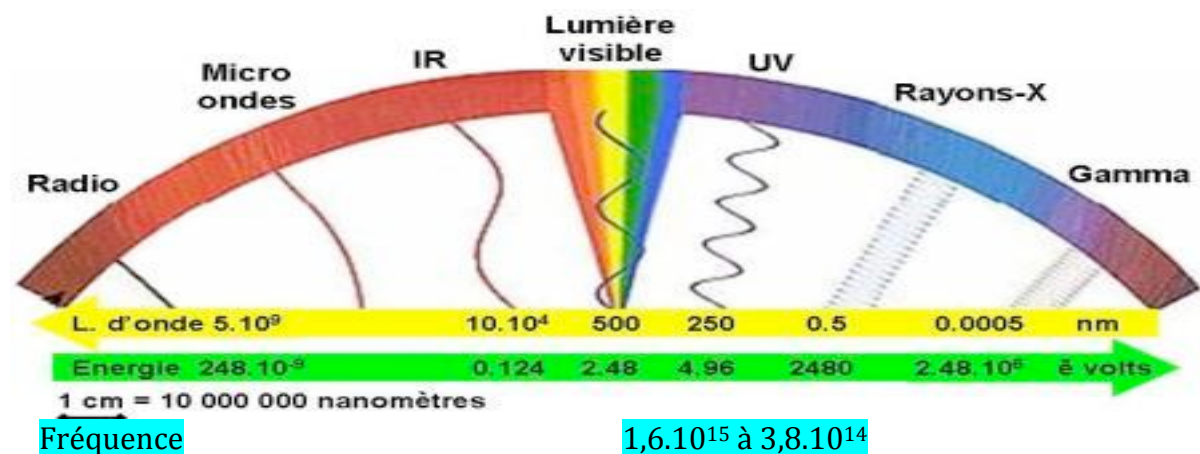
1.1 Rappels sur le rayonnement visible :

- Les ondes électromagnétiques **visibles** ont une longueur d'onde qui s'étant de **400 à 800nm**
- Les ondes **UV** s'étendent de **200 à 400 nm**.



- Ces rayons électromagnétiques transportent une énergie E exprimée par la relation suivante :

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$



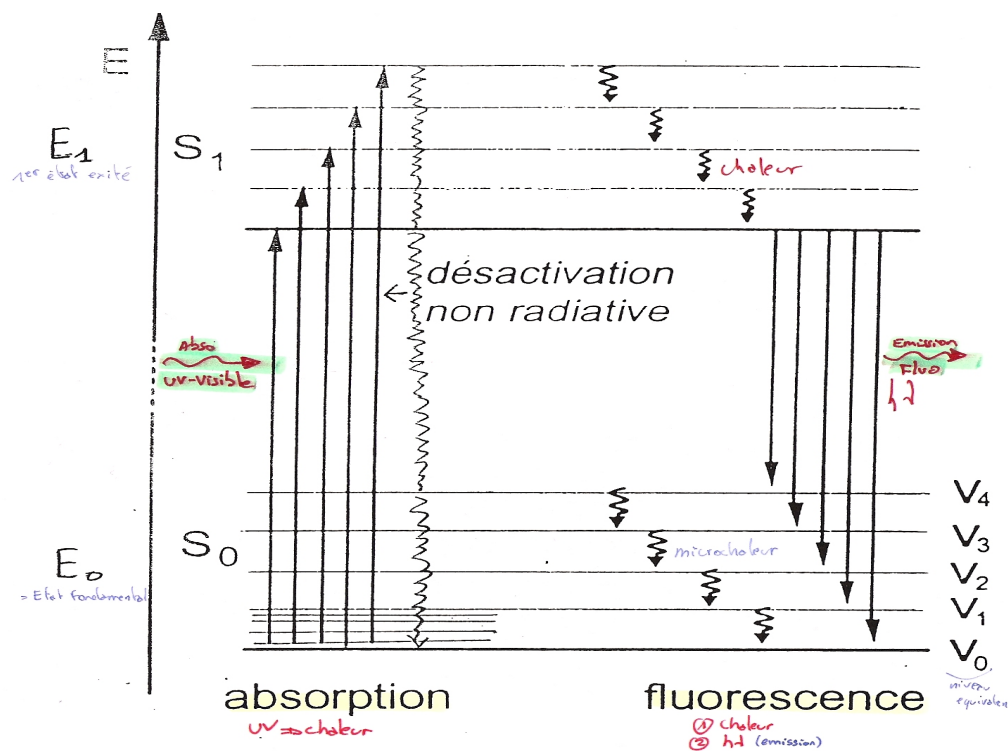
- Ces énergies correspondent aux énergies de **transition électronique** de molécules → à T° ambiante, la plupart des molécules sont dans leur état électronique et leur état de vibration fondamental, plusieurs états de vibrations peuvent être occupés conformément à la répartition de Boltzman.

