

L3 chimie, parcours CiB

UE Biophysicochimie

Fluorescence



Federico Cisnetti

Référence : *Analyse chimique*, F. et A. Rouessac *et al.*

UE Biophysicochimie

Extrait de la fiche disponible en ligne : Objectif de l'UE : donner des compléments en chimie physique et analytique, entre autres en lien avec l'interface chimie-biologie. Le contenu abordé permettra de donner des bases solides dans certains domaines physico-chimiques et spectroscopiques et de préparer les étudiants aux masters de chimie et aux masters à l'interface chimie-biologie qui utilisent ces pré-requis.

Même principe au S6 avec les UE chimie bio-organique et chimie bio-inorganique

Intervenants : Alain Dequidt (responsable de l'UE), Mounir Traikia, Federico Cisnetti

3 parties indépendantes : 3 évaluations continues écrites.

Fluorescence : 6 h, 20% de l'UE

Dans cette UE, les séances se dérouleront sous la forme de cours intégrés (pas de distinction CM/TD)

Phénomène de la fluorescence

La **fluorescence*** ou plus correctement la **photoluminescence** est la propriété qu'a un objet d'émettre un rayonnement lumineux (longueur d'onde λ') après avoir absorbé un rayonnement de longueur d'onde λ .



*La définition formelle de « fluorescence » sera précisée dans la suite du cours

3

Plan du cours

1. Rappels : spectroscopie atomique, spectroscopie d'absorption UV-visible
2. Principes physico-chimiques de la fluorescence : le molécule au spectre
3. Applications de la fluorescence en chimie analytique
4. Etudes de cas à l'interface chimie-biologie

Questions à traiter :

Quelle est l'origine du phénomène de la photoluminescence ?

Quel est le lien de la photoluminescence avec l'absorption de la lumière ?

Quels sont les avantages et les limites de l'utilisation de la fluorescence en chimie analytique? *Application possible en TP de chimie analytique avancée*

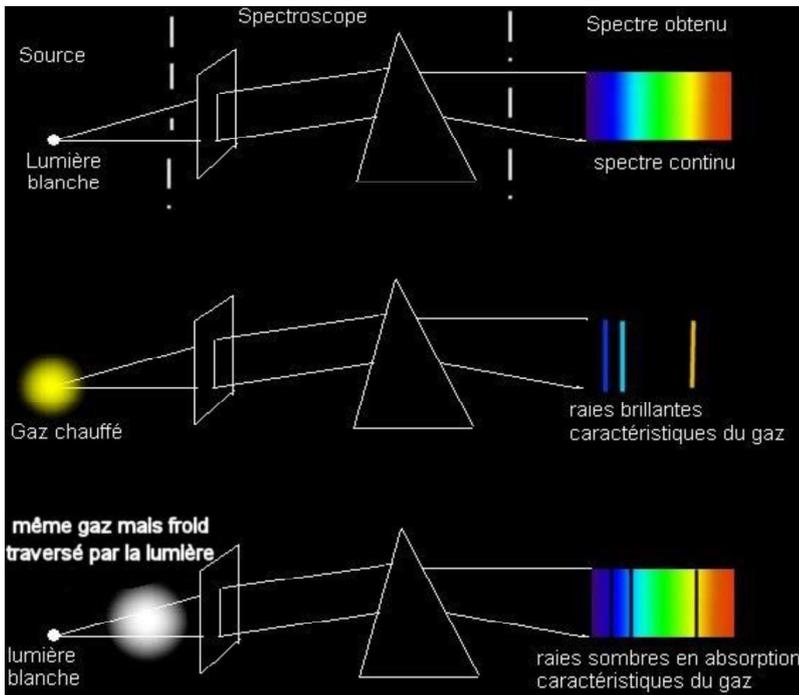
Quelles sont les utilisations de la fluorescence à l'interface chimie-biologie?

4

1. Rappels : spectroscopie atomique, spectroscopie d'absorption UV-visible

Spectres d'absorption et d'émission atomique

- Depuis le XIX^{ème} siècle, absorption et émission à l'état atomique : identification des éléments, puis quantification



Raies caractéristique de l'élément. Peu importe le composé.

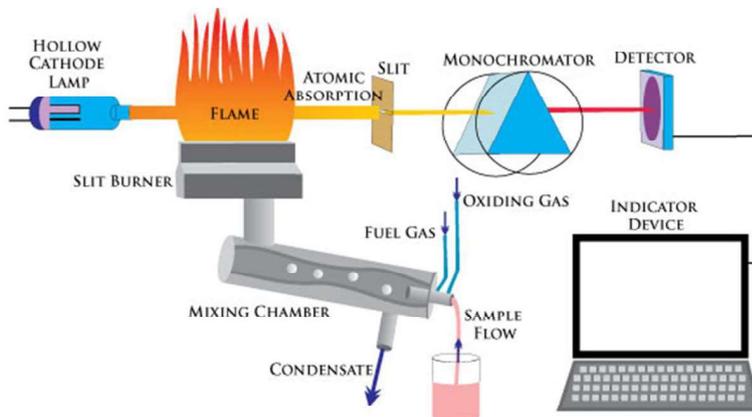
Longueurs d'onde invariables et précisément connues

Exemple Na : 589,5924 et 588,9950 nm (raies les plus intenses)

Raies d'absorption ou d'émission exactement à la même longueur d'onde

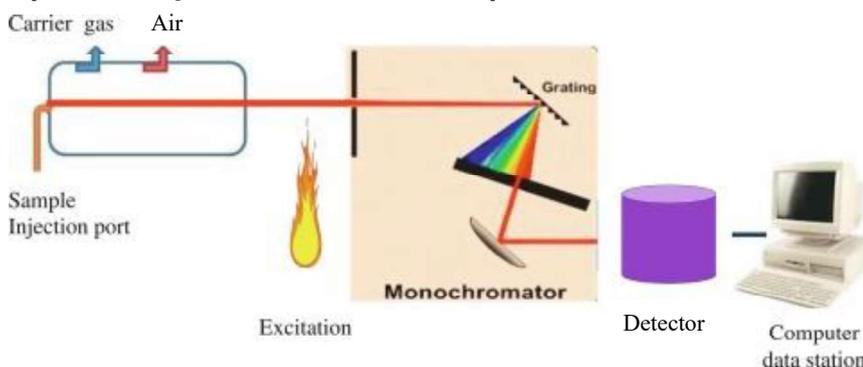
5

Spectroscopie d'absorption atomique



- Identification d'éléments dans un échantillon complexe
- Quantification (méthodes d'étalonnage nécessaires)
- Raies très fines → possibilité de dosage simultané de nombreux éléments

Spectroscopie d'émission atomique



Rappel :

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

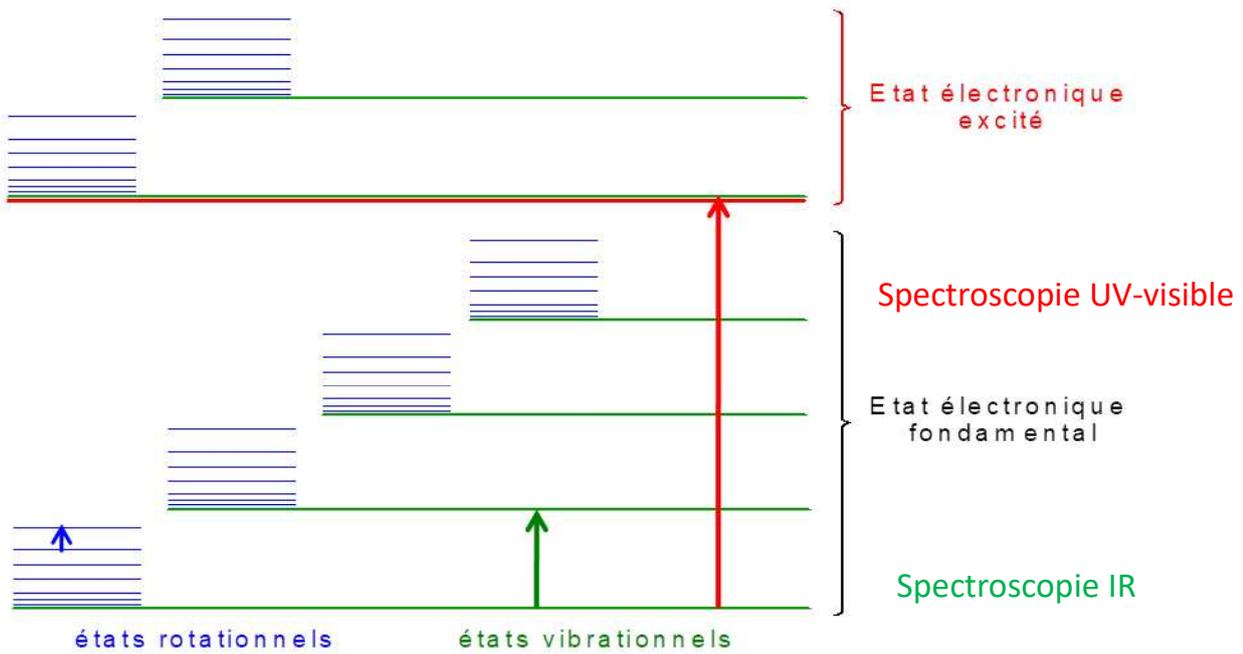
avec $1/\lambda = \bar{\nu}$

Exercice d'application : à quel nombre d'ondes en cm^{-1} et à quelle énergie en eV correspond la raie du sodium à 589,59 nm. $c = 2,9980 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$; $1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$; $h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ m}^2.\text{kg.s}^{-1}$

6

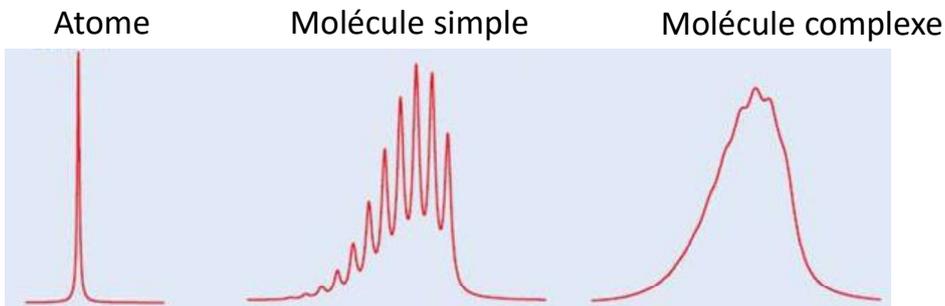
Spectroscopie d'absorption UV-visible

Niveaux d'énergie d'une molécule

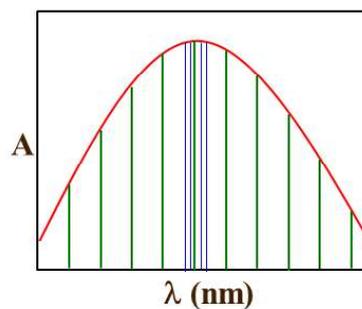
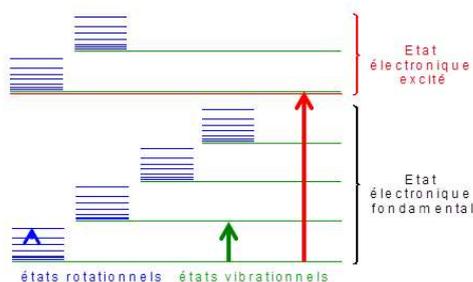


$$E_{\text{totale}} = E_{\text{électronique}} + E_{\text{vibration}} + E_{\text{rotation}}$$

7



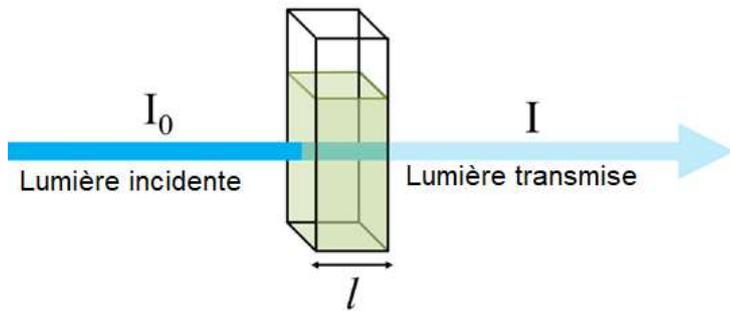
$$h\nu = \Delta E_{\text{électronique}} + \Delta E_{\text{vibration}} + \Delta E_{\text{rotation}}$$



Du fait des états rotationnels et vibrationnels moléculaires, on observe des **bandes** larges. *Limitation intrinsèque à l'identification des composés uniquement par leur signature UV* → utiliser l'UV-visible conjointement à d'autres spectroscopies.

