

1 Introduction

La fluorescence est un phénomène lumineux observé lorsqu'une molécule absorbe de l'énergie lumineuse, dans le domaine de l'UV ou proche du visible, et la réemet rapidement sous forme de lumière, dans le domaine du visible, à une longueur d'onde différente.

Ce phénomène est exploité en chimie analytique et en biologie, car il offre :

- Une très grande sensibilité : on peut détecter des concentrations extrêmement faibles (jusqu'au nanomolaire, voire picomolaire).
- Une sélectivité élevée : toutes les molécules n'émettent pas de fluorescence, ce qui permet de cibler certaines espèces.

La fluorescence est utilisée dans les domaines suivants : Dosage de traces de polluants dans l'eau, détection de biomarqueurs en médecine et biologie (colorants, protéines fluorescentes), suivi de réactions chimiques, marquage fluorescent en imagerie cellulaire, ...

Exemple : Utilisation de la fluorescéine dans les études environnementales

La fluorescéine est souvent utilisée pour tracer le chemin de l'eau dans les études hydrologiques. En ajoutant une quantité contrôlée de fluorescéine dans un cours d'eau, les scientifiques peuvent suivre le déplacement de l'eau ou identifier les sources de pollution.



La spectrofluorimétrie est une méthode plus sensible que l'absorbance, et souvent plus spécifique.

2 Le phénomène de fluorescence

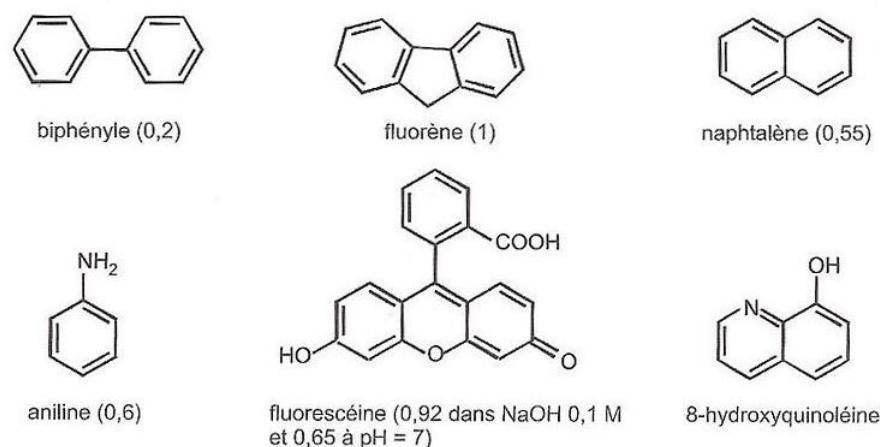
2.1 Espèce chimique fluorophore

Une espèce chimique fluorophore est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation en absorbant un photon.

On trouve des espèces chimiques fluorophore dans le domaine biologique : NADH, tryptophane, GFP (Green Fluorescent Protein).

La fluorescence est surtout caractéristique des molécules cycliques, rigides et possédant des liaisons π .