1.2 Principe de l'absorption-émission de fluorescence :

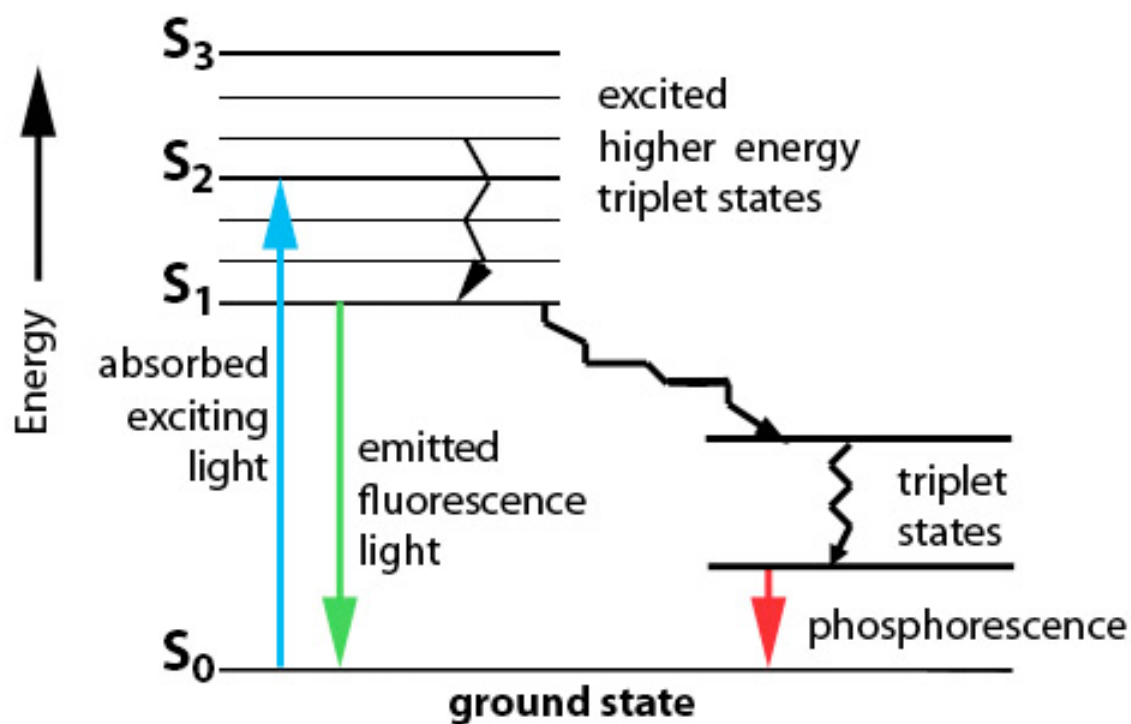
- La fluorimétrie étudie l'EMISSION de lumière par des molécules, en solution ou à l'état solide, après excitation par des photons appartenant au domaine du **visible** ou du **proche ultraviolet**.
- Lorsque qu'une molécule fluorescente absorbe un photon d'énergie, les électrons vont passer de **l'état fondamental E0 à l'état excité E1** (instable). Il vont ensuite revenir à l'état vibrationnel le plus bas de E1 par perte de microchaleur → C'est la **relaxation**
- Ils vont finalement retourner à l'état fondamental E0 avec émission d'un **photon de fluorescence** = énergie
- Seule les transitions $\pi \rightarrow \pi$ et $n \rightarrow \pi$ donnent lieu à une fluorescence.
- L'énergie ainsi émise, **est inférieure à l'énergie d'excitation** (inverse pour la λ).
- Le spectre d'émission est l'image du spectre d'absorption dans un miroir.

NB : La phosphorescence passe par une étape supplémentaire → l'état triplet ou il y a retournement de spin (phénomène plus long).

