

Les principes de la spectroscopie de fluorescence : de la théorie à la pratique

Nathalie Locquet , INRA

UMR, INRA-AgroParisTech , Ingénierie Procédés Aliments, équipe
IAQA (Ingénierie Analytique pour la Qualité des Aliments),
16 rue Claude Bernard 75005 Paris
e-mail : locquet@agroparistech.fr

 **AgroParisTech**

 **INRA**
SCIENCE & IMPACT

le cnam



1. Introduction
2. Rapide historique
3. Qu'est-ce que la fluorescence ?
4. Quelques applications
5. Conclusion



Du fait de sa grande sensibilité , l'utilisation de la fluorescence s'est accrue de façon exponentielle ces dernières années en particulier en biologie.

Ses applications sont nombreuses aussi bien comme

- détection directe d'espèces intrinsèquement fluorescentes que
- détection et dosage à l'aide de sondes fluorescentes (sondes à ADN, molécules neutres, ions, cytofluorimétrie, contrôle sang , urine...), exploration de la matière telle que l'information sur polarité, viscosité, pH que
- d'autres applications pratiques telles que capteurs optiques, chimiques, biocapteurs, marquage des billets de banque, lasers à colorants, peintures anti-collision (des avions) ...

Les applications en chimie analytique concernent surtout les domaines où il est intéressant d'avoir une empreinte pour comprendre un phénomène ou un processus (chauffage....) tels que les aliments comme des huiles végétales par exemple.

En effet, la fluorescence est prometteuse pour définir des marqueurs de la qualité nutritionnelle des aliments.

En 1565, *Monardes* observe une lumière bleuâtre à la surface de décoction de copeaux de bois

Première observation de la fluorescence en 1845 par Sir John F.W. *Herschel* avec une solution de quinine et la lumière du soleil . La quinine émet de la lumière bleue à une longueur d'onde de 450 nm ➡ Développement du premier spectrofluorimètre.

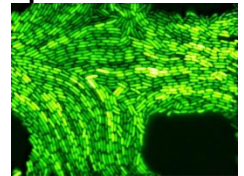
C'est G.G. *Stokes* qui donna pour la première fois le nom de fluorescence à ce phénomène (1853).

Puis découverte d'autres fluorophores (fluorescéine (1871), Rhodamine...).

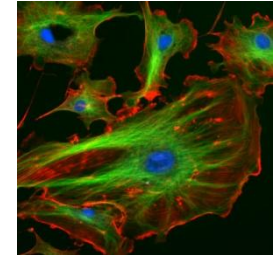
C'est *Jablonski* qui développa la fluorescence vers les années 1920-30. Il est considéré comme le père de la fluorescence.

Rappelons- nous aussi la découverte fantastique de *O. Shimomura*, en 1962, qui a isolé une protéine GFP (Green Fluorescent Protein) chez une méduse *Aequorea victoria*. (prix nobel de la chimie en 2008)

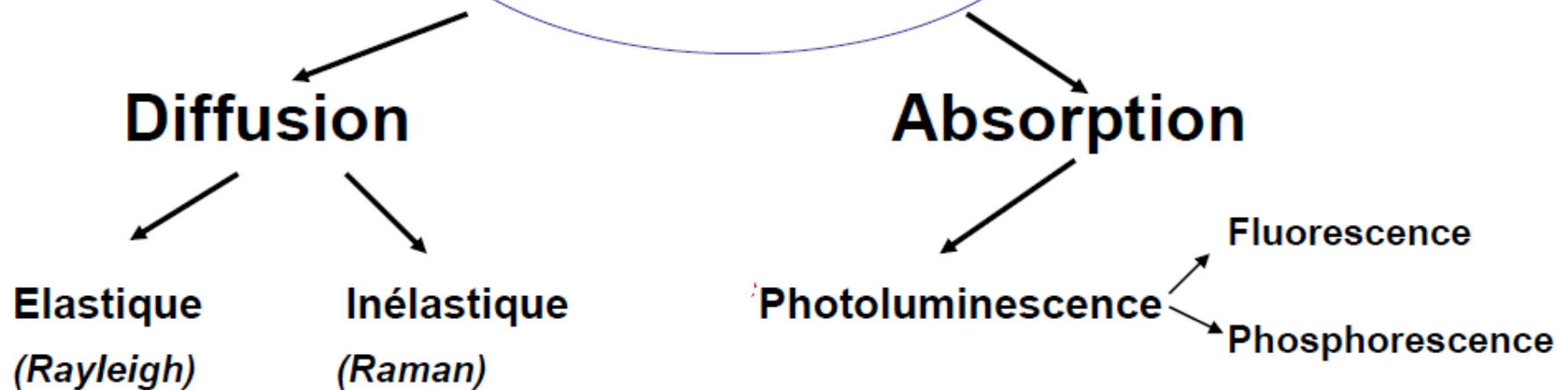
Cette protéine émet de la lumière verte quand elle est éclairée par lumière UV ! (après transfert d'énergie). Elle peut être couplée à d'autres protéines comme marqueur , très utilisé en biologie. (*Martin Chalfie*)



Qu'est –ce que la fluorescence ?