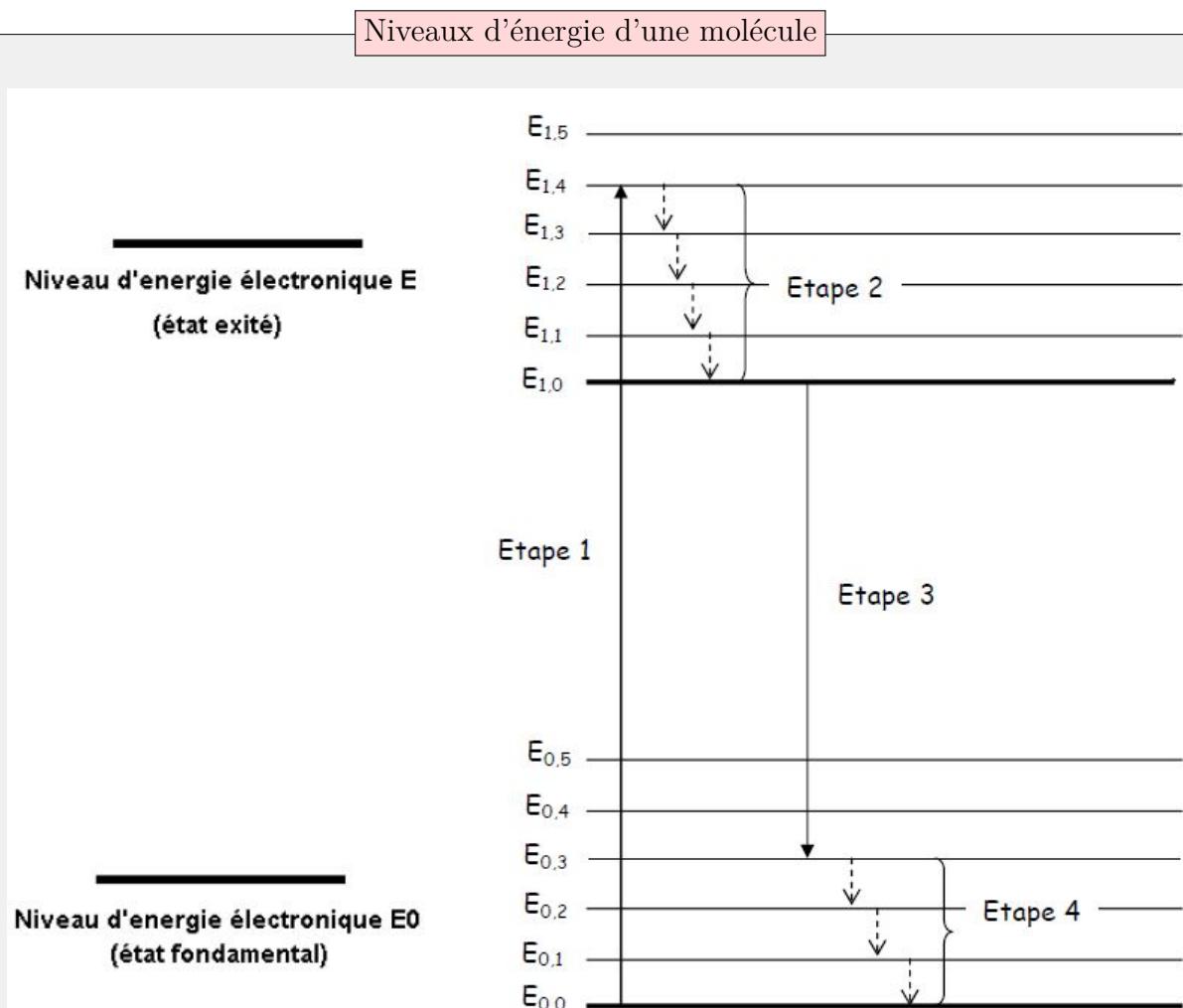
Exemple : Espèces chimiques fluorophores



2.2 La fluorescence

Lorsqu'une molécule absorbe un photon dans l'ultraviolet, une partie de l'énergie absorbée est convertie en énergie vibrationnelle, tandis que l'autre est restituée sous forme de photon réémis. Ce processus correspond à la fluorescence.

Pour comprendre ce phénomène, on utilise un diagramme énergétique qui met en évidence les différents niveaux électroniques et vibrationnels accessibles à la molécule.



Ce processus ne s'effectue pas d'un seul coup, mais en plusieurs étapes successives :

- Étape 1 : Excitation : La molécule absorbe un photon d'énergie E_e , par exemple correspondant à la transition entre les niveaux $E_{0,0}$ et $E_{1,4}$. Elle passe alors dans un état électronique excité.
- Étape 2 : Relaxation vibrationnelle (désexcitation non radiative) : Environ 10^{-12} secondes après l'excitation, l'énergie vibrationnelle et rotationnelle en excès est rapidement dissipée sous forme de chaleur lors des collisions moléculaires. La molécule atteint ainsi le niveau de plus basse énergie de l'état excité.
- Étape 3 : Émission de fluorescence : La molécule retourne vers un niveau vibrationnel ou rotationnel quelconque de l'état fondamental en émettant un photon d'énergie E_F , plus faible que celle initialement absorbée ($E_F < E_e$). C'est le phénomène de fluorescence, qui s'observe sur une échelle de temps comprise entre 10^{-7} et 10^{-9} secondes.
- Étape 4 : Retour complet à l'état fondamental : Enfin, la molécule rejoint le niveau le plus bas de l'état fondamental par une transition non radiative.