8

Spectroscopie UV-visible : approche quantitative



Définition de l'absorbance et loi de Beer-Lambert

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon l c$$

Du fait de la définition de l'absorbance, expérimentalement, la loi n'est pas vérifiée au-dessus d'une certaine valeur dépendant de l'appareil :

De $A < 1,5$ (appareils de TP) à $A < 3$ (appareils de recherche).

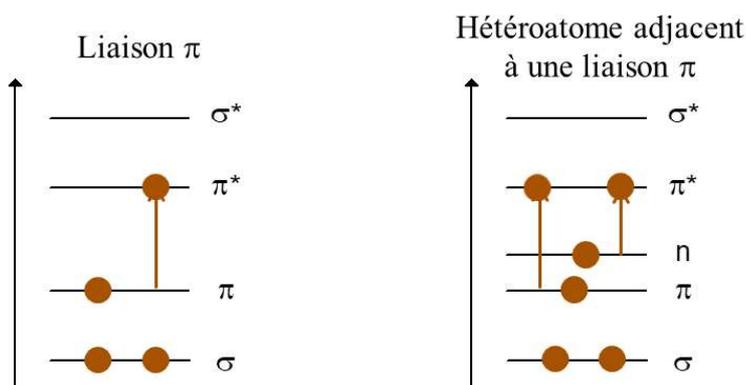
Exercice d'application : quel est le % de la lumière incidente qui traverse l'échantillon si $A = 4$?

La loi n'est pas non plus vérifiée pour des absorbances très faibles (incertitude de mesure).

Limite instrumentale (appareils courants) : $200 \text{ nm} < \lambda < 800\text{-}1100 \text{ nm}$

9

ϵ Absorptivité molaire



Dépend de la nature de la transition

Ordres grandeur de ϵ [$\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

Transition π - π^* : « permise »
 10^3 - 10^4

Transition n - π^* : « interdite »
 10^2

Métaux : transition d - d : « interdite »
 10^1 - 10^2

Métaux : transition d - p : « permise »
 10^3 - 10^4

Les *règles de sélection* définissent si les transitions sont permises ou interdites. Cela est lié à la nature des orbitales d'arrivée et de départ.

Rappel :

Orbitales atomiques de type $s, p, d, f \leftrightarrow$ nombre quantique ℓ (forme des orbitales atomiques, valeur du moment cinétique)

Les orbitales π et π^* sont des combinaisons liantes et antiliantes d'orbitales p

Une orbitale « n » non liante est une orbitale p localisée sur un atome et ne faisant pas partie d'un système conjugué

10

Absorption d'un photon : effet au niveau moléculaire (approche qualitative et simplifiée)

Selon la mécanique quantique, l'absorption d'un photon fait passer la molécule de son état fondamental à l'état excité.

Dans l'état excité, un électron a été promu à une orbitale de plus haute énergie.

L'absorption est un processus quasiment instantané (10^{-15} s)

L'orbitale de départ définit l'énergie de l'électron mais également la probabilité de le trouver dans différentes régions de l'espace.

L'absorption du photon (qui possède un moment cinétique quantifié) résulte en la modification du moment cinétique de l'électron (aussi bien sa quantité de mouvement $p = mv$, que la zone de l'espace qu'il occupe).

Mais l'électron ne peut exister dans la molécule que s'il est décrit par une orbitale.

→ l'absorption n'est possible que si la différence d'énergie entre les orbitales d'arrivée et de départ correspond à l'énergie du photon

ET

→ l'absorption n'est possible que si la forme de l'orbitale d'arrivée est différente de celle de l'orbitale de départ de façon à permettre à l'électron d'absorber le quantum de moment cinétique associé au photon.

➡ Diapo suivante : détail pour les orbitales atomiques et moléculaires

11

Absorption d'un photon : effet au niveau moléculaire (approche qualitative et simplifiée)

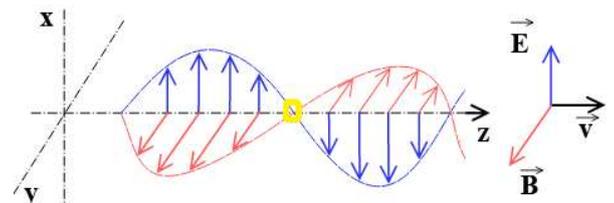
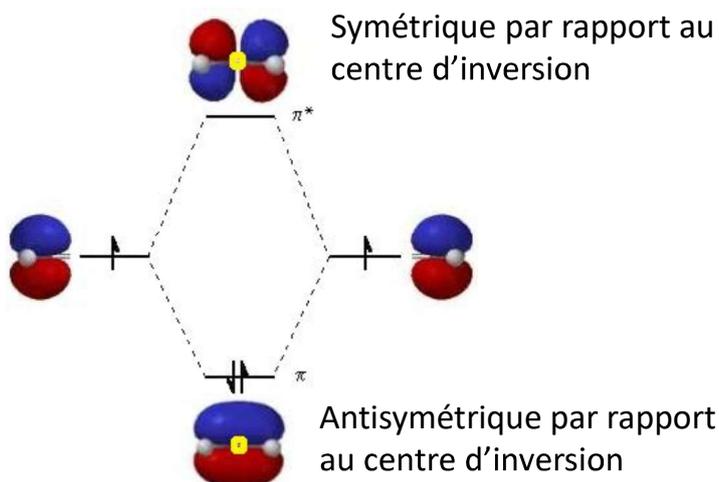
Pour les **orbitales atomiques** : le nombre quantique ℓ décrit le moment cinétique de l'électron
Les transitions s-p, p-d, d-f etc... sont permises car $\Delta\ell = \pm 1$

En revanche, des transitions pour lesquelles $\Delta\ell = 0$ sont interdites.

Exemple : les ions métalliques en solution aqueuse $M^{n+}_{(aq)}$ sont des en réalité des entités polyatomiques (complexes) $[M(H_2O)_m]^{n+}$. Cependant, les orbitales HO et BV sont principalement constituées d'OA de type d. (suite : cours de chimie bio-inorganique S6).

Les transitions sont donc essentiellement interdites → ϵ faible.

Pour les **orbitales moléculaires** π , π^* , n, on doit tenir compte qualitativement de la forme des orbitales et de leur parité. Exemple avec l'éthène :



Si l'origine est judicieusement placée, l'onde électromagnétique est également antisymétrique

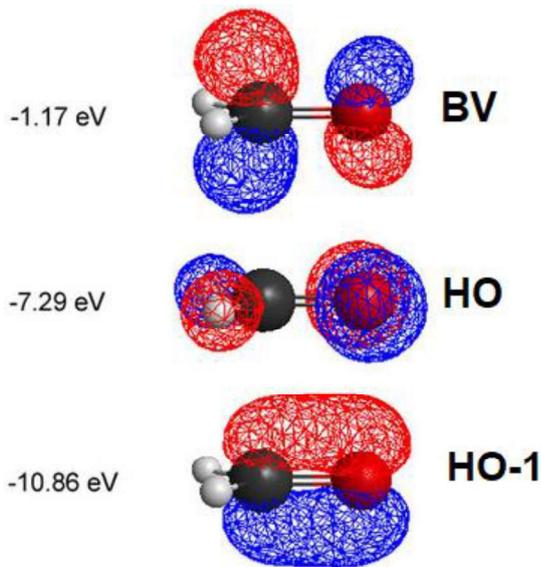
Avant abs. : électron dans OM antisym.

Absorption d'un photon

Après abs. : Électron dans OM symétrique
permise

12

Pour les **orbitales moléculaires** π , π^* , n , on doit tenir compte qualitativement de la forme des orbitales et de leur parité. Exemple avec le formaldéhyde :



Le formaldéhyde comporte une orbitale HO de type n (essentiellement un doublet non liant de l'oxygène) et une BV de type π^* .

La transition HO-BV n'est pas possible parce que la forme de l'orbitale HO n'a rien à voir avec celle de l'orbitale BV.

Même après avoir interagi avec un photon, l'électron dans l'orbitale HO ne peut occuper des zones de l'espace compatibles avec l'orbitale BV.

→ La transition $n-\pi^*$ est **interdite**
...en pratique elle est observée avec un ϵ faible.

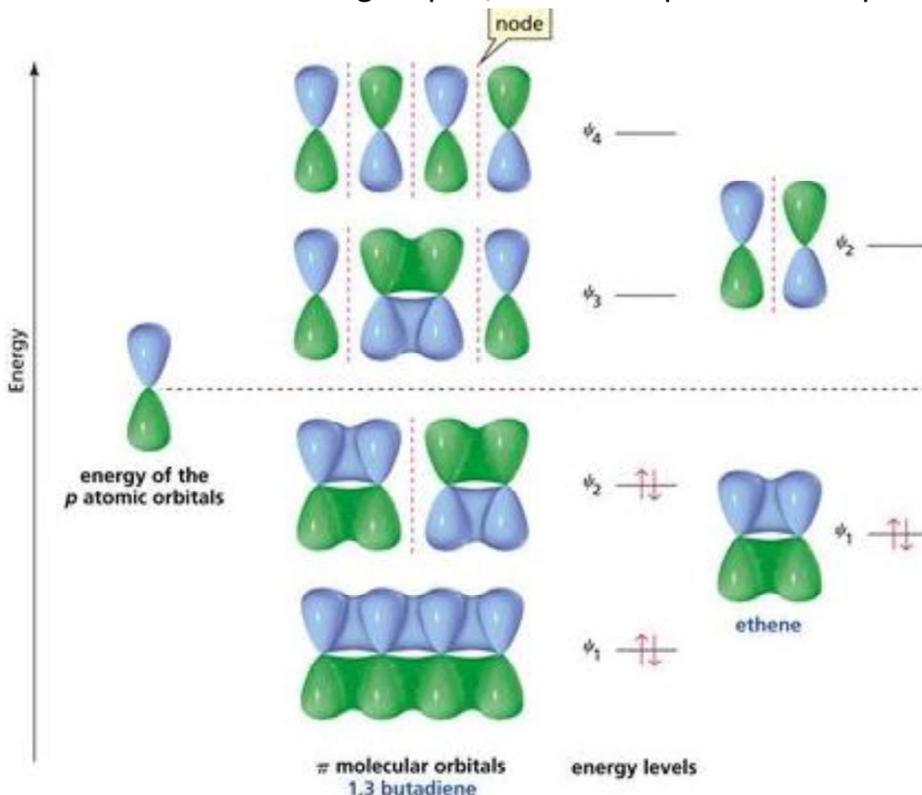
En revanche, la transition HO-1 → BV est une $\pi-\pi^*$ qui est **permise** comme dans l'éthène.

13

Notion de chromophore

Le **chromophore** est la partie de la molécule susceptible d'absorber la lumière.

Dans les molécules organiques, les chromophores correspondent au(x) système(s) conjugués.

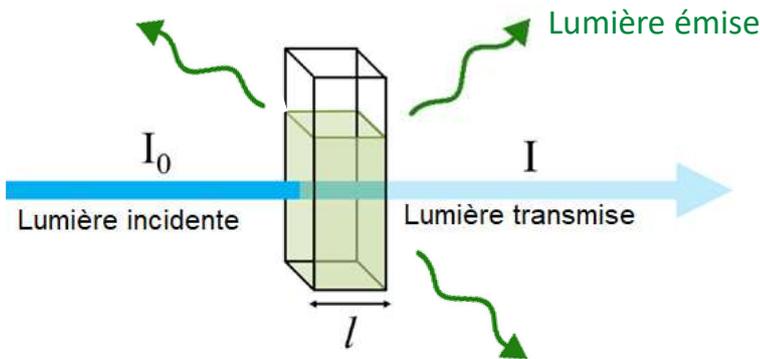


L'existence d'un système conjugué aboutit à un écart énergétique entre les orbitales HO et BV telle que l'absorption est mesurable avec un spectrophotomètre UV-visible.

Plus le système est étendu, plus l'écart est faible et plus l'absorption est déplacée vers le visible.

Dans les systèmes conjugués, il existe toujours des transitions $\pi-\pi^*$ permises

2. Principes physico-chimiques de la fluorescence : de la molécule au spectre



L'émission de la lumière se fait dans toutes les directions.

En fluorescence, l'absorption de la lumière est suivie de l'émission d'une lumière d'une longueur d'onde différente. La partie de la molécule responsable de la fluorescence est le **fluorophore**. Le fluorophore est toujours un chromophore.

Contrairement à la spectroscopie d'émission atomique, La longueur d'onde émise est *plus grande* que la longueur d'onde absorbée *car une partie de l'énergie des photons absorbés est perdue par des processus internes à la molécule*.