Interactions lumière-matière

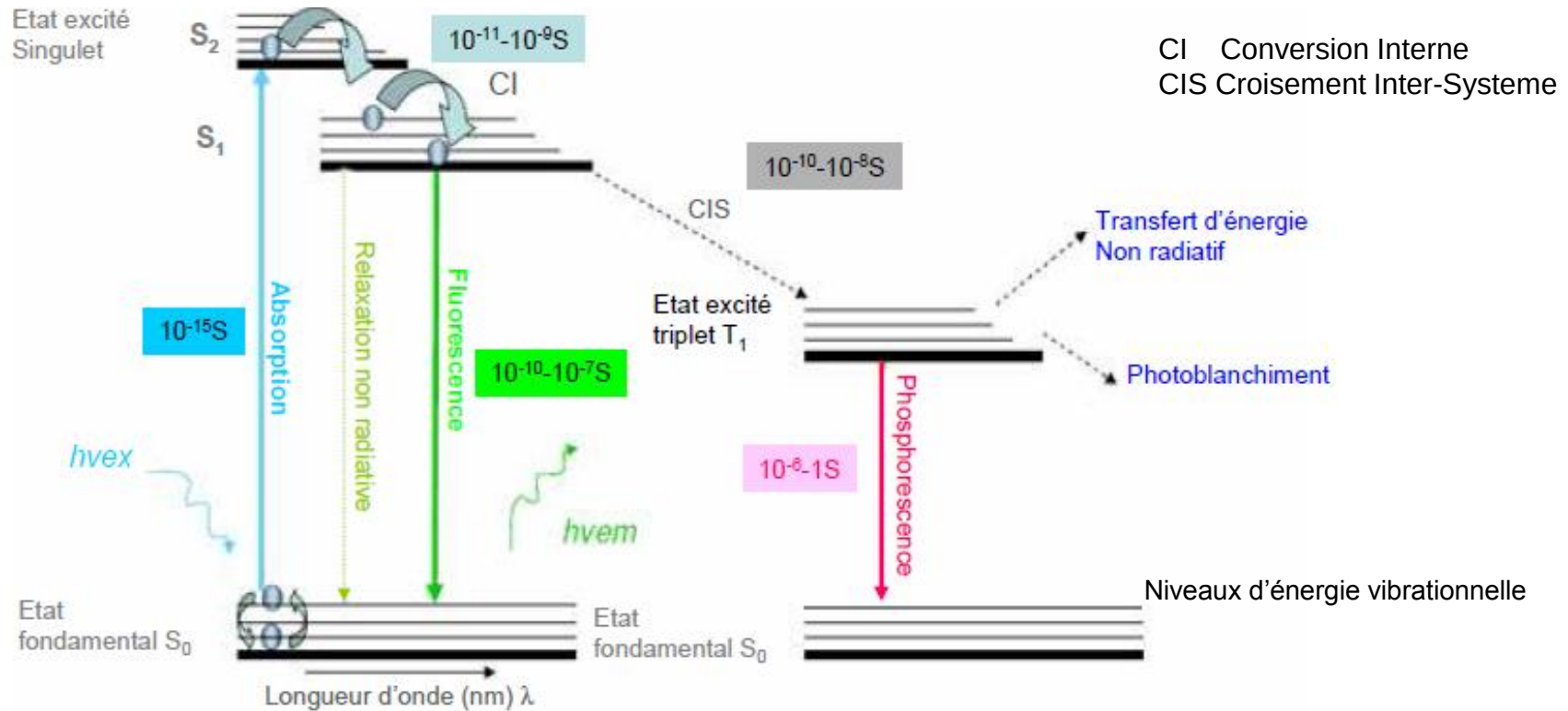


La fluorescence et la phosphorescence proviennent de l'absorption des photons.

Définition

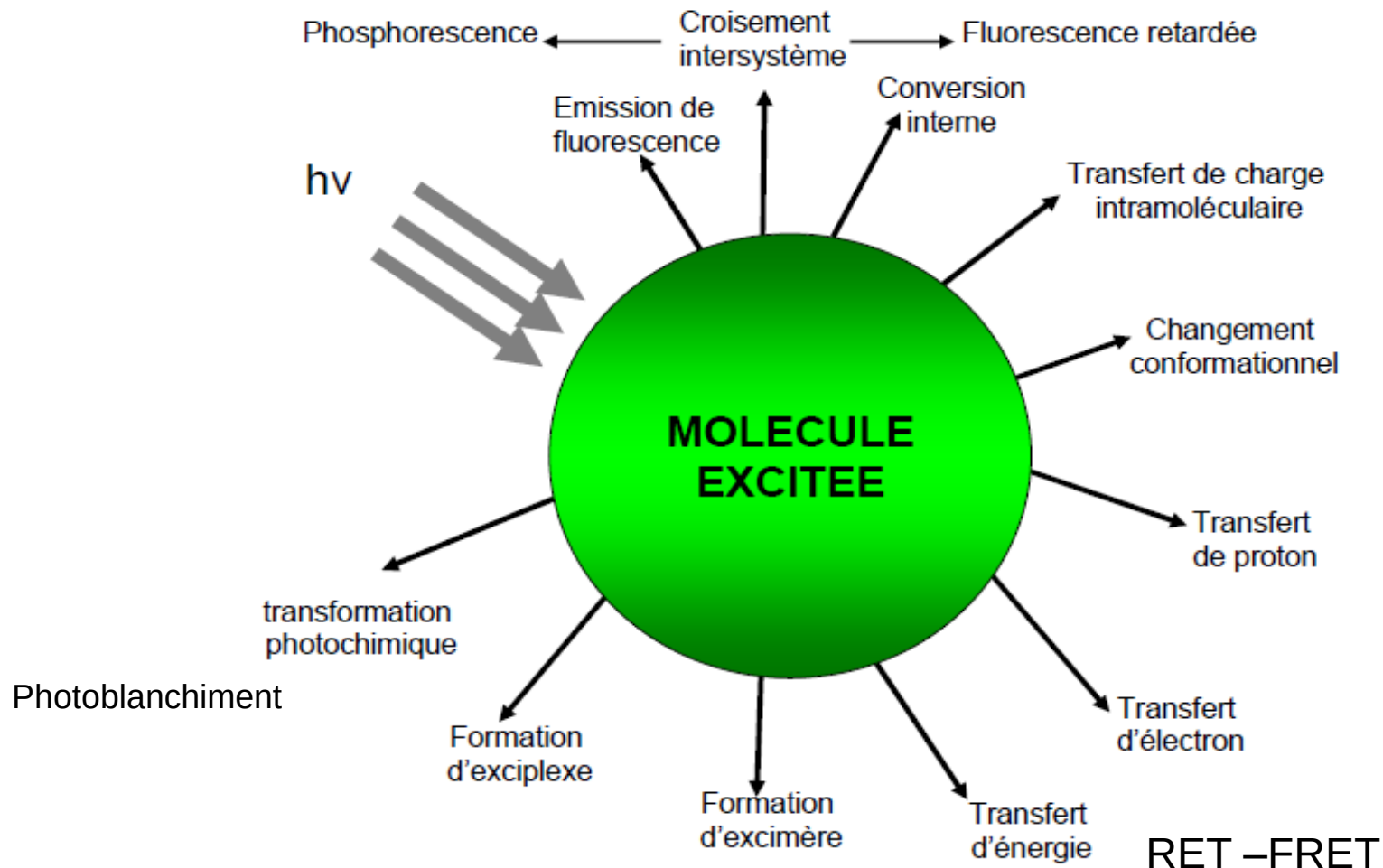
La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par diverses formes d'excitation autres que la chaleur. (on parle parfois de " lumière froide "). Elle peut servir à caractériser un matériau.