Remarque : Le photon absorbé est toujours plus énergétique que le photon émis. La différence d'énergie entre les deux photons correspond à l'énergie perdue par la molécule sous forme de relaxation vibrationnelle. On a :

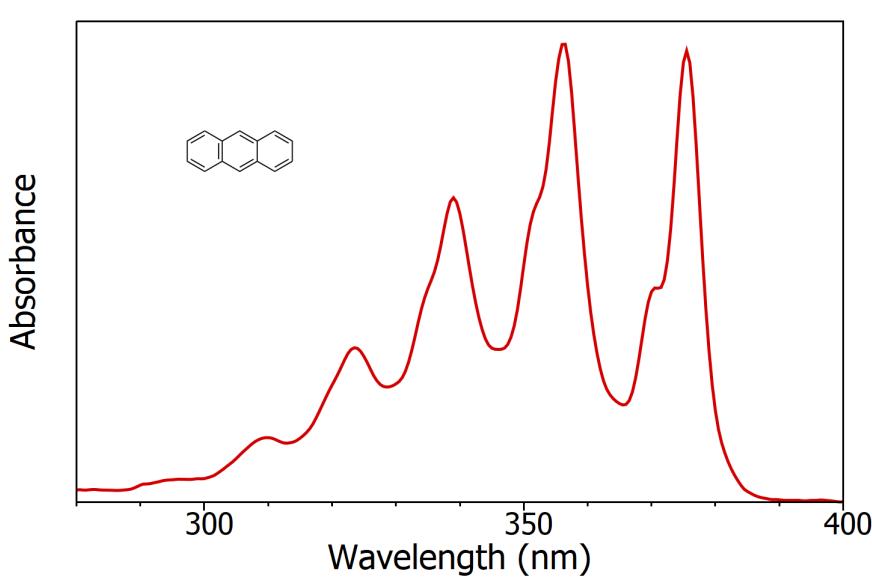
$$E_{\text{abs}} > E_{\text{émis}} \quad \text{et} \quad \lambda_{\text{abs}} < \lambda_{\text{émis}}$$

3 Les spectres en spectrofluorimétrie

3.1 Spectre d'absorption

Le spectre d'absorption représente la variation de l'absorbance d'une molécule en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente.

Exemple : Spectre d'absorption de l'anthracène



3.2 Spectre d'excitation

Le spectre d'excitation représente la variation de l'intensité de fluorescence émise à une longueur d'onde donnée, en fonction de la longueur d'onde d'excitation utilisée.

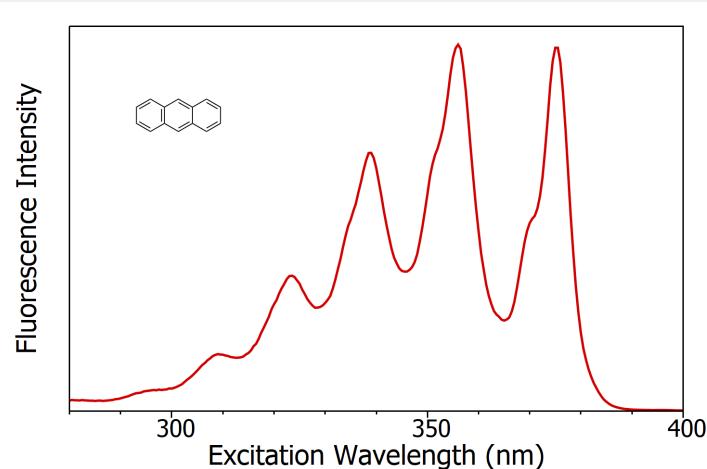
Pour réaliser le spectre d'excitation, on effectue les étapes suivantes :

- On fixe la longueur d'onde d'émission par fluorescence (λ_F fixée).
- On fait varier progressivement la longueur d'onde d'excitation (λ_e variable).
- On enregistre l'intensité de la fluorescence.