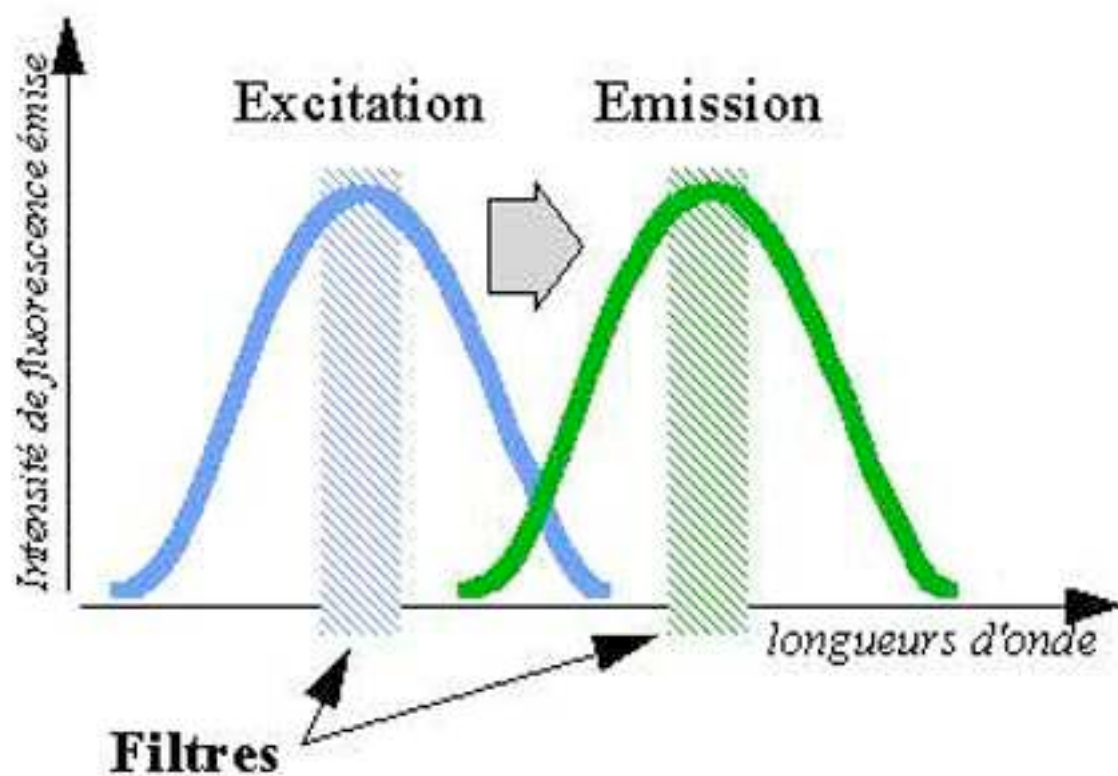
Diagramme de Jablonski et spectre de fluorescence



MECANISME DE L'ABSORPTION UV
ET DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE



Loi de Stokes



2 Aspect quantitatif

2.1 Rendement quantitatif de fluorescence

➤ Rapport du nombre de photons émis au nombre de photons absorbés :

$$\text{Rendement quantique } \phi = I_f / I_a \quad (\text{sans unités})$$

- ϕ est compris entre 0 (absence de fluorescence) et 1 (fluorescence maximale).
- ϕ dépend, il est caractéristique :
 - de la molécule
 - du solvant, du pH
 - de la T° (ϕ diminue lorsque la T° augmente)
- ϕ ne dépend pas :
 - de l'intensité de la source lumineuse
 - de la longueur d'onde d'excitation (seuls les photons absorbés sont pris en compte)

2.2 Intensité de fluorescence +++

- L'intensité de fluorescence, à longueur d'onde λ , est proportionnelle à l'intensité lumineuse absorbée et au rendement quantique de fluorescence.

$$I_F = \phi \times I_A = \phi \times (I_0 - I)$$

Avec I_F = intensité de fluorescence

I_A = intensité absorbée ($I_0 - I$)

- L'intensité absorbée, I_A , est donnée par la loi de Beer-Lambert, l'intensité de fluorescence devient alors :

$$I_F = \phi \times I_0 \times (2,3 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c)$$

Avec I_0 = intensité incidente

- Or l'appareil ne capte qu'une partie de la fluorescence, on a donc :

$$I_F' = k \times (\phi \times I_0 \times (2,3 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c)) = K \times c$$