Diagramme de Jablonski



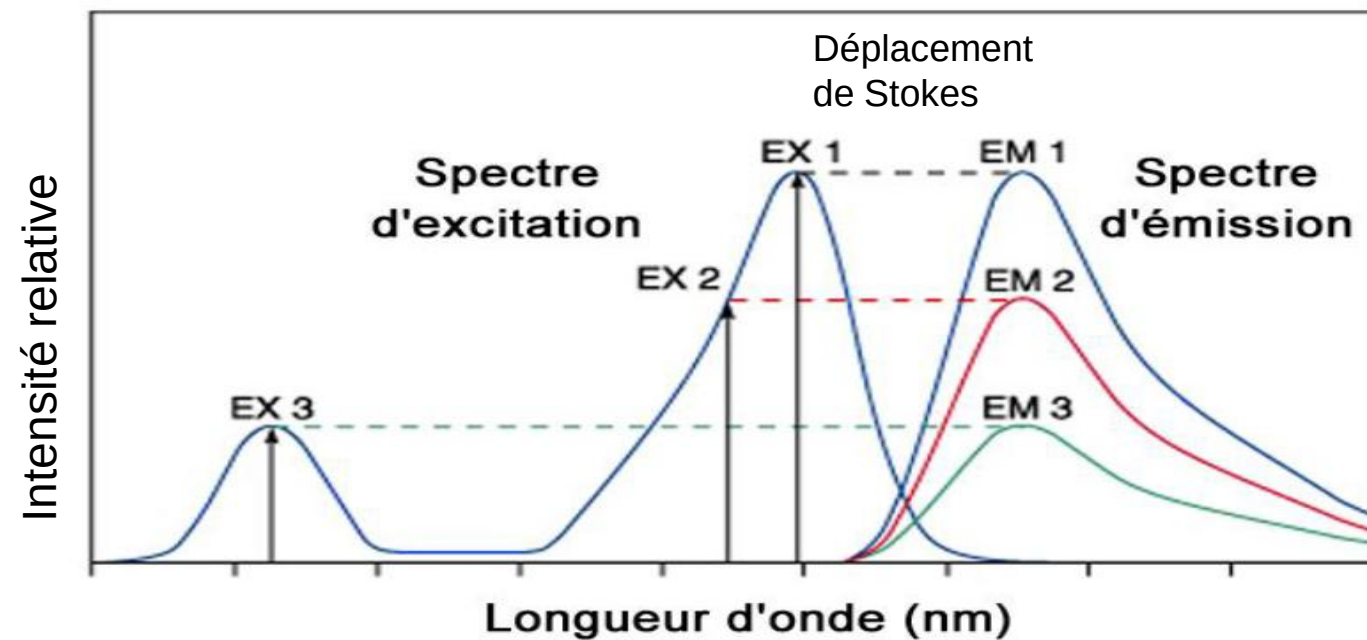
Une molécule fluorescente (fluorophore) peut absorber l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et la restituer sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission).

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



Divers processus suivant l'excitation d'une molécule

(d'après B. Valeur 2004)



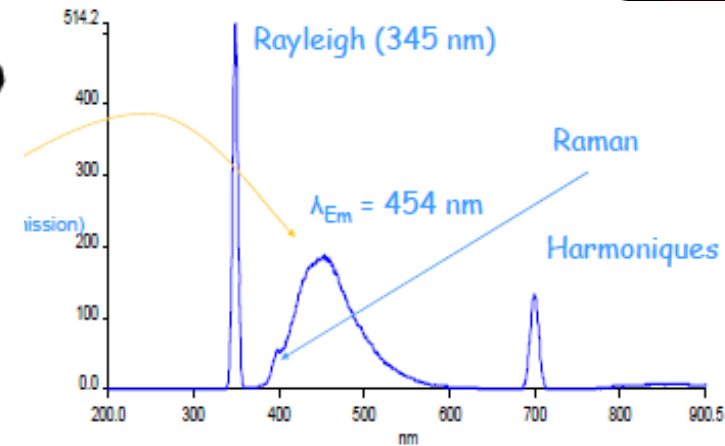
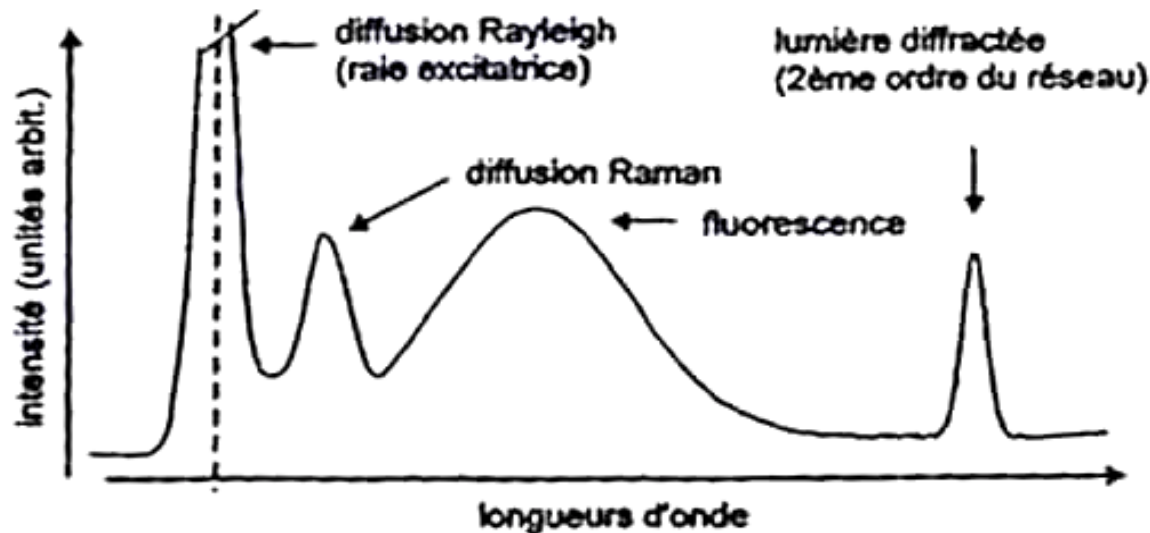
Comparaison de spectres d'émission et d'excitation

Longueurs d'onde : celles qui correspondent aux pics des spectres d'excitation et d'émission

Le spectre d'excitation

Le spectre d'émission (fluorescence ou phosphorescence),

La différence entre le maximum d'excitation et d'émission est appelée le déplacement de Stokes (et est à la base de la spectroscopie Raman)



Spectre d'émission de la quinine dans H₂SO₄ à 345 nm

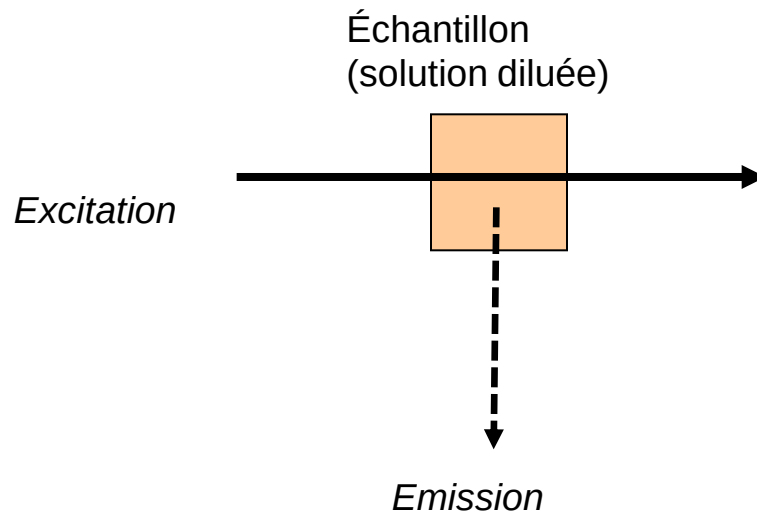
Diffusion Rayleigh :

Collision élastique entre le photon et les électrons de la molécule. Photons diffusés à la même longueur d'onde que la longueur d'onde d'excitation. Elle n'induit pas de perte d'énergie.

