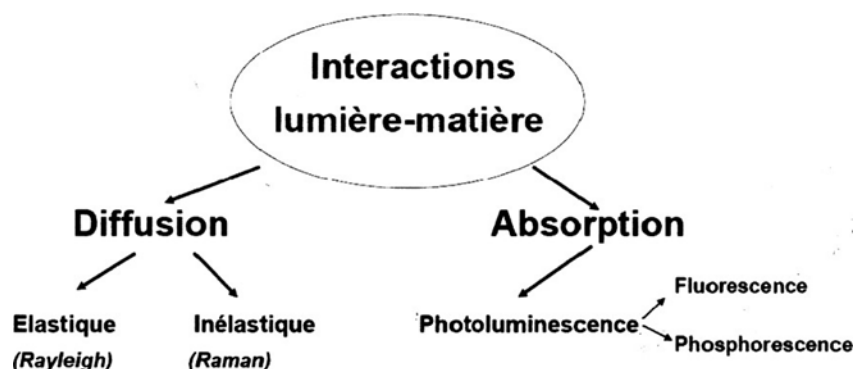


La Spectrofluorimétrie

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.

❖ Origine de la photoluminescence

1-Domaine spectral Le visible : 400-800 nm

Le proche ultraviolet : 200-400 nm

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.

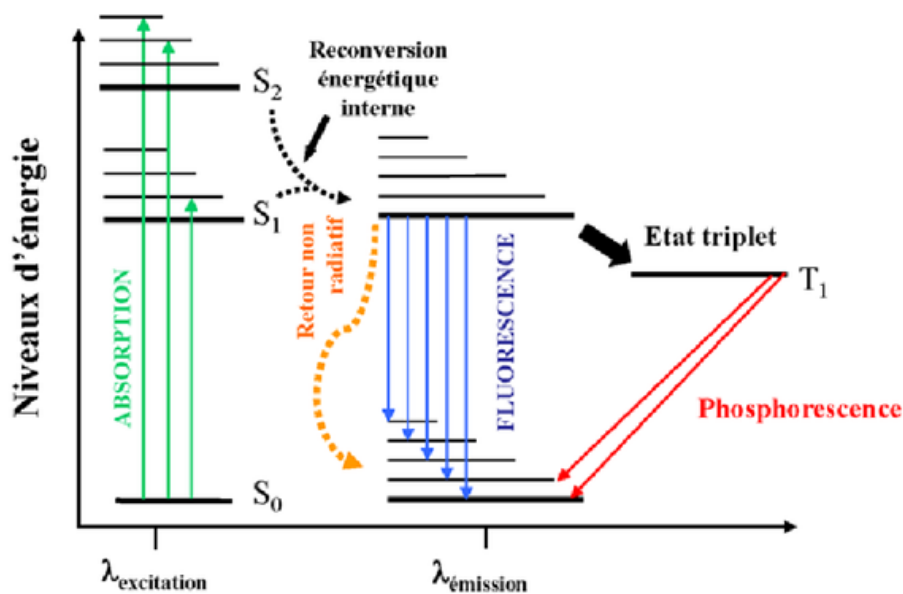


Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski montrant la différence entre fluorescence et phosphorescence

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).

La fluorescence moléculaire se produit par émission d'un photon (à λ_{em}) dont l'énergie correspond à la transition entre l'état électronique S1 et l'un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental S0. L'excès d'énergie vibrationnel par rapport à S0 est à nouveau perdu par un Processus de relaxation vibrationnelle.

a- 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 T1 à l'état fondamental Singulet S0.

-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.

-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 π .

4- Aspect du spectre :

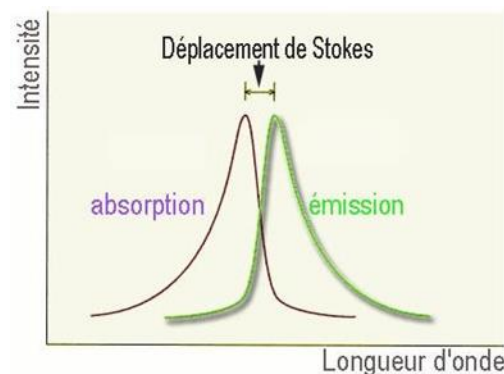
Spectres d'émission (absorption) et d'excitation de fluorescence

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.



5- 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
- 3- Cuve : Visible : Verre ou plastique UV : Quartz
- 4- Monochromateur d'émission
- 5- Détecteur : photomultiplicateur

6- 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.

-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 :

Etudes 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.