- L'intensité est exprimé en Einstein par secondes (1 einstein = 6.10^{23} photons)
- L'intensité dépend de :
 - La T° (si T° augmente $\rightarrow$ fluo baisse)
 - I_0 de la source (contrairement à l'UV-visible)
 - De la concentration en solution fluorescente
 - De l'appareillage (contrairement à l'UV-visible)
 - La λ d'excitation
 - La nature du solvant et du pH

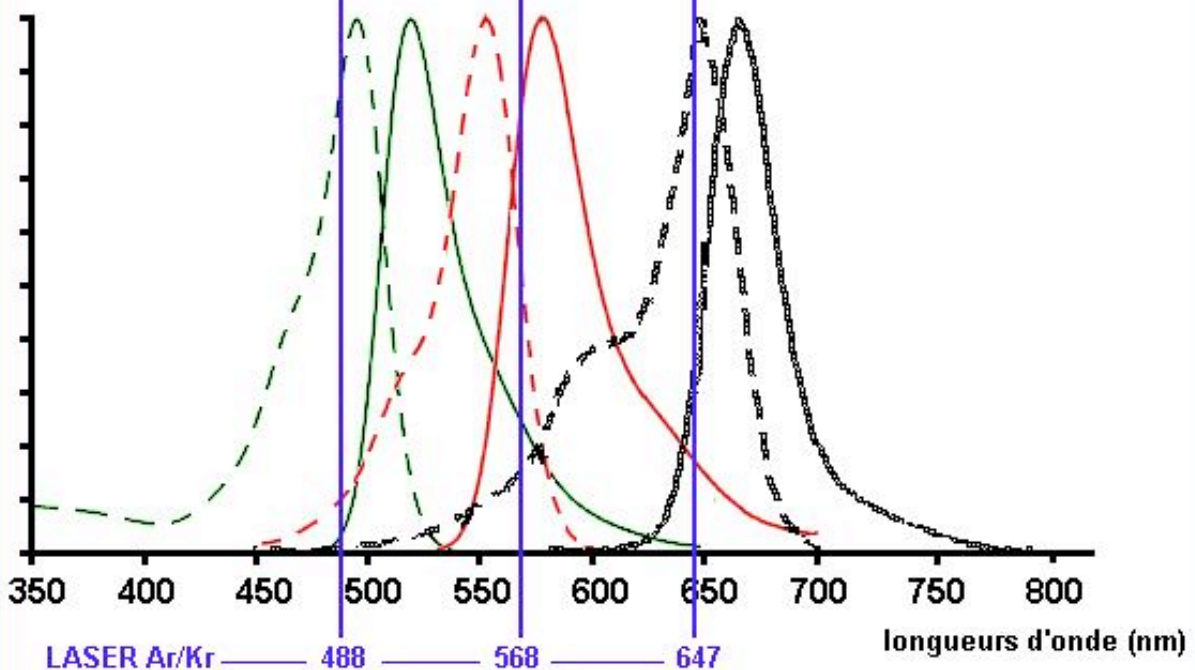
2.3 Expression des spectres

- Le spectre d'excitation d'une substance est obtenu en mesurant la fluorescence EMISE à une longueur d'onde fixe et en laissant varier la longueur d'onde d'EXCITATION
- Le spectre d'émission d'une substance est obtenue en mesurant la fluorescence EMISE aux différentes longueurs d'onde d'émission, en EXCITANT avec une longueur d'onde fixe.