Diffusion Raman : Une partie de l'énergie est absorbée par la molécule qui est convertie en mouvements vibrationnels et rotationnels. C'est une collision non élastique. Observation d'une émission à des longueurs d'onde supérieures à celles à d'excitation. (moindre énergie) (100 à 1000 fois plus faible que la diffusion Rayleigh)

Schéma comparatif

Fluorescence à angle droit
Fluorescence classique

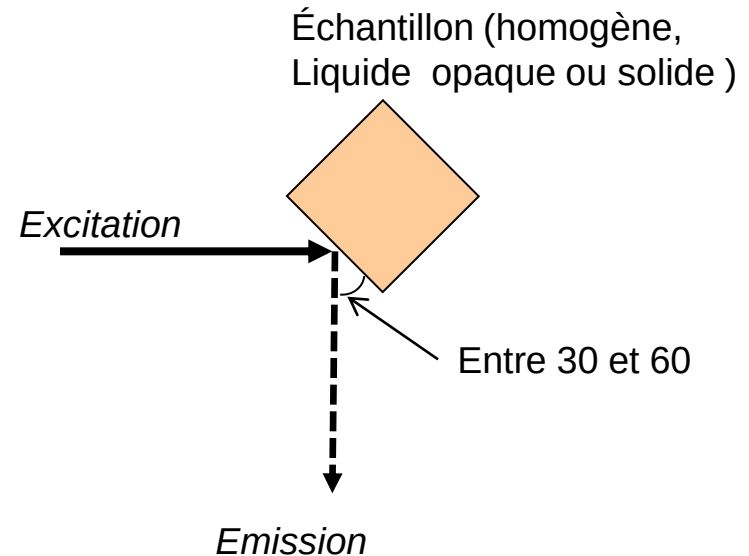


Étude des systèmes dilués et limpides.

Application de la loi de Beer-Lambert

Nécessité que $A \leq 0,05$

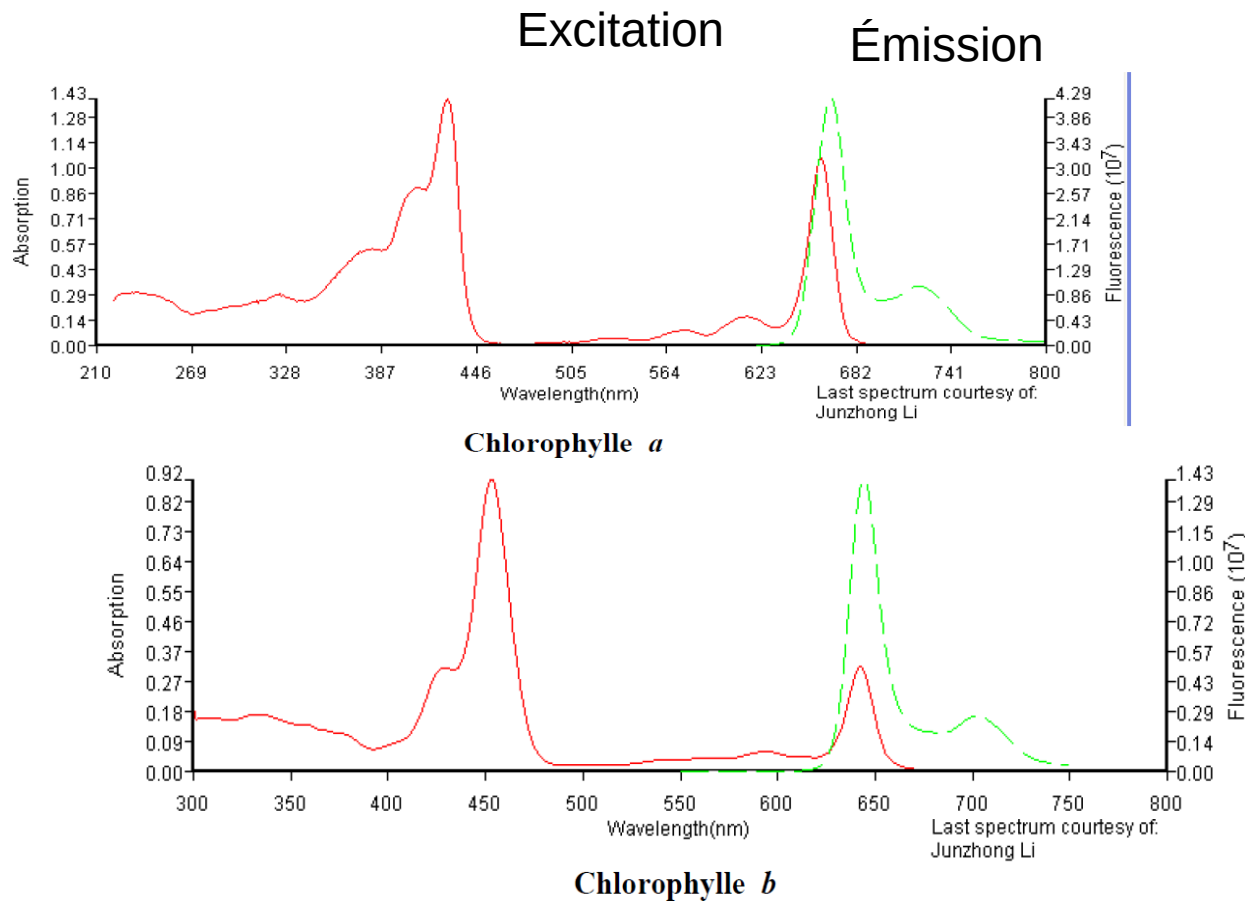
Fluorescence à angle incliné
Fluorescence frontale



Technique rapide, sensible, non invasive ou non destructive.

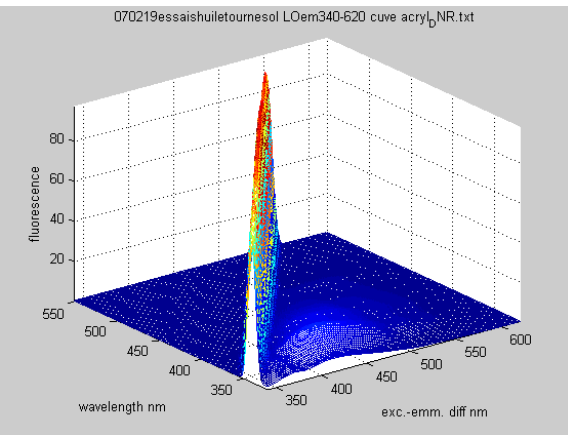
ne nécessite aucune préparation d'échantillon

S'assurer de son **homogénéité**.