Le spectre d'excitation permet de déterminer la longueur d'onde d'excitation qui produit la fluorescence la plus intense.

Le spectre d'excitation ressemble généralement au spectre d'absorption.

Exemple : Spectre d'excitation de l'anthracène



3.3 Spectre d'émission

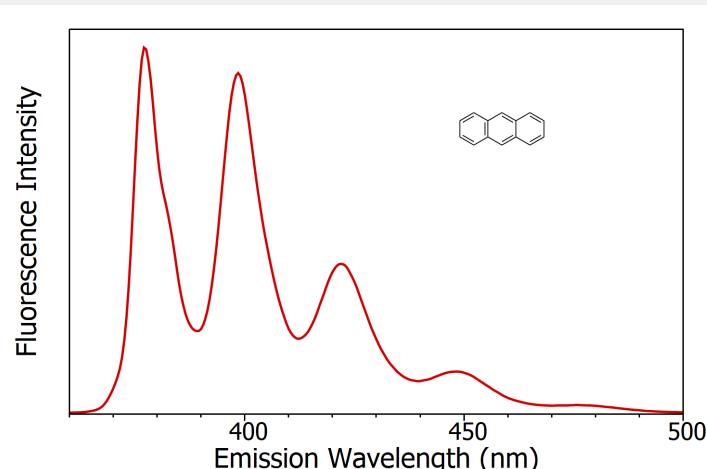
Le spectre d'émission représente la variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde émise, lorsqu'on excite la molécule à une longueur d'onde d'excitation fixe.

Pour réaliser le spectre d'émission, on effectue les étapes suivantes :

- On choisit une λ_e optimale (souvent proche du maximum d'excitation).
- On mesure l'intensité de la lumière fluorescente émise pour différentes longueurs d'onde (λ_F variable).

Le spectre d'émission est décalé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'absorption.

Exemple : Spectre d'émission de l'anthracène



3.4 Déplacement de Stokes

Si on superpose le spectre d'émission et le spectre d'absorption, les deux courbes se chevauchent partiellement mais avec un décalage : c'est le déplacement de Stokes.

Le déplacement de Stokes correspond à la différence entre la position du maximum d'absorption et celle du maximum d'émission.