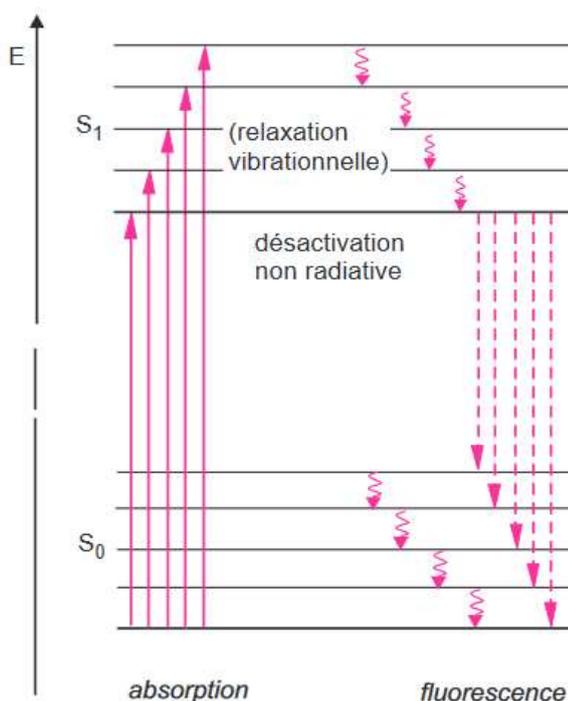
Exercice d'application :

Une molécule absorbe à 365 nm et réémet à 480 nm.

Quelle est, en eV, l'énergie perdue par photon absorbé (en supposant que chaque photon absorbé induise l'émission d'un photon)?

15

Le phénomène de fluorescence du point de vue des transitions électroniques



La fluorescence nécessite l'absorption d'un photon comme en spectroscopie UV-visible (10^{-15} s).

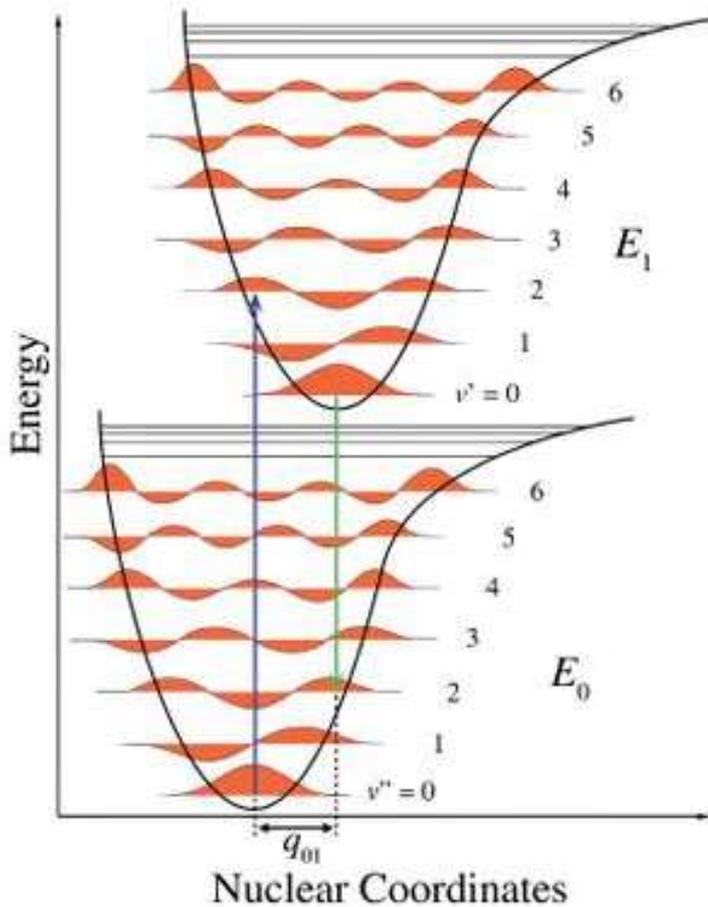
La molécule est à l'état électronique excité et possiblement dans un des états vibrationnels excités.

La relaxation vibrationnelle a lieu en 10^{-12} s.

L'émission d'un photon a lieu dans une échelle de temps (relativement) plus longue : 10^{-9} s.

L'émission a donc lieu de l'état vibrationnel fondamental de l'état électronique excité à l'état électronique fondamental (éventuellement dans un état vibrationnel excité).

16



Principe de Franck-Condon

Par définition, la molécule à l'état fondamental est plus stable que la molécule après l'absorption du photon.

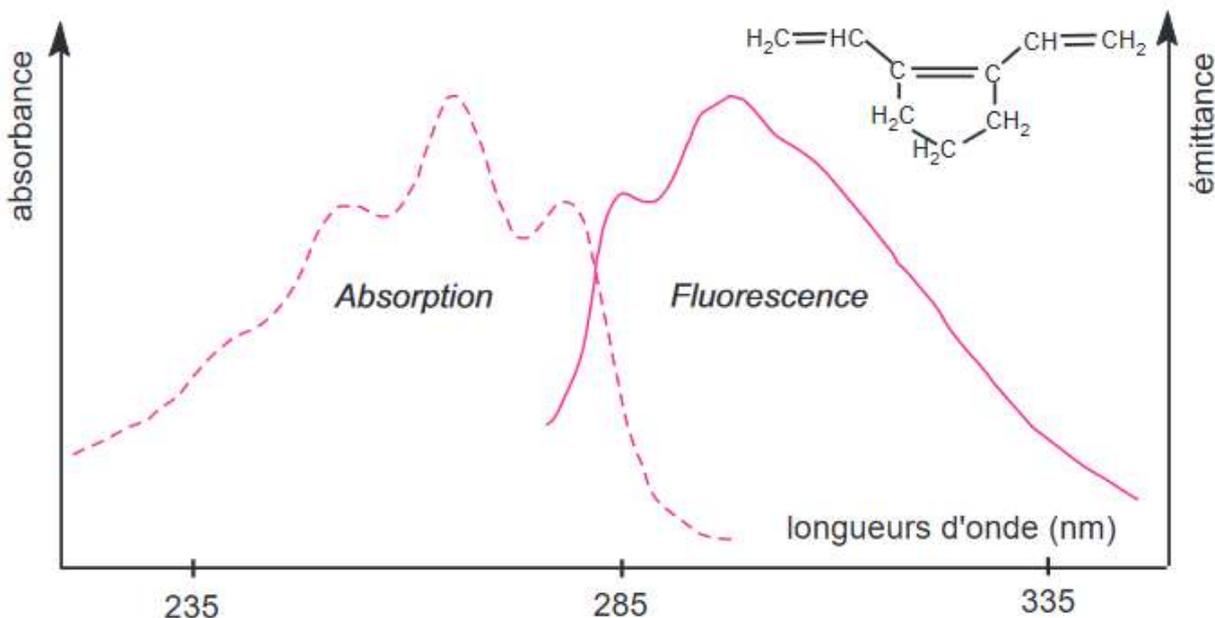
La vibration moléculaire a une amplitude d'autant plus grande que l'état vibrationnel est de haute énergie.

L'absorption ou l'émission d'un photon sont beaucoup plus rapides que le mouvement des noyaux.

→ Les coordonnées nucléaires de l'état fondamental (électronique et vibrationnel) correspondent à *un état vibrationnel excité de l'état électronique excité* (longueurs de liaisons plus grandes à l'état excité)

17

Effet miroir entre les spectres d'absorption et de fluorescence



La **structure vibronique** visualise les niveaux d'énergie vibrationnels (la largeur de chaque pic est due aux transitions rotationnelles)

Dans la plupart des cas, la transition 0-0 (états vibrationnels de plus basse énergie) n'est pas la plus intense.

Si le passage à l'état électronique excité modifie peu les états vibrationnels, le spectre de fluorescence est l'image dans un miroir du spectre d'absorption. Souvent, la structure vibronique est moins visible sur le spectre de fluorescence.

18

Spectres d'émission

On enregistre un spectre d'émission couvrant la ou les bandes observées.

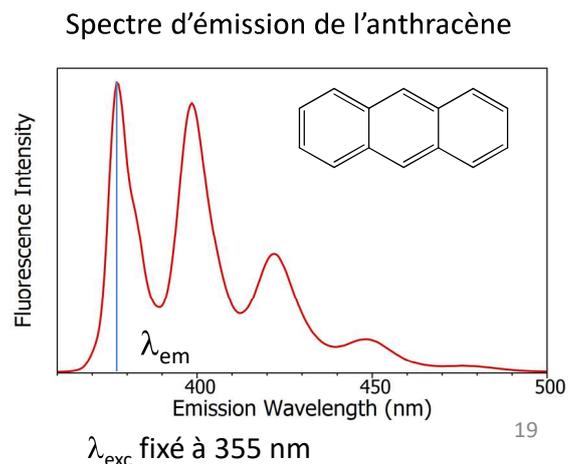
Dans le contexte de la fluorescence, l'absorption initiale d'un photon est nommée *excitation*.

Les bandes d'excitation (correspondant approximativement aux bandes d'absorption en spectroscopie UV-visible) sont à plus haute énergie et donc à plus faible longueur d'onde que les bandes d'émission.

L'excitation peut être effectuée avec une lumière continue ou (cas des appareils analytiques) avec une lumière monochromatisée, pour obtenir un λ_{exc} fixé pour l'analyse.

Une bande d'émission possède une intensité maximum : λ_{em}

Les deux longueurs d'onde λ_{exc} et λ_{em} définissent le phénomène de fluorescence, même si seule λ_{em} est visible sur le spectre.



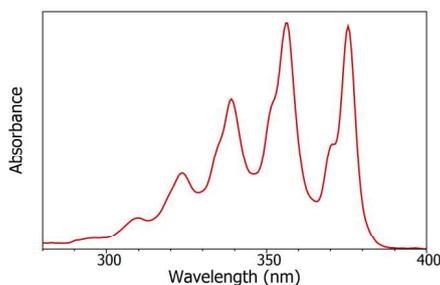
Spectres d'excitation

On fixe une longueur d'onde d'émission correspondant à une longueur d'onde émise par l'échantillon.

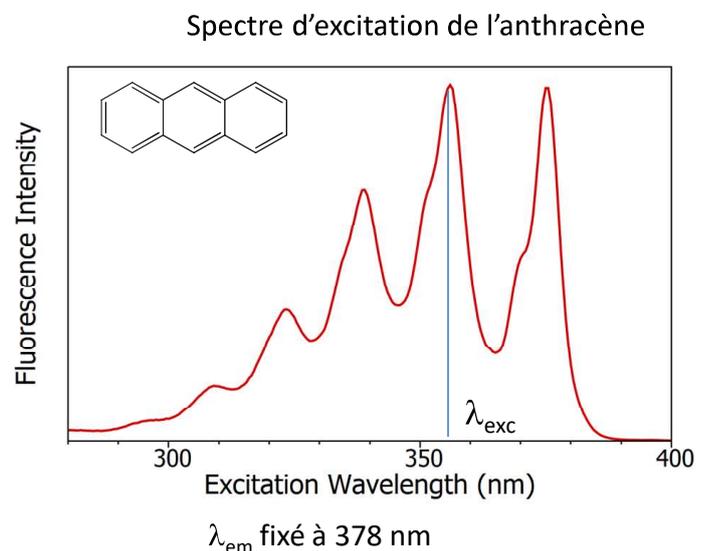
On observe à cette longueur d'onde λ_{em} fixée l'intensité de fluorescence. On fait varier la longueur d'onde d'excitation λ_{exc} → spectre d'excitation

Le spectre d'excitation permet de trouver la longueur d'onde d'excitation optimum.