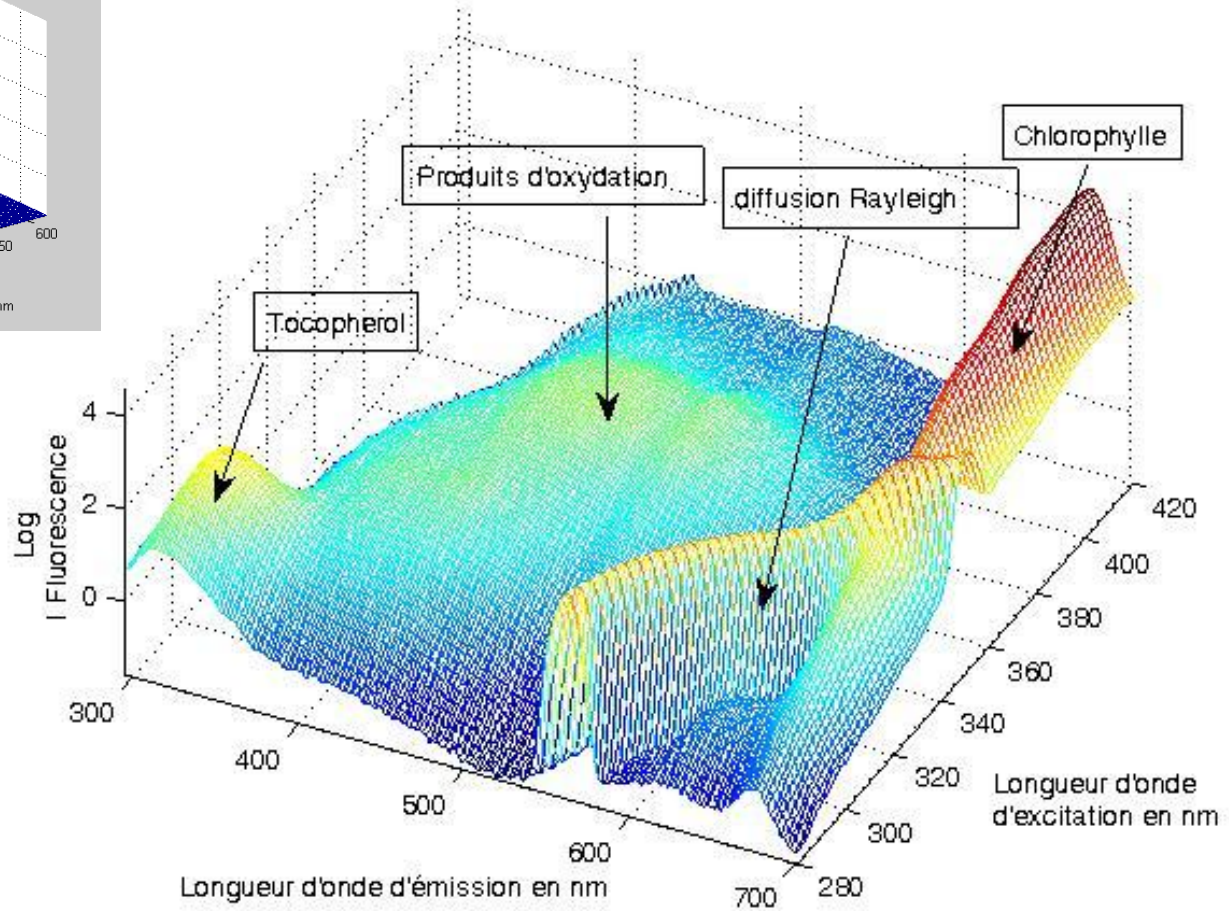


Spectres de la chlorophylle a et b

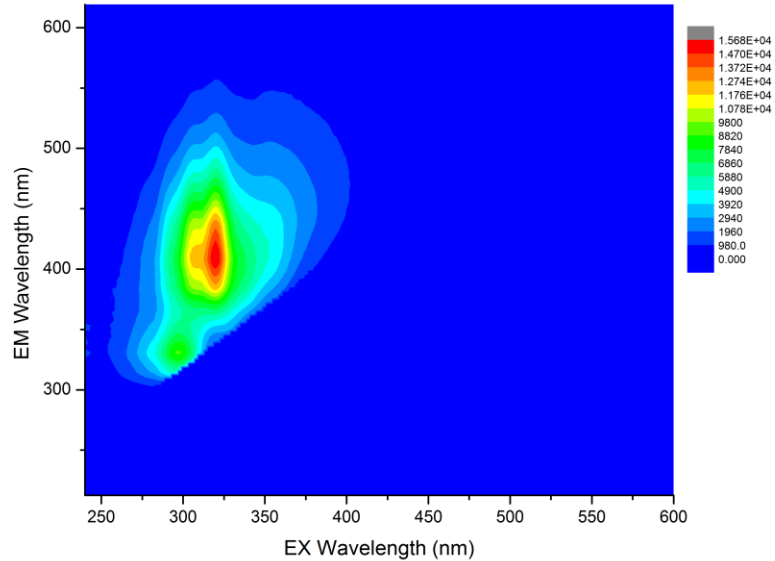
Excitation (—) et Emission (---)



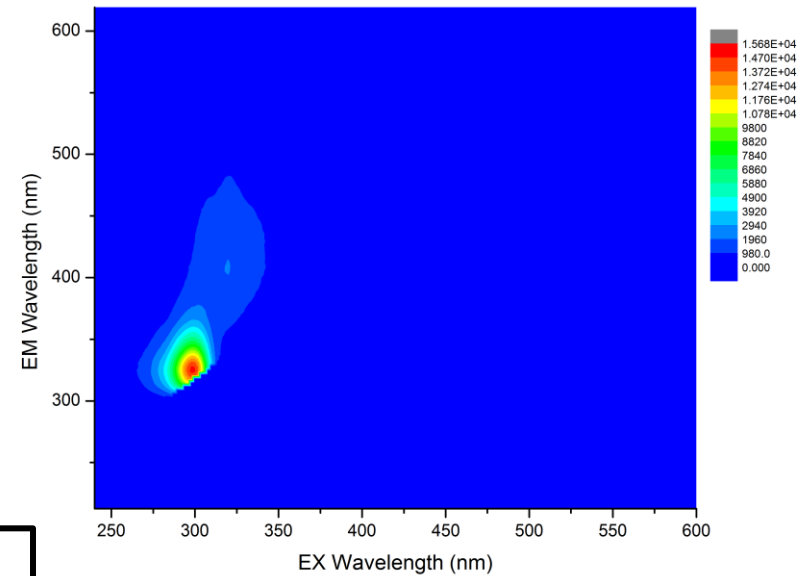
Spectre 3D de fluorescence frontale de l'huile d'olive froide