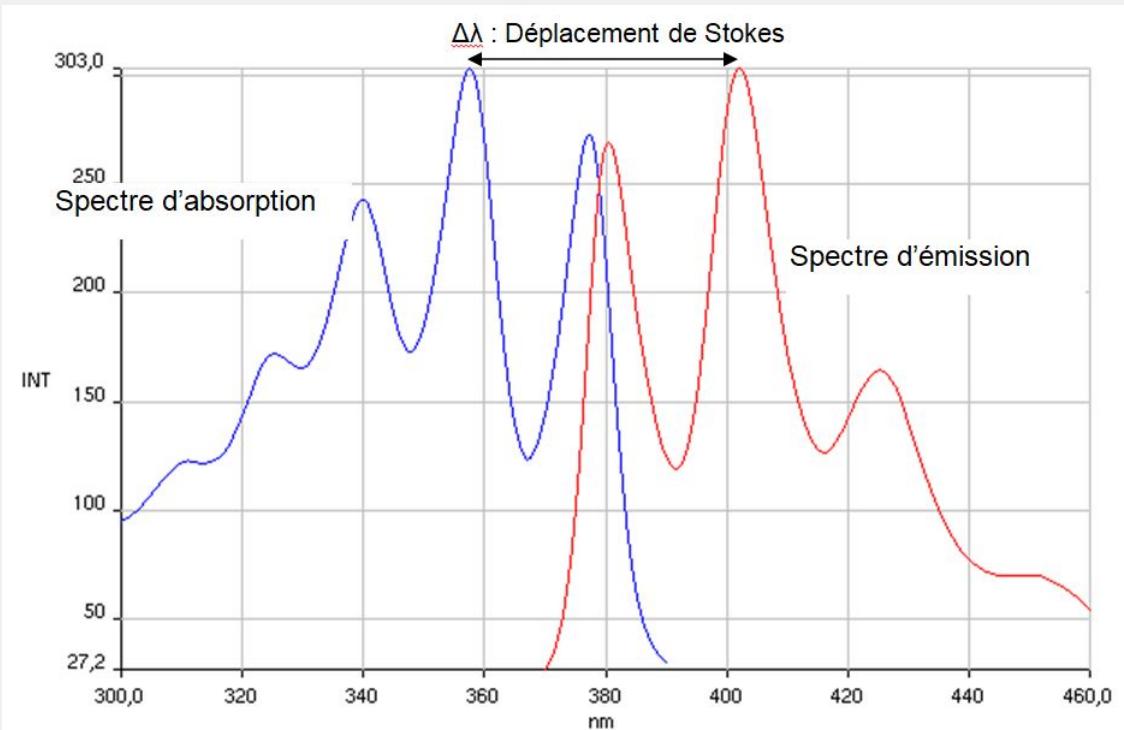
Expression du déplacement de Stokes

- $\Delta\lambda$: Déplacement de Stokes (nm)
- $\lambda_{\text{émission max}}$: longueur d'onde maximum d'émission (nm)
- $\lambda_{\text{absorption max}}$: longueur d'onde maximum d'absorption (nm)

$$\Delta\lambda = \lambda_{\text{émission max}} - \lambda_{\text{absorption max}}$$

En fonction de la valeur du déplacement de Stokes, on peut séparer la lumière absorbée de la lumière émise, facilitant la détection de la fluorescence et l'identification du fluorophore.

Exemple : Déplacement de Stokes de l'anthracène



$$\Delta\lambda = \lambda_{\text{émission max}} - \lambda_{\text{absorption max}} = 404 - 358 = 46 \text{ nm}$$

4 Spectrofluorimètre et intensité de fluorescence

4.1 Principe général du spectrofluorimètre

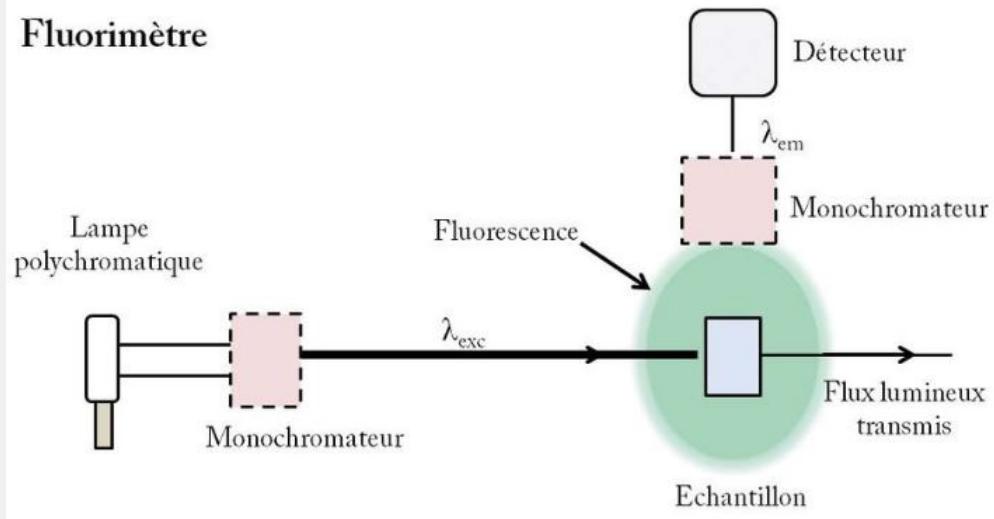
Un spectrofluorimètre est un instrument qui permet d'exciter un échantillon avec une lumière spécifique (longueur d'onde connue) et de mesurer l'intensité de fluorescence de la lumière qu'il réémet à des longueurs d'onde différentes, généralement plus grandes.

On excite l'échantillon à une certaine longueur d'onde (λ_e) et on mesure l'émission à une autre longueur d'onde (λ_F). L'appareil doit donc séparer excitation et émission d'où la nécessité de filtres ou monochromateurs spécifiques pour chaque domaine.