Pour comparaison :

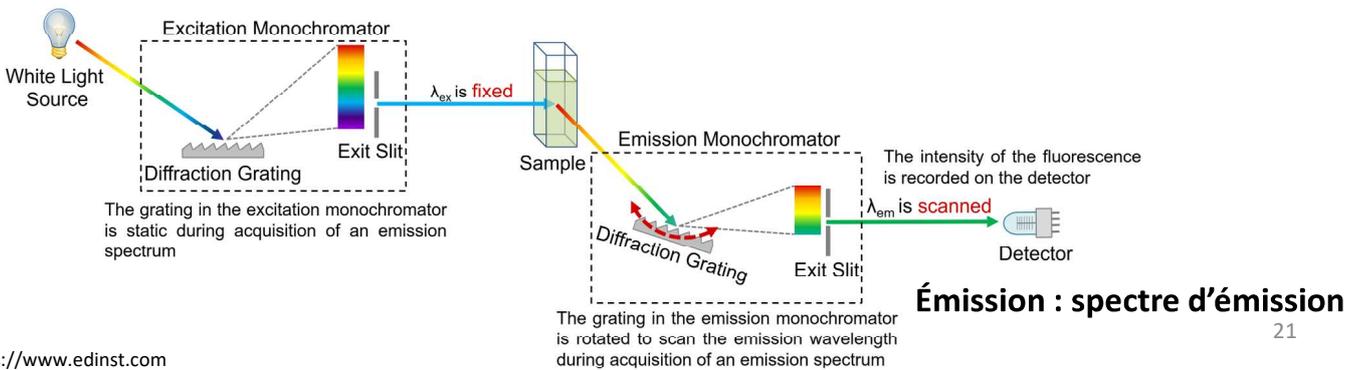
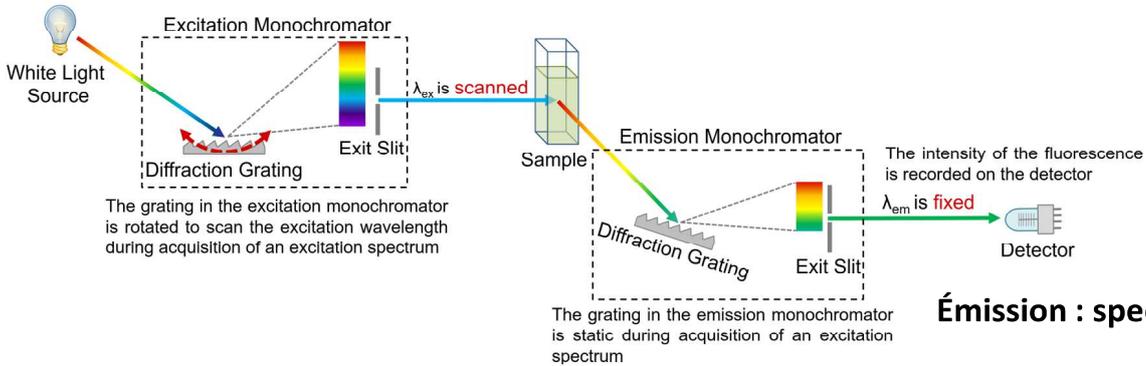
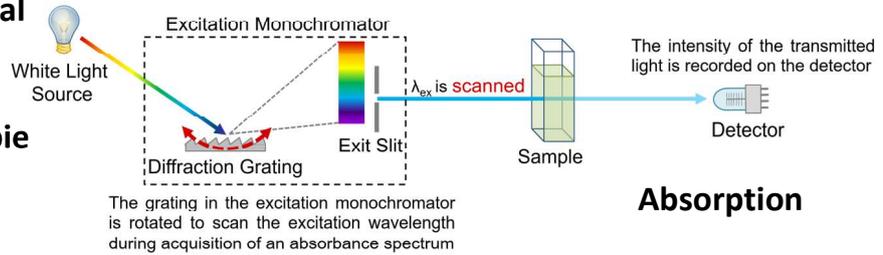


Dans d'autres cas, seules certaines bandes peuvent donner lieu à la fluorescence. Différences possibles avec le spectre d'absorption

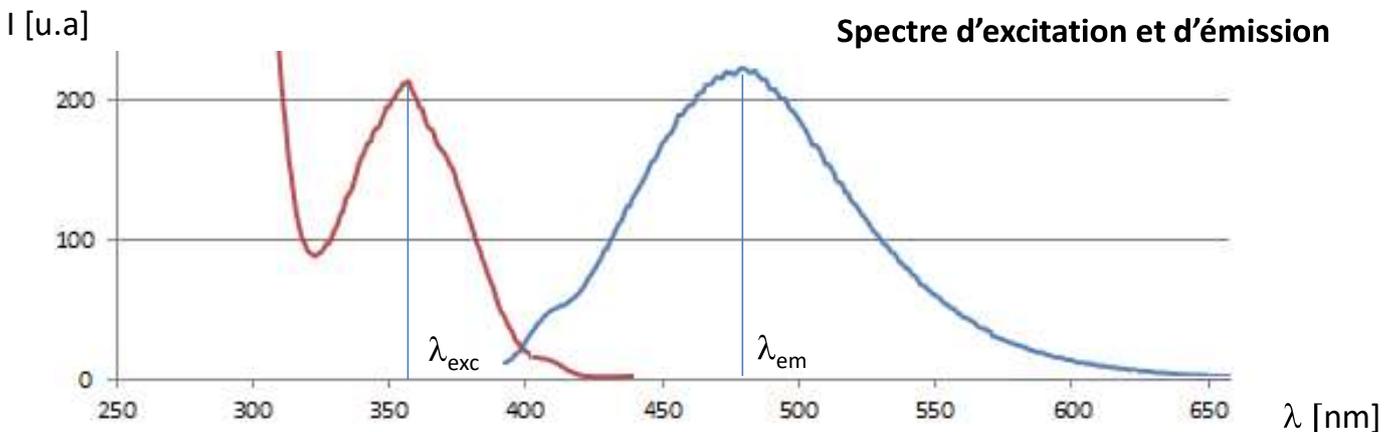


Du point de vue instrumental

Comparaison spectroscopie d'absorption // spectroscopie d'émission



<https://www.edinst.com>



Si l'on rapporte des spectres d'émission et d'excitation enregistrés dans les mêmes conditions sur un même graphique :

- l'intensité maximale en excitation et émission doit être la même car la fluorescence est décrite par un couple $\lambda_{exc}, \lambda_{em}$
- La différence $\lambda_{em} - \lambda_{exc}$ est dite « déplacement de Stokes », elle est rapportée en nm, cm^{-1} ou en unités d'énergie.

Exercice d'application : soient deux composés possédant un déplacement de Stokes de 80 nm. L'un émet à 450 nm, l'autre est excité à 500 nm. Convertir les déplacements de Stokes en unités énergétiques (eV).

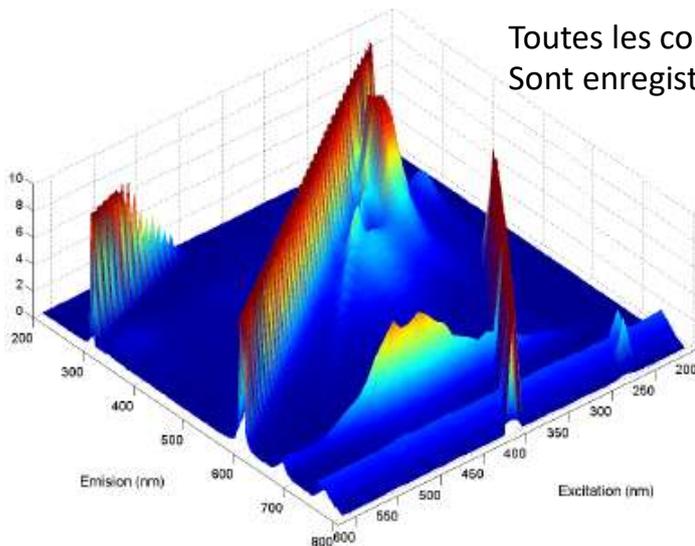
En pratique : trouver le couple λ_{em} , λ_{exc}

Méthode itérative

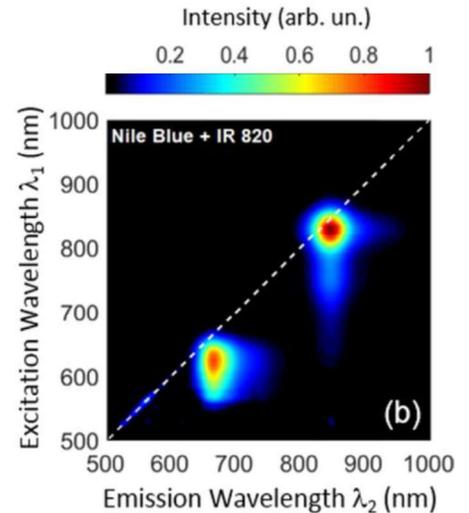
1. Un spectre (excitation ou émission) est d'abord enregistré en fonction observations visuelles disponibles ou de données de la littérature sur des échantillons similaires.
2. Le spectre permet de trouver une des deux longueurs d'onde
3. Le spectre du type différent de celui de 1. est enregistré → la deuxième longueur d'onde est trouvée (et le spectre du même type que 1. est réenregistré pour vérification)

Avantage : rapide ; désavantage : multiples paramétrages par l'opérateur

Méthode EEM (*emission excitation matrix*)



Toutes les combinaisons λ_{em} , λ_{exc} sont enregistrées



Avantage : automatique
Inconvénient : chronophage

23

Intensité de fluorescence : lien avec la nature du composé

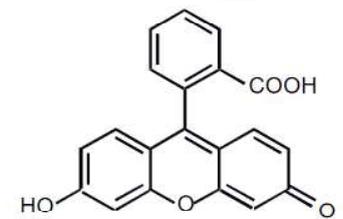
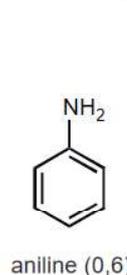
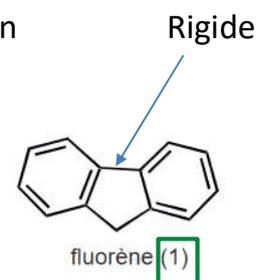
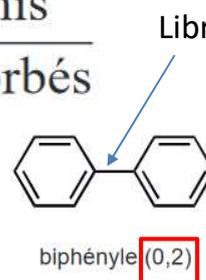
On définit le **rendement quantique** de fluorescence Φ_f

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

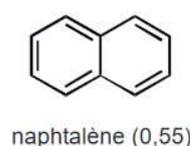
$0 < \Phi_f < 1$ (souvent exprimé en %)

La valeur de Φ_f reflète l'efficacité comparée, à partir de l'état électronique excité (état vibrationnel fondamental) de l'émission spontanée vs. la désexcitation non radiative.

Les composés rigides sont associés à des rendements quantiques plus élevés que des composés flexibles avec un chromophore de nature similaire.



fluorescéine (0,92 dans NaOH 0,1 M et 0,65 à pH = 7)



24

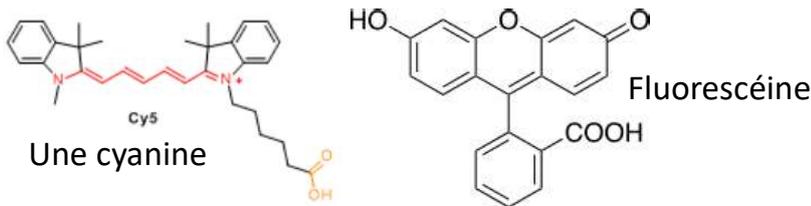
Intensité de fluorescence : lien avec la nature du composé

Le rendement quantique n'est pas suffisant pour prévoir l'intensité de fluorescence observée.

La **brillance** est le produit $\varepsilon \times \Phi$

	ε (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	ϕ	brillance
fluorescéine	80 000	0,9	72 000
Cyanine5.18	250 000	0,35	90 000

<https://www.ptibc-imaging.fr/>



Donc, méfions-nous des impressions visuelles...



On suppose que A et B sont des solutions de même concentration de composés fluorescents ayant la même longueur d'onde d'émission.

A est plus brillant que B, mais on ne peut pas affirmer que $\Phi_A > \Phi_B$

25

Intensité de fluorescence : lien avec la concentration

Dans une solution très diluée :

En posant que $I_a = I_0 - I_t$ (I_t désignant l'intensité de la lumière transmise):

$$I_f = \Phi_f(I_0 - I_t) \quad \text{soit} \quad I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot \left(1 - \frac{I_t}{I_0}\right)$$

Sachant que l'absorbance A est égale à $\log I_0/I$, l'expression devient :

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

Or

$$10^{-A} = 1 - 2,303A + \frac{(2,303A)^2}{2!} - \dots + \dots$$

Si la solution est diluée, le terme A est très petit et le terme 10^{-A} est donc proche de $1 - 2,3A$. L'expression peut être simplifiée et devient :

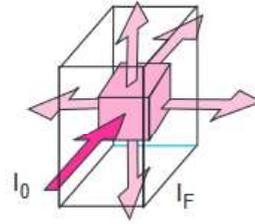
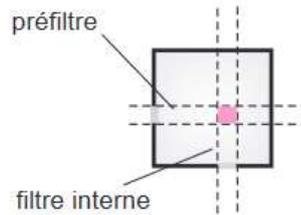
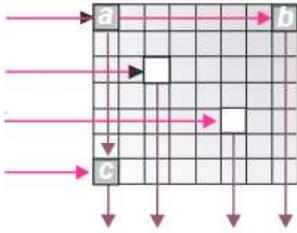
$$I_f = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot A \quad \text{soit} \quad I_f = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot \ell \cdot c$$

Il y a donc une proportionnalité entre la fluorescence et la concentration, uniquement pour des concentrations faibles telles que $A < 0,05$.