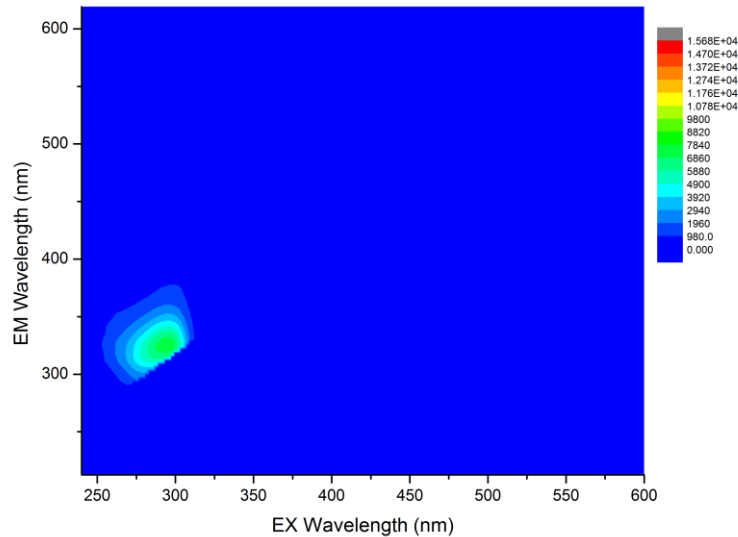
Huile de Colza Lesieur



Huile de Tournesol Lesieur



Huile d'Olive tunisienne



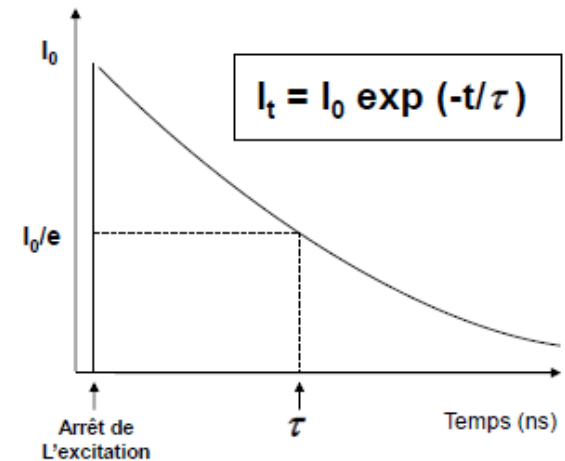
- ❑ **Coefficient d'extinction (ou absorption molaire) ϵ** : Reflète la probabilité d'absorption d'une molécule à une longueur d'onde donnée
entre 5000 et 250 000 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ $\epsilon=80\,000 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ pour 488 nm pour la fluorescéine
- ❑ **Rendement quantique** : efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation

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

Grandeur sans dimension 0,05 à 1
 $\Phi_F = 0,85$ pour la fluorescéine

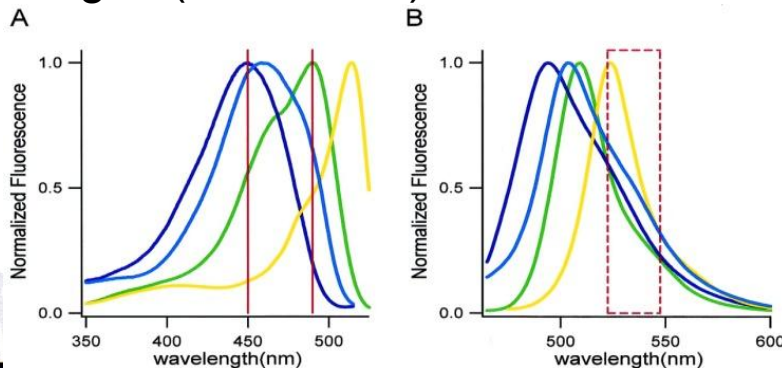
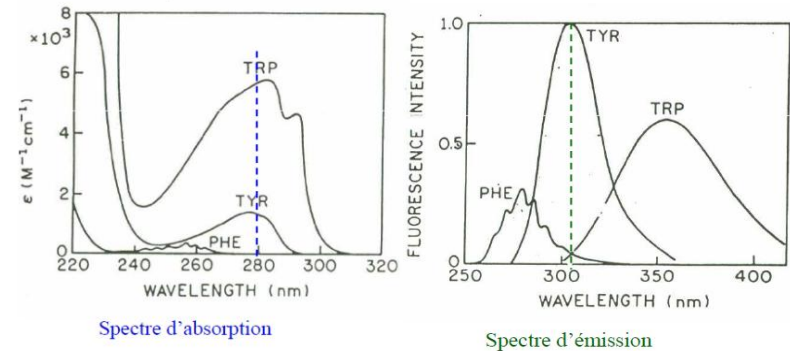
- ❑ **Intensité de fluorescence** : *dépend de la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} alors que l'allure du spectre de fluorescence est indépendante de cette dernière*
Pour une solution diluée : $I = 2,3 \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot \epsilon_\lambda \cdot l \cdot C$

- ❑ **Durée de vie à l'état excité** : c'est la durée caractéristique pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à l'état fondamental. Cette durée est assimilable à la demi-vie de l'état excité. *C'est un indicateur du temps dont on dispose pour enregistrer les modifications de l'état des molécules ou de leur interaction avec l'environnement immédiat*
(mesure par la fluorimétrie résolue en temps)
de l'ordre de la nanoseconde



Fluorophores naturels :