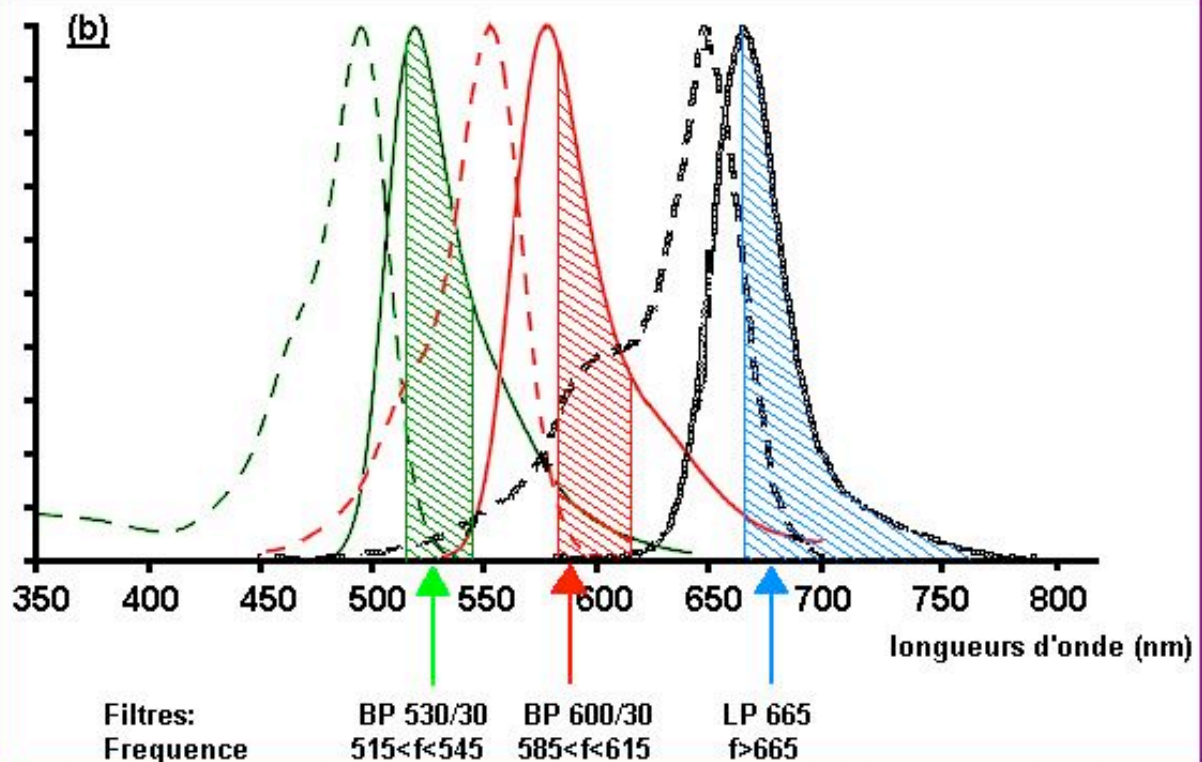
Figure 5

(a)

	Spectre d'excitation	Spectre d'émission
FITC	--- (green)	— (green)
TRITC	--- (red)	— (red)
Cy5	--- (black)	— (black)



(b)



3 Molécules concernées

- **Pour que la fluorescence se manifeste, pls caractéristiques sont nécessaires :**
 - Absorption dans l'UV (mais seulement 5% des substances absorbantes dans l'UV sont fluorescentes).
 - Forte probabilité maximale d'absorption ($\epsilon_{\max}$)
 - Faible énergie de transition électronique
 - Absence d'atomes ou de gpts favorisant les phénomènes non radiatifs dans la molécule.
- **Les molécules les plus fluorescentes sont :**
 - Des polycycles aromatiques → structure planes et rigides
 - Les substituants ortho ou para directeurs (-NR > -NH > -OR > -OH) sont activateurs de la fluorescence
 - Les substituants méta-directeurs (-COOH, -COOR, -CHO, -COR, -NO₂, -NO) et les atomes, sont désactivateurs de la fluorescence.
 - Gpts alkyls et acide sulfonique n'ont pas d'effet
- **Ex :**
 - Les fluorochromes :
 - Fluorescéine = FITC
 - Rhodamine
 - Rouge Texas
 - Phycoerythrine...
 - Vitamines
 - Cathécholamines
 - Médicaments : Aspirine, amphétamine, barbiturique, quinine, quinolones, furosémide
 - AA : Tyrosine, tryptophane → 5HT

NB : possibilité aussi de doser des ions minéraux après chélation.

4 Appareillage

- **Une source lumineuse :**
 - Lampes à arc au xénon :
 - Emission continue entre 220 et 700 nm
 - Leurs énergies varient en fct de la longueur d'onde
 - Ce sont les plus performantes
 - Les lampes à vapeur de mercure :
 - N'émettent qu'un spectre discontinu (raies entre 254 et 366 nm)
 - Ne sont utilisables que pour des composés absorbants dans l'UV
 - Les sources lasers :
 - Apparition récente → Encore peu utilisées
- **Un monochromateur d'excitation** (prisme ou réseau)
- **Une cuve** (en quartz)
- **Un monochromateur d'émission :**
 - Permet la sélection d'une bande étroite de longueur d'onde d'émission (car après excitation, l'éch émet dans toutes les directions)
 - Semblable au monochromateur d'excitation
- **Un photomultiplicateur** (transforme la lumière émise en courant électrique).
- **Un système de lecture du signal**

NB : Fluorimètre = 2 filtres (pas de monochromateur) → Analyse uniquement quantitative

5 Phénomènes parasites

5.1 Phénomènes liés à l'appareillage

5.2 Phénomènes liés aux mesures en solution

5.3 Phénomènes liés à l'échantillon :

La fluorescence est modifiée en raison de phénomènes provenant de la molécule elle-même (**phénomènes internes**) ou d'une interaction avec les molécules du solvant (**phénomènes externes**).