Les composants principaux d'un spectrofluorimètre sont les suivants :

- Source lumineuse : Lampe à arc (xénon), LED ou laser. Elles possèdent un large spectre pour balayer plusieurs longueurs d'onde d'excitation.
- Monochromateur d'excitation : Il sélectionne la longueur d'onde précise pour exciter l'échantillon. Il peut être remplacé par des filtres optiques.
- Cellule contenant l'échantillon : Souvent en quartz (transparent à l'UV). Elle possède une géométrie à 90° entre excitation et émission pour réduire la lumière parasite.
- Monochromateur d'émission : Il sélectionne la longueur d'onde de fluorescence que l'on veut mesurer.
- DéTECTEUR : C'est un tube photomultiplicateur (PMT) ou photodiode. Il mesure l'intensité de la lumière émise.

Schéma de principe d'un spectrofluorimètre



4.2 Intensité de fluorescence et concentration

La fluorescence est un phénomène quantitatif : plus il y a de molécules fluorescentes dans la solution, plus la lumière émise est intense. Ainsi, on peut relier l'intensité de fluorescence à la concentration de la molécule étudiée.

Cela constitue le principe du dosage par spectrofluorimétrie : À faible concentration, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration en espèces chimiques fluorophores.

L'intensité de fluorescence peut s'écrire sous la forme suivante :

Expression de l'intensité de fluorescence

$$I_F = k \times C$$

- I_F : Intensité de fluorescence
- k : coefficient qui sera évalué par étalonnage
- C : concentration en espèces chimiques fluorophores

Remarques :

- Il faut utiliser des solvants très purs et qui n'absorbent pas dans l'UV
- On arrive à déterminer des concentrations très faibles de l'ordre du ng/L
- Il existe des réactions chimiques spécifiques qui permettent de rendre fluorescents des composés qui ne le sont pas naturellement.
- A forte concentration, il n'existe plus de relation de proportionnalité entre l'intensité de fluorescence et la concentration en espèces chimiques fluorophores.

Un dosage par spectrofluorimétrie permet d'exploiter cette relation. En effet, lors de ce type de dosage, on prépare une courbe d'étalonnage : intensité de fluorescence en fonction de la concentration d'une série de solutions standards.

La partie linéaire de cette courbe est utilisée pour déterminer la concentration d'échantillons inconnus. On peut déterminer la concentration C de la solution par interpolation graphique ou par équation de la droite.

5 Désactivation de la fluorescence (Quenching)

5.1 Définition

Le quenching est un phénomène d'extinction de la fluorescence : l'intensité de fluorescence diminue en présence d'une autre espèce chimique ou à cause d'un processus particulier.

Une partie de l'énergie absorbée n'est plus réémise en fluorescence, mais dissipée par un autre mécanisme.

C'est un phénomène gênant pour la mesure, mais aussi exploité dans de nombreuses applications analytiques.

5.2 Types de quenching

Deux mécanismes principaux existent pour expliquer le quenching :

- Quenching dynamique (ou collisionnel) : La molécule excitée rencontre un désactivateur (ex. O_2 , ions halogénures, solutés variés). Lors de cette collision, l'énergie est transférée au désactivateur et dissipée sous forme de chaleur au lieu de produire un photon fluorescent. Plus la concentration du désactivateur augmente, plus l'intensité de fluorescence diminue.
- Quenching statique : Le désactivateur forme un complexe stable avec la molécule fluorescente avant l'excitation. Ce complexe n'est pas fluorescent et on a donc moins de molécules disponibles pour émettre. Contrairement au quenching dynamique, il n'y a pas de collisions après excitation mais une association préalable.

Exemples de désactiveurs :

- Oxygène moléculaire (O_2) : très efficace pour éteindre la fluorescence, utilisé pour mesurer la teneur en oxygène dans des systèmes biologiques ou industriels.
- Ions halogénures (I^- , Br^-) : extinction par transfert d'énergie.
- Protéines ou autres biomolécules : extinction de fluorophores par interactions moléculaires.