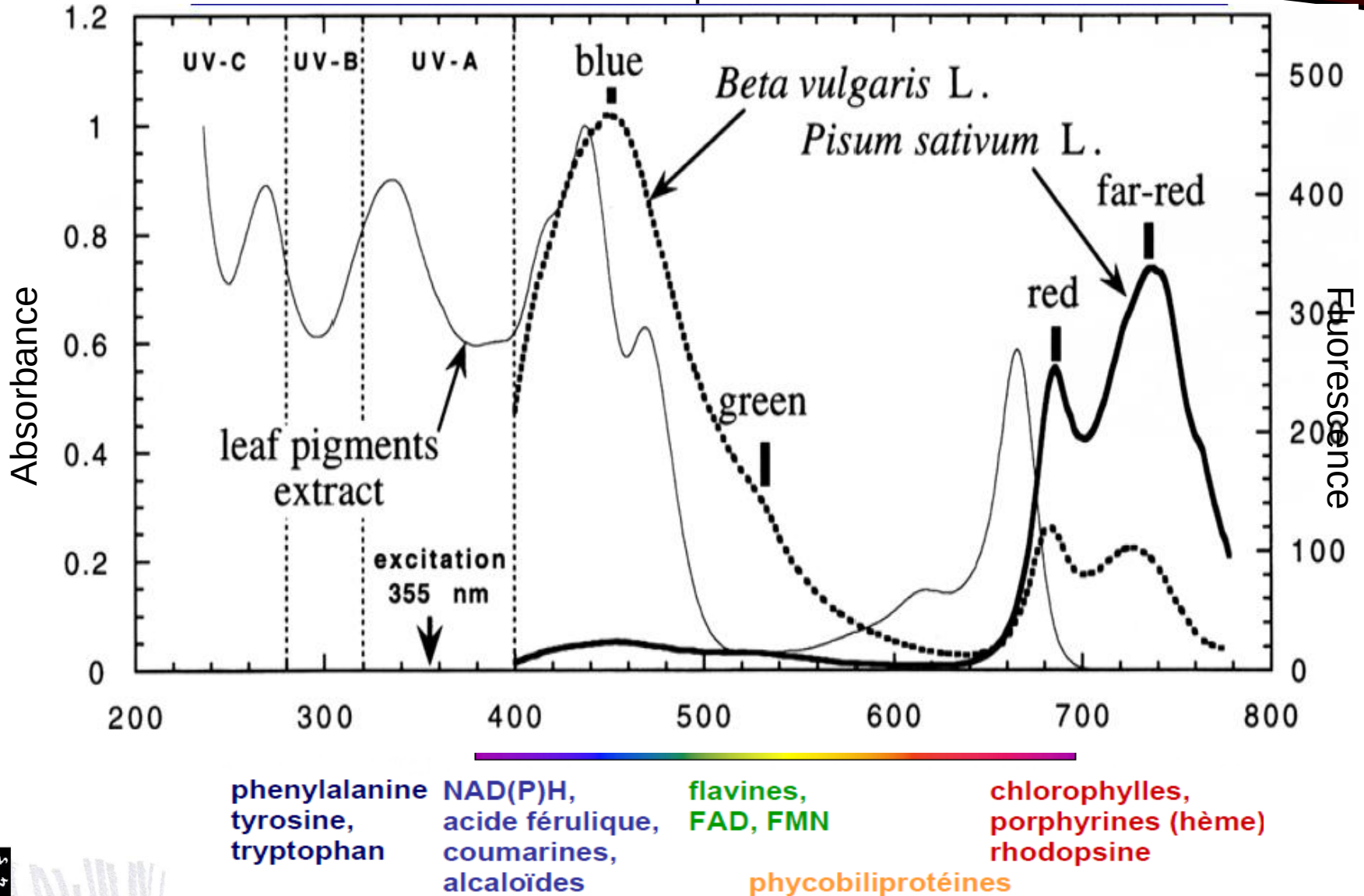
- les acides aminés aromatiques (Phénylalanine, Tryptophane, Tyrosine)
- les cofacteurs (NADH, FAD, ATP)
- certaines vitamines (A, B2, B6, E(tocophérol))
- les polyphénols : catéchine, acide gallique, quercétine....
- la chlorophylle, la porphyrine, la quinine
- certains contaminants tels que les HAP (benzo(a)pyrène...)
- la **GFP** (vient de *Aequorea victoria*) change la couleur du bleu au vert par transfert d'énergie; (très stable)



Spectres de fluorescence A excitation B émission de la eGFP et ses mutants (respectivement vert, bleu, jaune et rouge)



Autofluorescence chez la betterave et le pois



Fluorophores intrinsèques :

Acides aminés aromatiques : TRP, Tyr et Phe responsables fluo UV des protéines
dont 90% résidus TRP resp. fluo totale protéines

Fluorophores extrinsèques à la molécule à étudier

nécessite de marquage par un fluorophore pour obtenir la propriété de fluorescence (covalent ou non covalent)

- Fluorescéine , Rhodamine (Xanthènes), naphtoxanthènes , (covalents)
- Phycobilliprotéines, Cyanines, BODIPY (covalents)
- GFP (Green Fluorescent Protéin) et ses mutants
- bases nucléiques, DNS -Cl (Dansyl-chloride) , Naphtalène-sulfonate (ANS, TANS), Lanthanides , coumarines, Alexa-fluor (marquage de protéines)
- indoles, imidazoles

Pour une sonde de fluorescence : Qu'est ce qu'un bon fluorochrome?

Coefficient d'extinction important

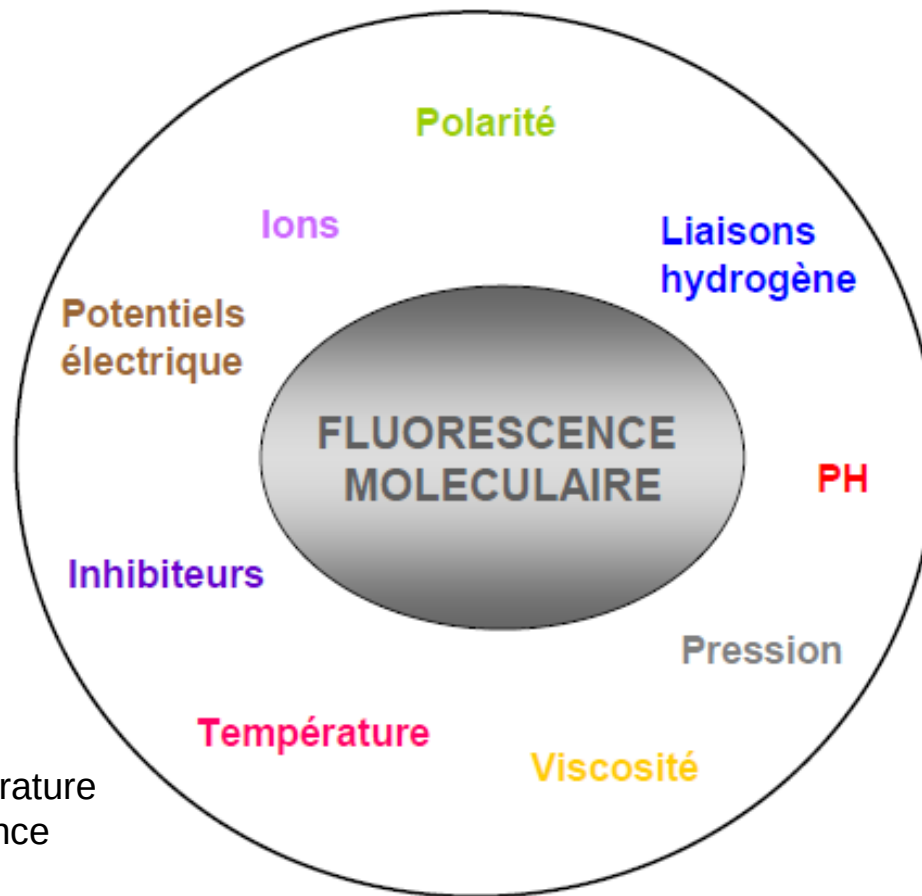
Fort rendement quantique (0,8-0,9)

Faible rendement triplet

Durée de vie de l'état excité courte (3ns)