26

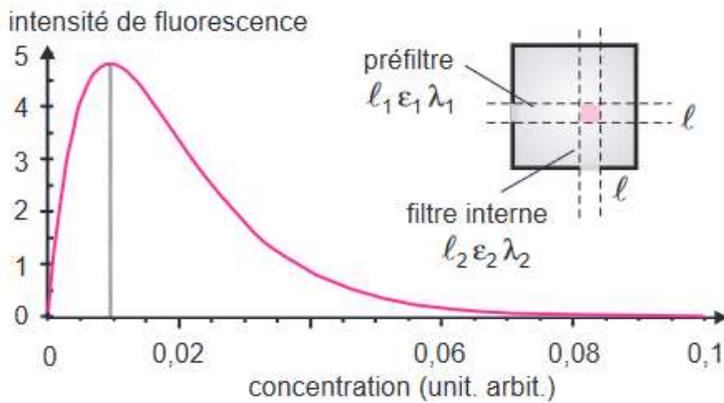
Intensité de fluorescence : lien avec la concentration

Si la solution n'est pas très diluée ($A > 0,05$) :



...suivant le lieu précis dans la cuve, l'intensité reçue n'est pas la même (préfiltre) et l'intensité émise peut être diminuée.

$$I_f = \Phi \cdot I_0 \cdot 10^{-(\epsilon_1 l_1 + \epsilon_2 l_2) c} \cdot (1 - 10^{-\epsilon l c})$$



En raison des effets de filtre, une solution plus concentrée peut donner lieu à une intensité de fluorescence plus faible (y compris visuellement)!

3. Applications de la fluorescence en chimie analytique

En chimie analytique, on s'intéresse à la sensibilité et la sélectivité des techniques.

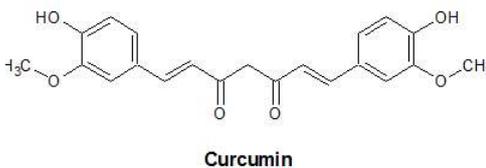
La chimie analytique consiste en l'étude des analytes, particulièrement dans des milieux complexes contenant toutes sortes d'autres espèces.

Sélectivité de la fluorescence :

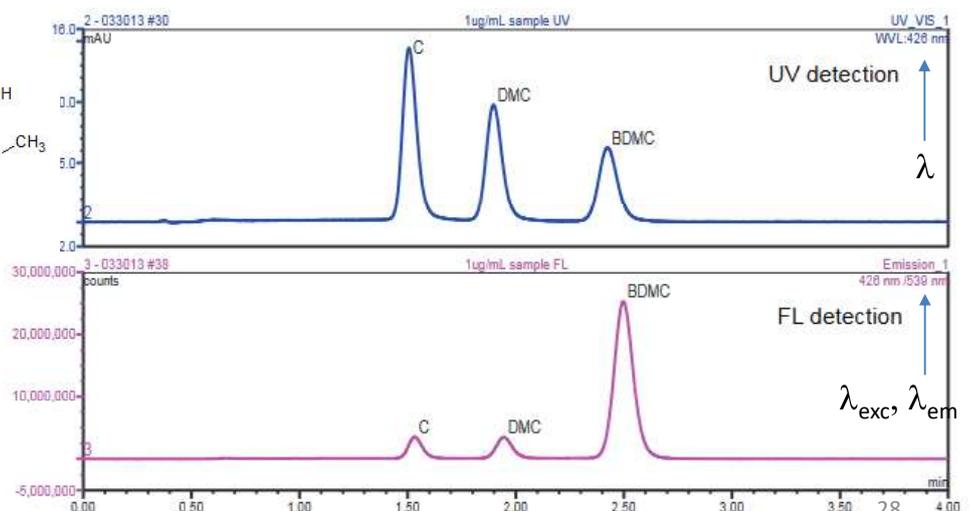
Seuls certains analytes sont fluorescents dans des conditions données (notamment λ_{em}).

Détection sélective par rapport à de analytes non fluorescents.

Fluorimétrie : détection en HPLC



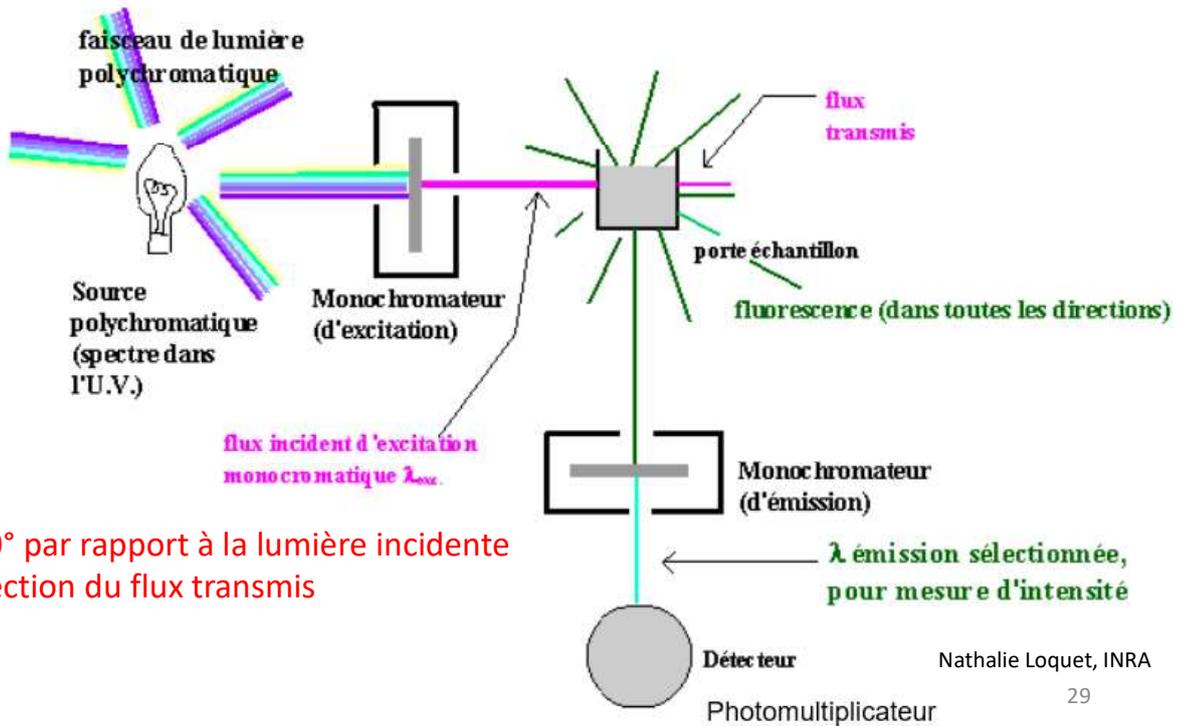
C = Curcumine,
DMC = déméthoxycurcumine
BDMC = bisdiméthoxycurcune



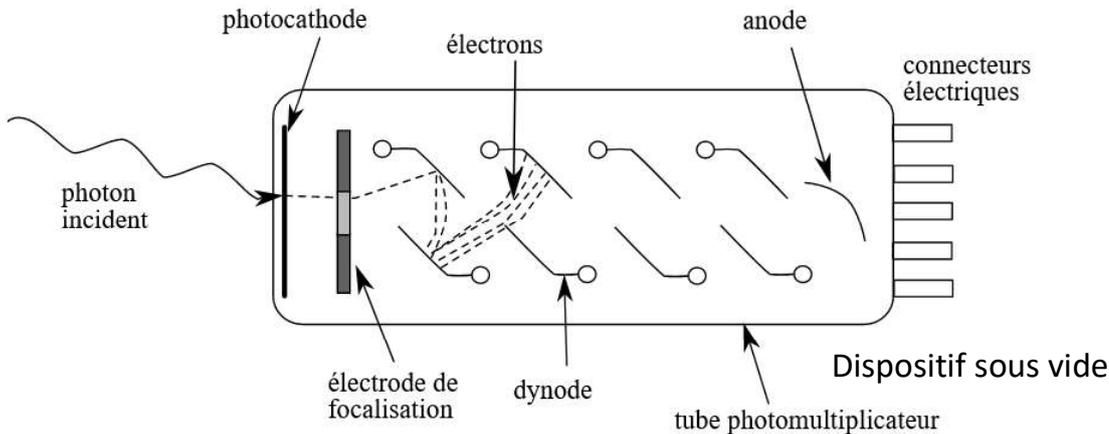
Le problème de l'intensité en spectroscopie de fluorescence.

On a vu précédemment que $I_f = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot \ell \cdot c$

Autrement dit, I_f est proportionnel à la concentration mais seulement si I_0 est fixé



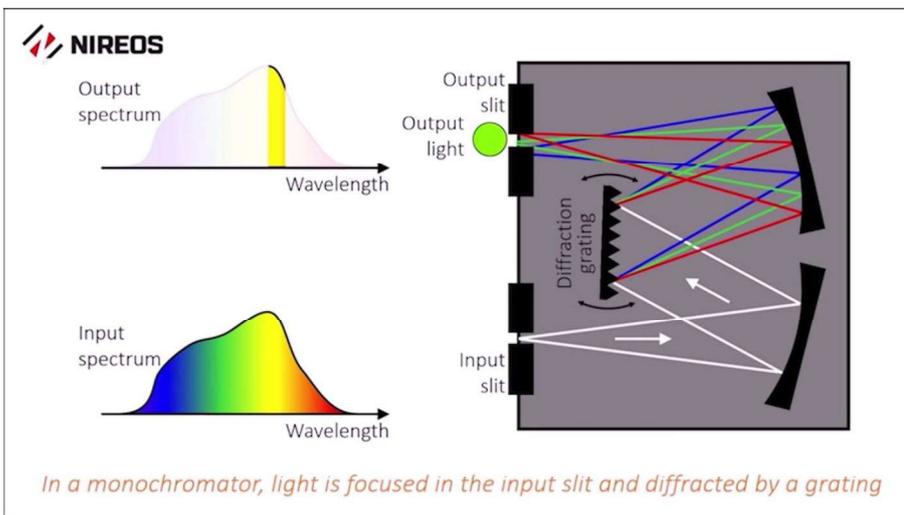
Un exemple de détecteur : tube photomultiplicateur (PM)



Principe : le photon émis par l'échantillon provoque l'émission d'un électron (effet photoélectrique). L'électron est accéléré par la ddp régnant dans le tube puis heurte une première « dynode » (électrode recouverte d'un film favorisant l'émission secondaire) Plusieurs électrons émis par électron incident.

Ainsi de suite sur chaque dynode, jusqu'à l'anode, qui est reliée à un circuit électrique permettant la mesure de l'intensité du courant, proportionnelle à l'intensité de fluorescence. Réglage de la ddp telle que le courant est le plus élevé possible, sans dépasser un maximum instrumental.

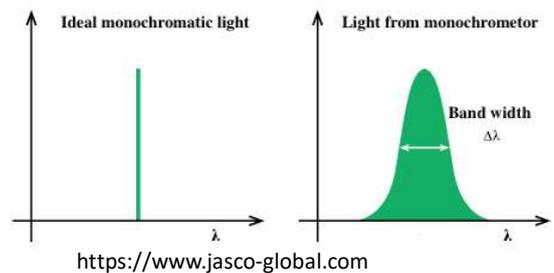
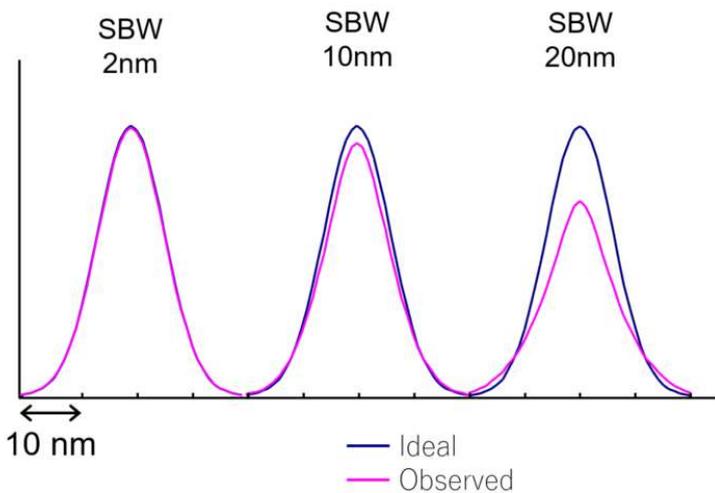
L'intensité du courant mesuré pour une intensité lumineuse donnée dépend de la nature du PM et de la différence de potentiel appliquée au tube



Bandes passantes

Dans le fonctionnement des monochromateurs, l'ouverture « slit » en mm détermine la bande passante « band width » en nm.

Par abus de langage, ouverture/slit est utilisé pour décrire la bande passante (notamment dans les logiciels pilotant les appareils).