6 Applications analytiques de la fluorescence

6.1 Applications qualitatives

- Méthode **sensible** (identification de traces) et **spécifique** (/ interférences)
- Détermination du spectre d'absorption d'une substance dans les conditions où la spectroscopie UV-visible est inadaptée / sensibilité
- Permet de tracer le spectre d'excitation d'une molécule à très faible concentration ou en présence de substances absorbantes interférentes.

6.2 Applications quantitatives

- Analyse des médicaments ou de substances naturelles à concentration souvent faible dans les **milieux biologiques**.
- Analyse après excitation à une longueur d'onde déterminée
- **Analyse directe** de substances naturellement fluorescentes (ex : quinine, quinidine)
- Les molécules peu fluorescentes sont amplifiées par **hétérocyclisation**.
- Les molécules non fluorescentes peuvent être **rendues fluorescentes** par **dérivation de fluorescence**. Parmi ces composés de dérivation, la fluorescamine et la bromométhoxycoumarine peuvent interagir avec certains groupes fonctionnels d'AA, amines biogènes, prostaglandines...
- La fluorimétrie est également utilisable dans le cadre des méthodes immunologiques en phase homogène ou hétérogène, le traceur étant constitué par la molécule à doser marquée par un fluochrome.

Ex : le microscope à fluorescence

Stereomicroscope with Epi-Fluorescence Illuminator

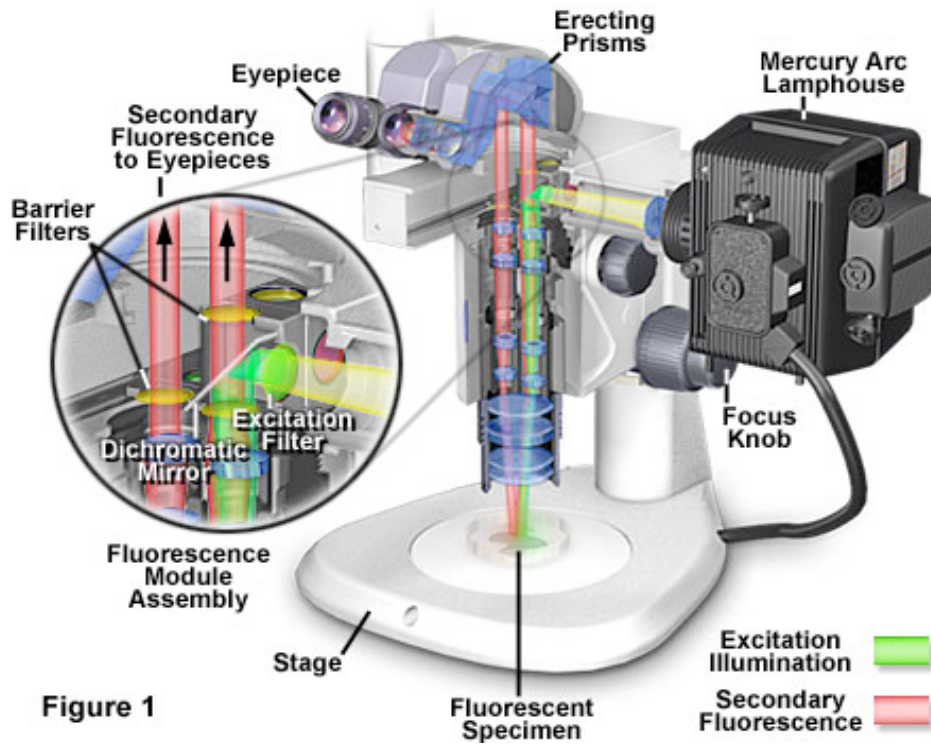


Figure 1

7 Conclusion

- Méthode **sensible, sélective** et possédant un large éventail d'applications en biologie et pour le dosage des médicaments.
- L'appareillage est cependant onéreux et la mise en œuvre de ces techniques assez délicate.