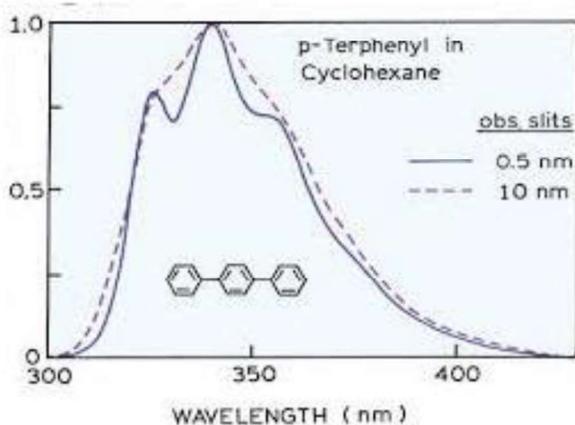


Bandes passantes larges = distorsion du spectre, perte de résolution

Bandes passantes étroites = intensité reçue diminuée

31

Bandes passantes



Avec des bandes passantes plus grandes :

- Plus de lumière parvient au détecteur
- La résolution est réduite.

En spectroscopie de fluorescence, les bandes passantes en excitation et émission sont généralement variables séparément

Pour toutes ces raisons :

- L'intensité de fluorescence est habituellement rapportée en « unités arbitraires »
- Les intensités obtenues avec deux appareils différents ne sont pas comparables
- Les intensités obtenues avec le même appareil ne sont comparables qu'avec les mêmes réglages en termes de bandes passantes et en termes de ddp du photomultiplicateur.

NB : situation très différente de la spectrophotométrie UV-visible : du fait que l'on mesure le rapport de I et de I_0 , l'absorbance est une grandeur comparable quel que soit l'appareil utilisé.

Sensibilité beaucoup plus grande de la spectrofluorimétrie par rapport à la spectrophotométrie UV –visible!

Spectrophotométrie UV-visible : travail à une longueur d’onde unique, mesure de la lumière transmise.

Limitations : si la solution est trop diluée, $A \rightarrow 0$, i.e. $I \approx I_0$ et donc pas de détection.

Inversement, si la solution est trop concentrée $I \rightarrow 0$, donc les mesures au-dessus d’une certaine valeur de A ne sont pas fiables. On ne peut pas régler le PM pour une détection très sensible si I faible, car il doit aussi mesurer I_0 .

Si on considère qu’une mesure d’absorbance est fiable si $A > 0,05$ et que la cuve fait 1 cm on peut aisément montrer que la concentration de la solution doit être supérieure à $5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ si $\epsilon = 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (valeur typique pour un chromophore organique)

Spectrofluorimétrie : la longueur d’onde la lumière incidente (λ_{exc}) ne correspond pas à la longueur d’onde de la lumière détectée (λ_{em}).

Donc, on détecte les photons émis sur un fond parfaitement « noir ».

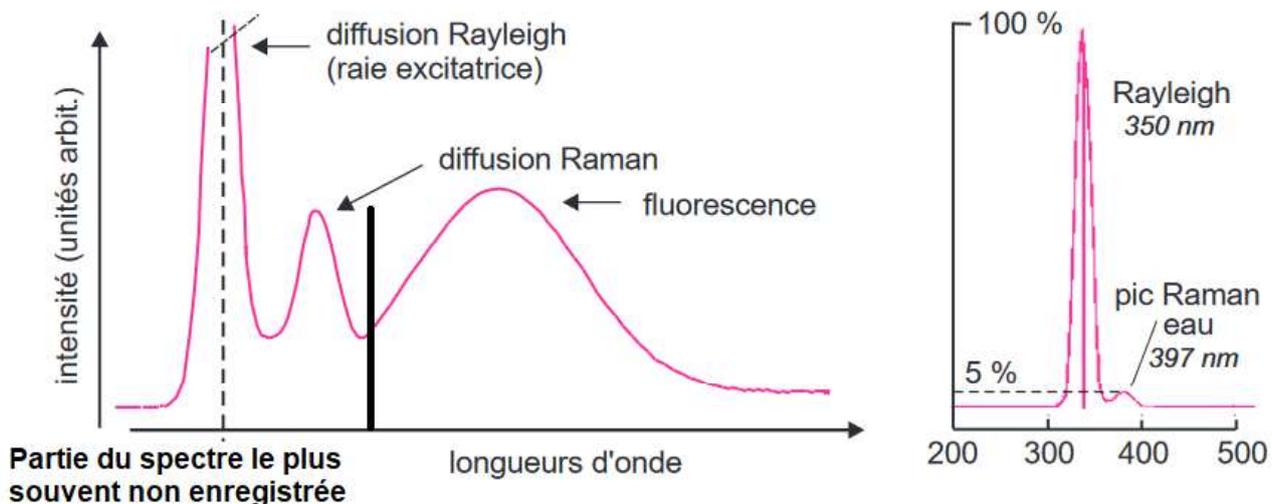
Les tubes PM peuvent détecter un seul photon.

Concentrations de travail plus basses accessibles $\rightarrow 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$.

Au contraire, ce sont les concentrations plus élevées telles que $A > 0,05$ en raison des effets de filtre internes et/ou de préfiltre qu’il faut éviter dans une approche quantitative.

33

Utilisation du signal Raman du solvant comme calibration de la longueur d’onde



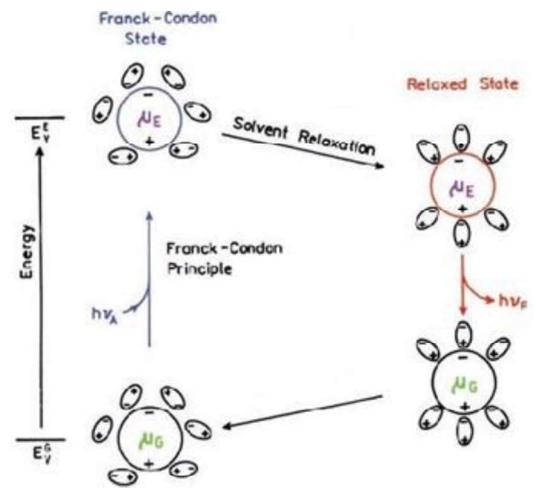
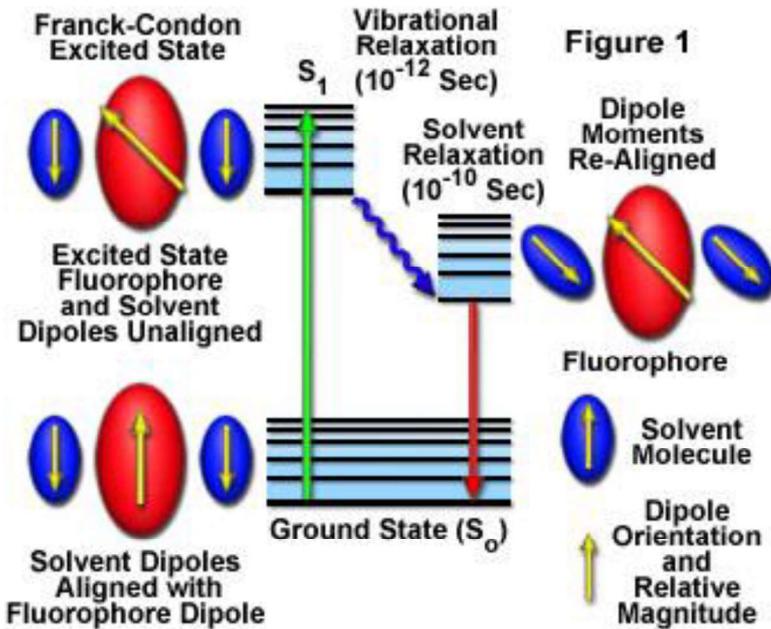
A 90° du faisceau incident, il n’y a pas de lumière transmise mais il y a de la lumière diffusée. Diffusion Rayleigh (même longueur d’onde), diffusion Raman Stokes (longueur d’onde de la lumière incidente + décalage dû aux états vibrationnels du solvant). Le pic Raman de l’eau est souvent utilisé comme calibration des spectrofluorimètres.

Exercice d’application : sachant que le décalage Raman de l’eau est de 3380 cm^{-1} (ν_{O-H}), calculer la longueur d’onde du pic Raman de l’eau si $\lambda_{\text{Rayleigh}} = 300 \text{ nm}$.

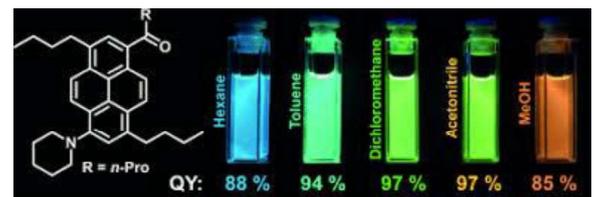
34

Effet du milieu : solvatochromisme

Fluorophore-Solvent Excited State Interactions



Exemple : Effet bathochrome



Effet hypsochrome

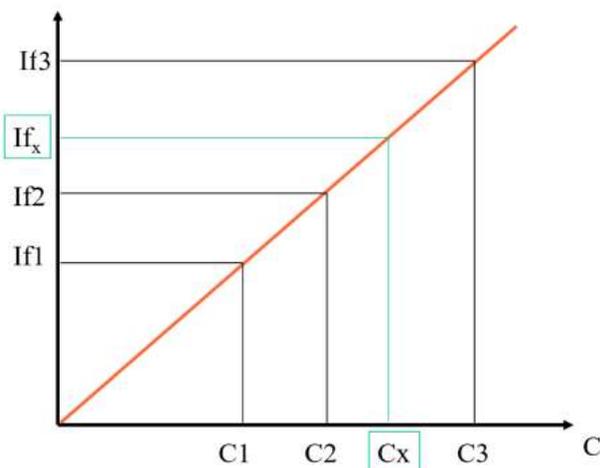
<https://www.olympus-lifescience.com>

Au-delà du cas du solvant, les fluorophores peuvent interagir avec toute espèce présente en solution.

Les mesures de fluorescence, pour être comparables, doivent donc être réalisées dans le même milieu (notamment, pH pour les solutions aqueuses)

35

Droite d'étalonnage



Si l'on dispose d'un échantillon pur du composé de référence et que l'on peut préparer une solution dans des conditions similaires à celles de l'échantillon contenant une concentration inconnue, alors on peut établir une droite d'étalonnage et l'utiliser pour déduire la concentration inconnue.

Valable si :

- La concentration inconnue est encadrée par les concentrations utilisées pour établir la droite
- La réponse du détecteur est linéaire dans la gamme de concentration utilisée ($A < 0,05$).
- Attention : considérer aussi d'autres espèces qui absorbent la lumière incidente.

Exercice d'application :

On considère une solution contenant un analyte fluorescent A tel que (à une longueur d'onde donnée et avec $l = 1$ cm) $\epsilon_A \times l \times c_A = 0,02$ et contenant également un autre composé B tel que $\epsilon_B \times l \times c_B = 1,48$. Le déplacement de Stokes est tel que l'effet de filtre interne peut être négligé. Que vaut l'intensité de fluorescence en présence du deuxième composé B par rapport au cas où l'analyte A est seul (exprimer l'intensité résiduelle en %) ? Raisonner par l'effet de préfiltre sur un analyte localisé au milieu de la cuve ($l_1 = 0,5$ cm).

36

Droite d'étalonnage : exemple : dosage de la quinine dans un tonic

Quinine dans l'acide sulfurique aqueux à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$: $\lambda_{\text{exc}} = 347 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$; $\Phi = 0,52$

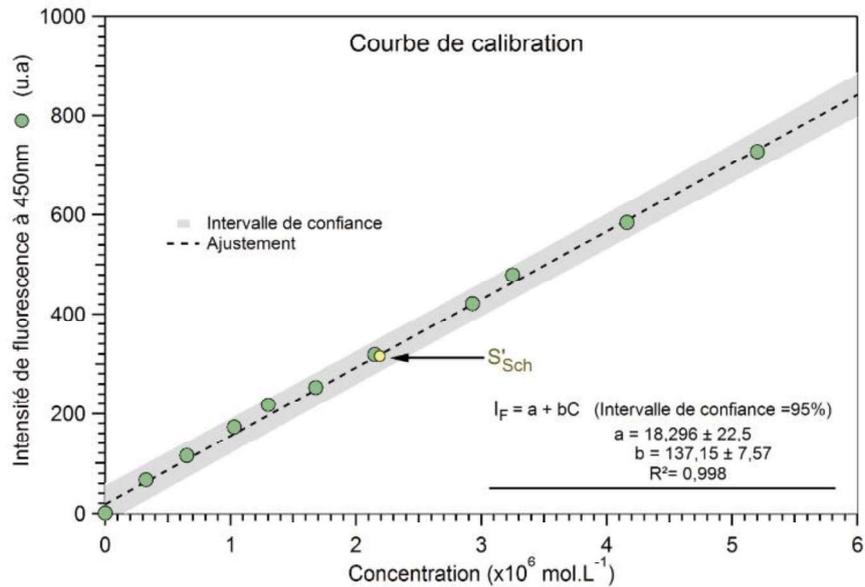
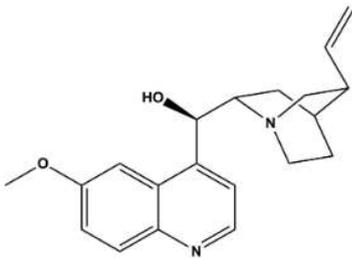
La quinine est traditionnellement présente dans les tonics tels que le Schweppes pour son goût amer (et anciennement parce que l'on souhaitait que ces boissons protègent du paludisme). Il existe des teneurs à ne pas dépasser pour l'usage alimentaire.

Préparation de l'échantillon : dilution au $1/250^{\text{e}}$ du Schweppes dans l'acide sulfurique $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$

Vérification du spectre d'absorption : $A(\lambda_{\text{max}}) \approx 0,05$. $\lambda_{\text{max}} \approx \lambda_{\text{exc}}$

On trouve la concentration de la solution diluée, puis ($\times 100$) celle de la solution concentrée.

Résultat : la quinine est présente à hauteur de 71 mgL^{-1} , ($2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)

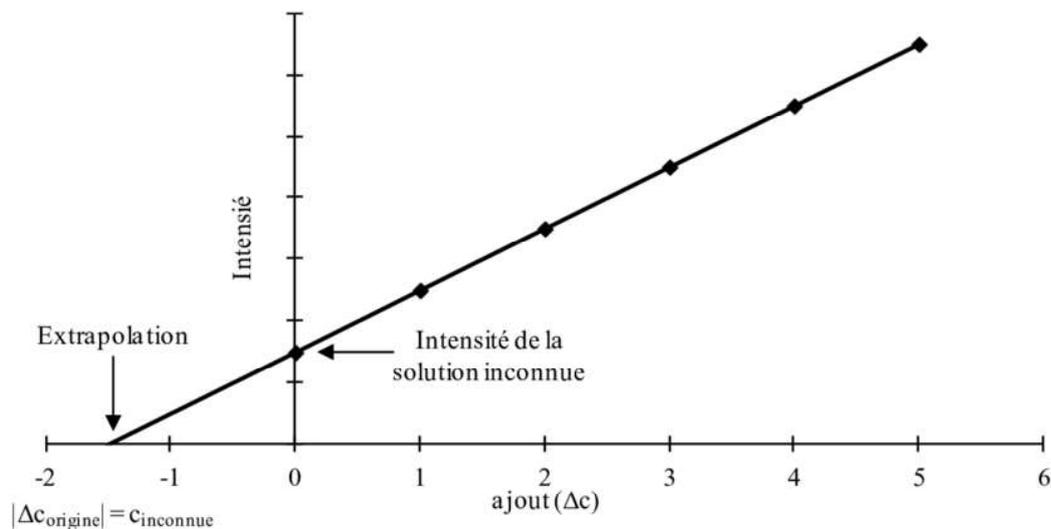


A. ESCALLE-LEWIS, J. PIARD, *Bull. Un. Phys.*, 2012, 944, 599-610

37

Méthode des ajouts dosés

La méthode des ajouts dosés consiste à ajouter des concentrations connues de l'analyte la solution le contenant en concentration inconnue.



Comme toujours, on a (si la solution est diluée). $I_F = k \times c$

L'avantage ici est de réaliser la mesure exclusivement dans les conditions de la solution inconnue et donc de garantir l'invariance du facteur de proportionnalité k pour toutes les mesures (minimisation des effets de matrice).

La méthode ne fonctionne pas si l'analyte voulu n'est pas la seule espèce luminescente pour λ_{exc} , λ_{em} utilisés.

38

4. Etudes de cas à l'interface chimie-biologie

« Autofluorescence » du vivant

Acides aminés aromatiques (Phénylalanine, Tryptophane, Tyrosine).

ADN

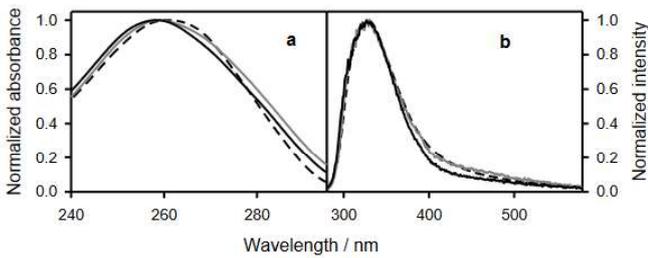
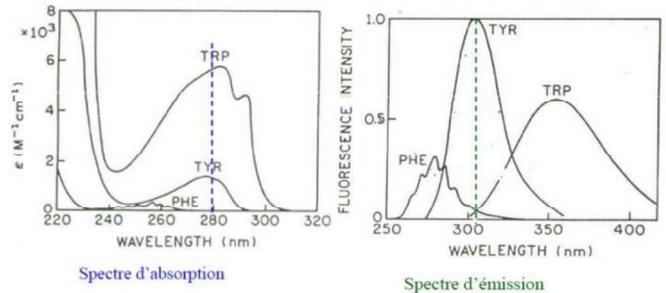
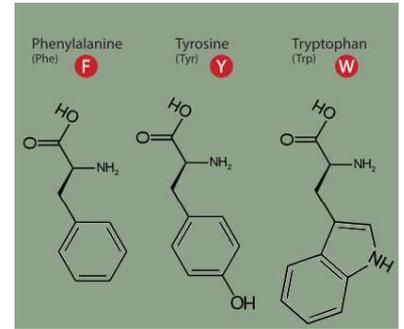
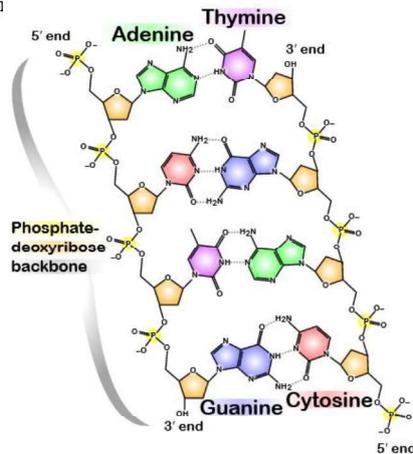


Figure 1. Normalized steady-state absorption (a) and fluorescence (b) spectra of DNA in pure water (grey) and in phosphate buffer (black). Excitation wavelength: 267 nm



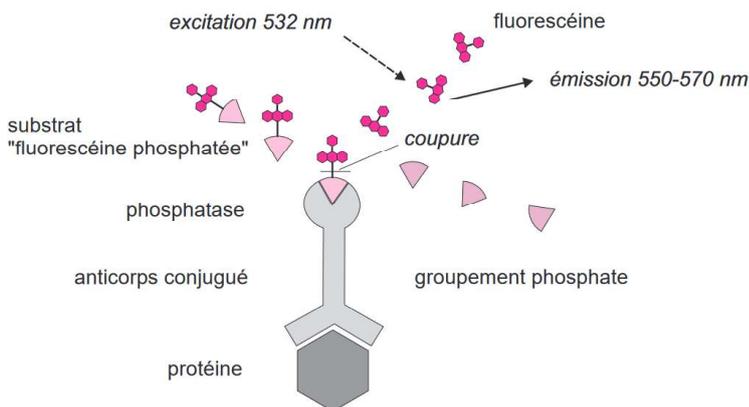
Avantage : possibilité de doser directement des biomolécules par fluorescence.

Inconvénients : l'utilisation de fluorophores pour sonder le vivant est rendue difficile

39

Principes de dosages biochimiques par fluorescence

Technique *in vitro* : interférences réduites avec d'autres composés



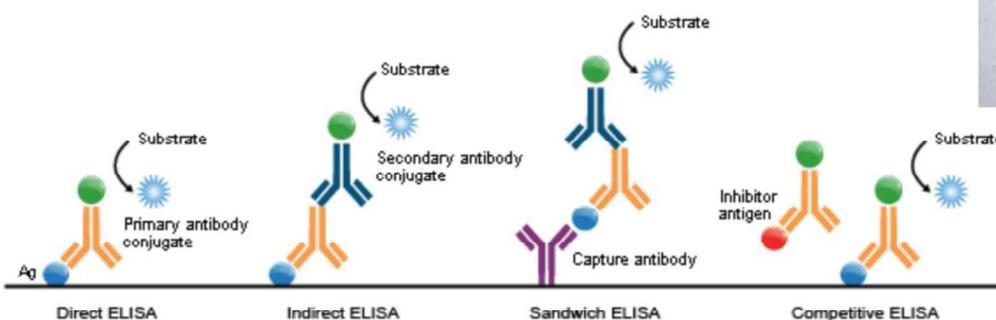
La fluorescéine *phosphatée* n'est pas fluorescente dans les conditions de l'analyse.

La fluorescéine ($\Phi \approx 1$, brillance élevée) permet une détection très sensible de la protéine

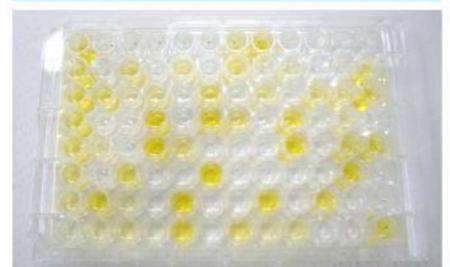


Figure 11.11 Processus d'un dosage de protéine par chimifluorescence en biochimie.

La figure regroupe simplement les réactions mises en jeu sachant que pour réaliser un tel dosage on suit un protocole dans lequel les différentes réactions se font au cours d'étapes distinctes.



ELISA: An example of an assay using a 96-well plate.



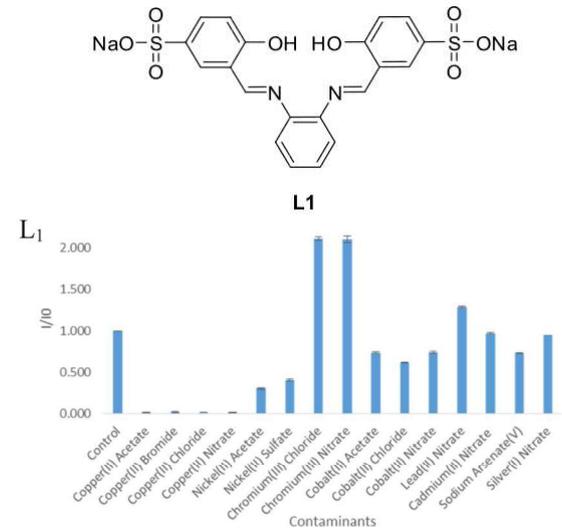
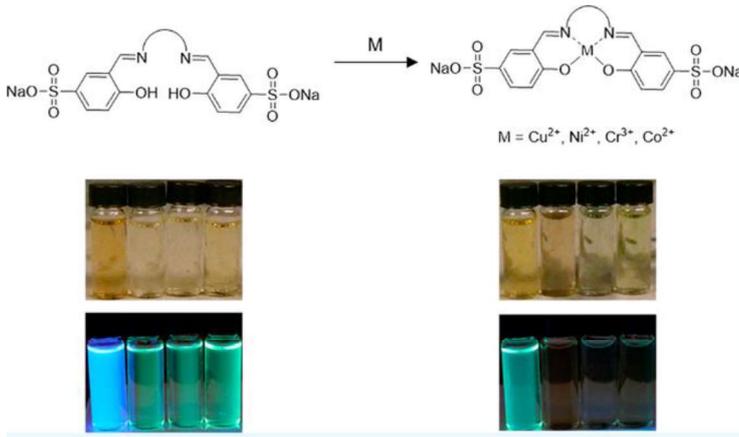
Fluorescence : plus sensible que UV-visible

40

Notion de sonde fluorescente

Des molécules fluorescentes peuvent être utilisées en tant que *sondes* si leur comportement est modifié par la présence d'analytes :

1) détection indirecte d'ions métalliques en solution



Les ions métalliques interagissent avec le fluorophore.

Processus photophysiques modifiés (augmentation ou diminution de la fluorescence) + rigidité augmentée (augmentation).

Dans cet exemple : détection sélective de Cu^{2+} par diminution du signal et de Cr^{3+} par augmentation du signal

41

Jefferies et al., ACS Omega, 2019

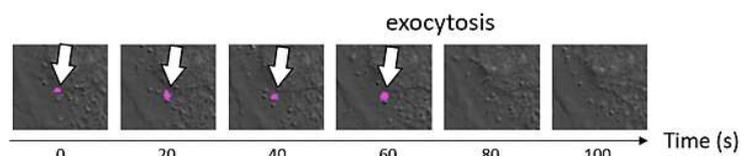
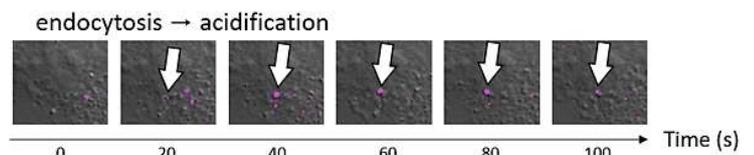
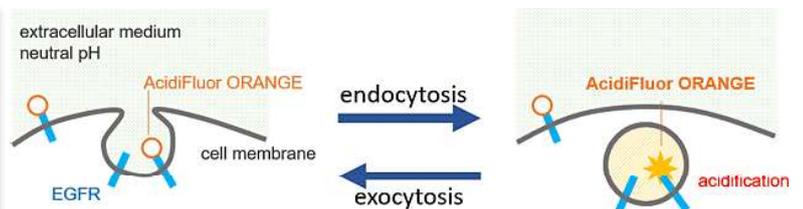
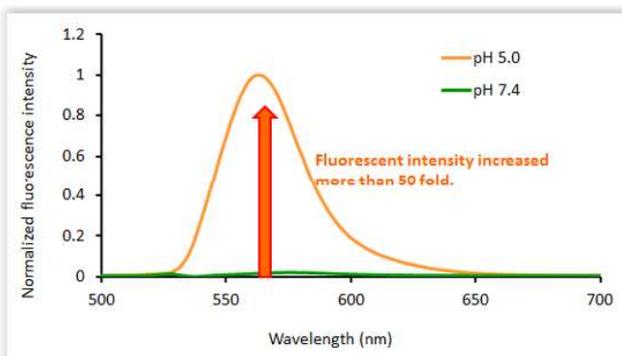
Notion de sonde fluorescente

2) Mesure fluorimétrique du pH

Comme en UV-visible, si le système conjugué contient une fonction protonable (ex. amine) ou déprotonable (exemple : acide carboxylique), les propriétés d'absorption et émission seront modifiées en fonction du pH du milieu.

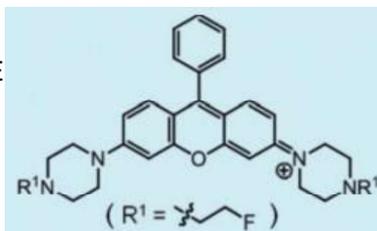
→ possibilité d'utiliser la fluorescence pour estimer le pH

→ visualisation des conditions acides ou basiques directement sur des cellules vivantes.



Acidifluor ORANGE

www.tebu-bio.com

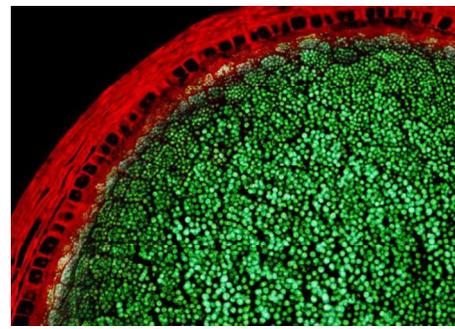


Suivi d'événements cellulaires en direct in vitro

42

Imagerie biologique

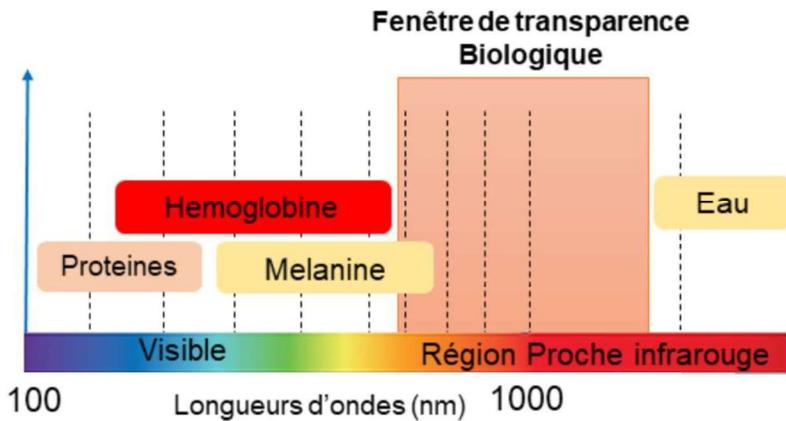
Autofluorescence parfois utilisable directement
Exemple : graine de maïs sous lumière UV/violette
La chlorophylle est fluorescente.



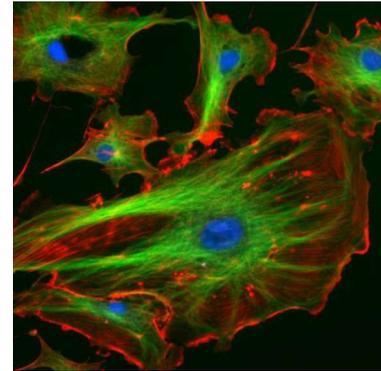
<https://www.microscopyu.com>

Fluorophores lié de façon covalente à des anticorps → reconnaissance de cibles moléculaires ou cellulaires. Visualisation grâce à la fluorescence

Limitation : transparence limitée *sauf rouge et PIR*.



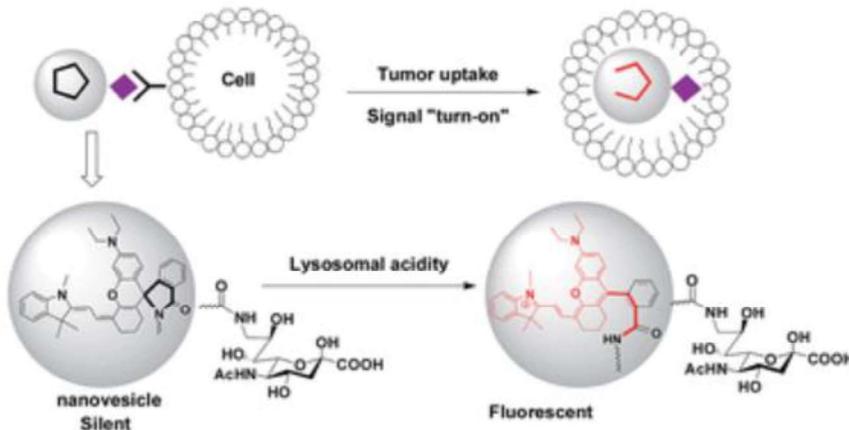
Souvent limité aux cultures cellulaires.



Cellules marquées avec 3 composés fluorescents différents : noyau, microtubules, actine.

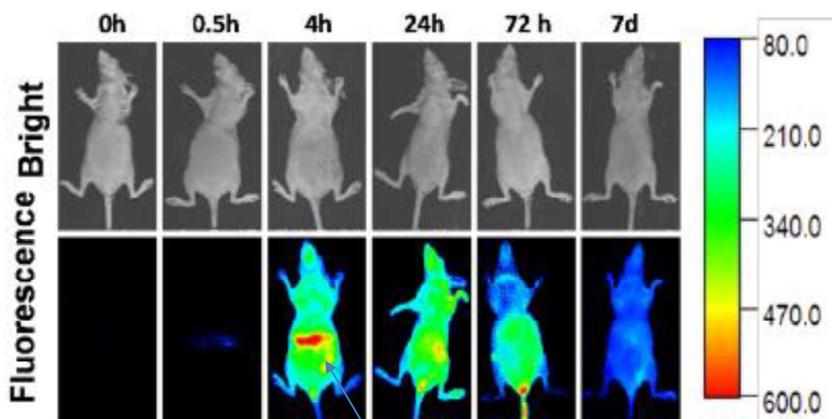
Amaury Guillou, Thèse de l'Université de Brest

Imagerie biologique *in vivo*



Utilisation de cyanines absorbant dans le rouge et émettant dans le proche IR. (transparence maximale du vivant).

La molécule initiale, non fluorescente, est protégée dans une nanovésicule (micelle).



La vésicule porte des unités acide sialique qui sont reconnues par des récepteurs cellulaires.

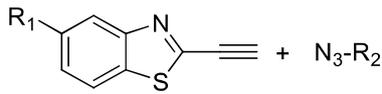
Une fois internalisée dans les lysosomes, réaction libérant la forme émissive de la molécule.

Wu *et al.* Chem. Sci. 2015

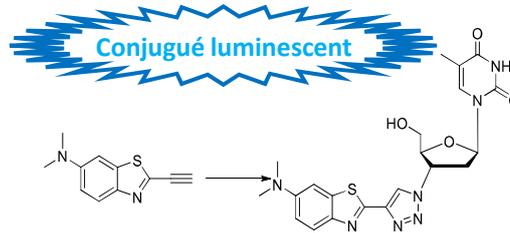
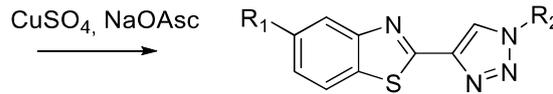
Visualisation d'organes ayant des récepteurs de l'acide sialique (dont tumeurs)

Molécules "fluorogéniques" pour des expériences biologiques

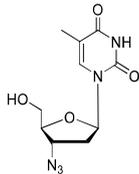
*Click chemistry :
réaction totale,
rapide, très
sélective,
indépendante du
milieu*



Benzothiazole proluminescent



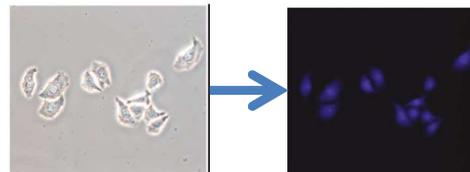
Dérivé de l'AZT



(AZT, Anti VIH)

λ_{abs} : 332nm, λ_{em} : 491 nm

- 1- incuber l'AZT et la sont dans des cellules
- 2- Ajouter $CuSO_4$ + réducteur
- 3- Visualisation de l'incorporation dans l'ADN

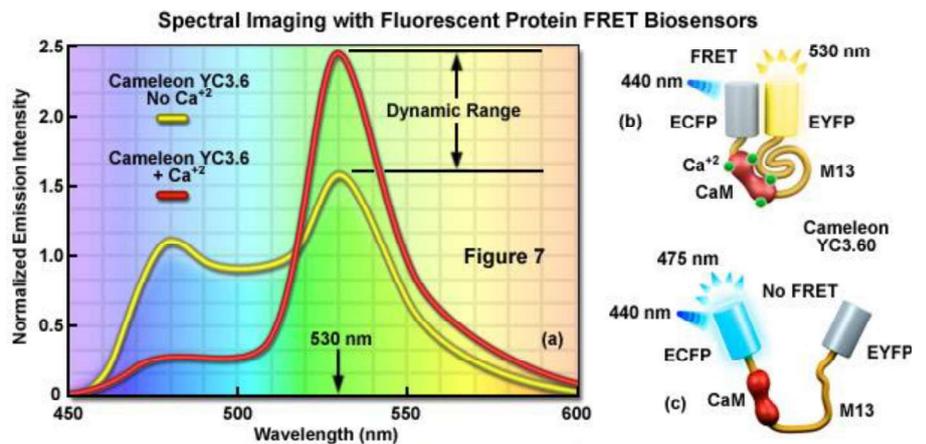
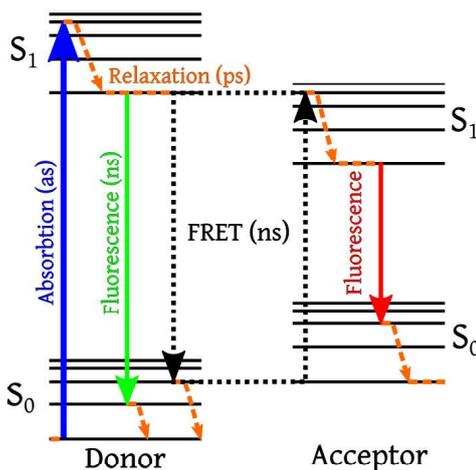


Sous irradiation UV

*Pour comprendre la chimie :
Cf. cours de master*

Tung et al., Bioconjug. Chem., 2011 45

FRET Förster resonance energy transfer. Processus photophysique complexe. **Transfert d'énergie** entre l'état excité d'une molécule A donneuse à l'état excité (moins énergétique) d'une molécule B accepteuse. Très sensible à la distance entre les molécules (terme en $1/r^6$).



La détection du calcium dans les cellules dérive d'une liaison à la calmoduline donnant un changement de structure tertiaire qui rapproche le donneur de l'accepteur. Détection directe ou « ratiométrique » (480 vs. 530 nm).