Grand décalage de Stokes

Faible photoblanchiment



Augmentation Température
diminue la fluorescence

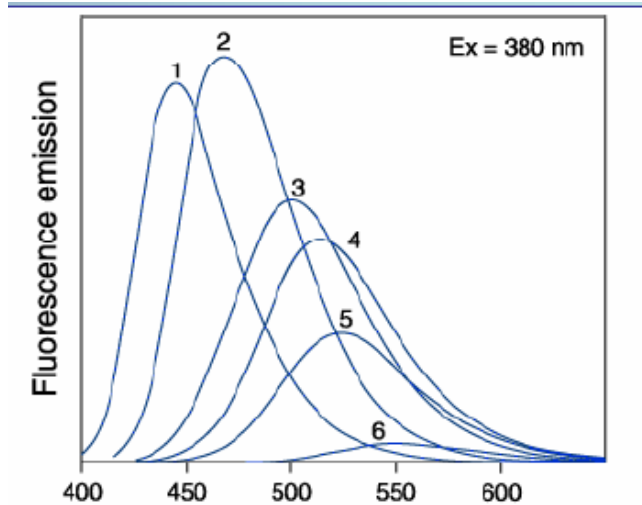
Représentation schématique des différents facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la fluorescence

La fluorescence est augmentée par la présence de groupes électro-donneurs et diminuée par les groupes électro-attracteurs.

Polarité

Sens de la
polarité
↓

- 1 Toluène
- 2 Chloroforme
- 3 Acétonitrile
- 4 Éthanol
- 5 Méthanol
- 6 Eau



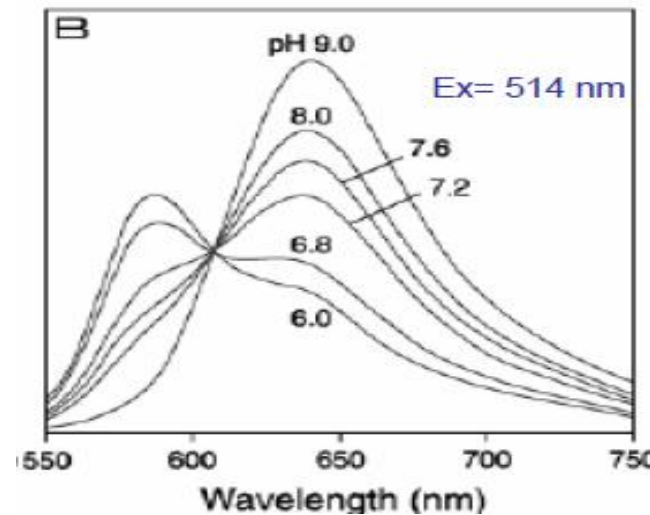
Exemple d'émission de fluorescence du
6- bromoacétyl-2-
diméthyllaminonaphthaène

Quand la polarité augmente,
 λ em augmente

pH

Modifications du :

- rendement quantique,
- spectres d'émission et d'excitation



Spectres d'émission de fluorescence dépendant du pH,
de la sonde carboxy-SNARF-1 (Molecular Probes)

D'après Tounsia Aït-Slimane

Phénomènes d'inhibition : tout processus qui amène une décroissance de la fluorescence (Quenching)

Diminution de fluorescence , perte de linéarité absorbance / intensité de fluorescence à fortes concentrations, on peut avoir :

Effet filtre: absorption de la fluorescence émise par la solution (réabsorption interne)

Effet excimère: excimères formés par collision du fluorophore à l'état excité et d'une molécule du même type non excitée

Inhibition statique : formation d'un complexe entre la molécule fluorescente et une espèce inhibitrice $\longrightarrow$ diminution de fluorescence (intensité)

Inhibition dynamique : Collision entre la molécule fluorescente et des molécules inhibitrices $\longrightarrow$ diminution de la fluorescence (à la fois intensité et demi-vie)
(pendant la durée de vie de l'état excité)

Photoblanchiment (n'est pas du quenching): phénomène de dégradation photoinduite du chromophore. Réactions photochimiques en particulier venant de l'oxygène avec les radicaux libres. Perte de la fluorescence du fluorochrome . Particulièrement gênant en microscopie de fluorescence. Peut être mis à profit pour mesurer la mobilité moléculaire. (FRAP et/ou FLIP)

En biologie :

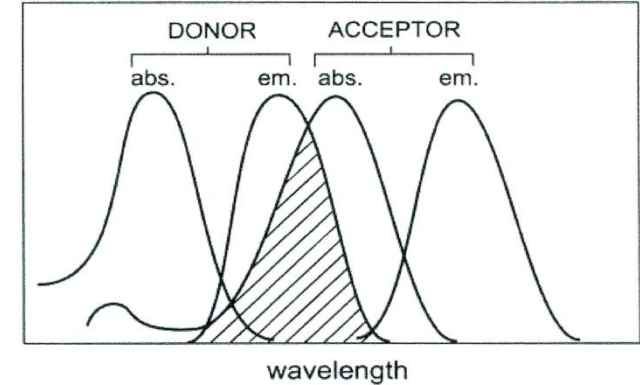
Afin de mieux connaître les interactions moléculaires mais aussi la diffusion spatiale intracellulaire des protéines , expression de gènes, compartimentation cellulaire, des techniques ont été développées qui ne pourront être présentées ici.

Ce sont en particulier :

- Le **transfert d'énergie (FRET)**, mais aussi transfert de charges
- Le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Redistribution de fluorescence après photoblanchiment)
- le FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching) (Perte de fluorescence par photoblanchiment)
- Fabrication de sondes (de polarité, de pH, de cations, d'anions....)
- La polarisation de fluorescence
- La fluorescence résolue en temps
- La microscopie de fluorescence

Objectif et principe :

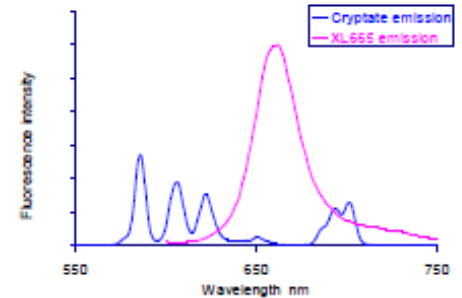
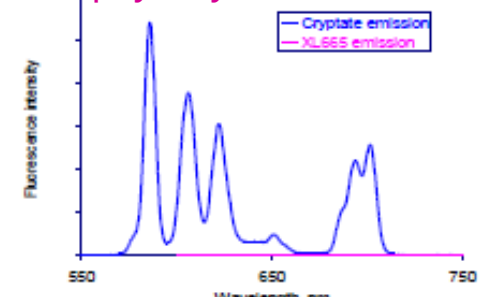
Evaluer la distance entre 2 molécules portant chacune un groupement fluorescent . La technique repose sur le transfert par résonance vers l'accepteur, de l'énergie émise après excitation du donneur. Pour que ce transfert puisse avoir lieu, il faut que le spectre d'émission du donneur chevauche le spectre d'absorption de l'accepteur. Ce transfert d'énergie est non radiatif, c'est-à-dire qu'il s'effectue sans émission de lumière.

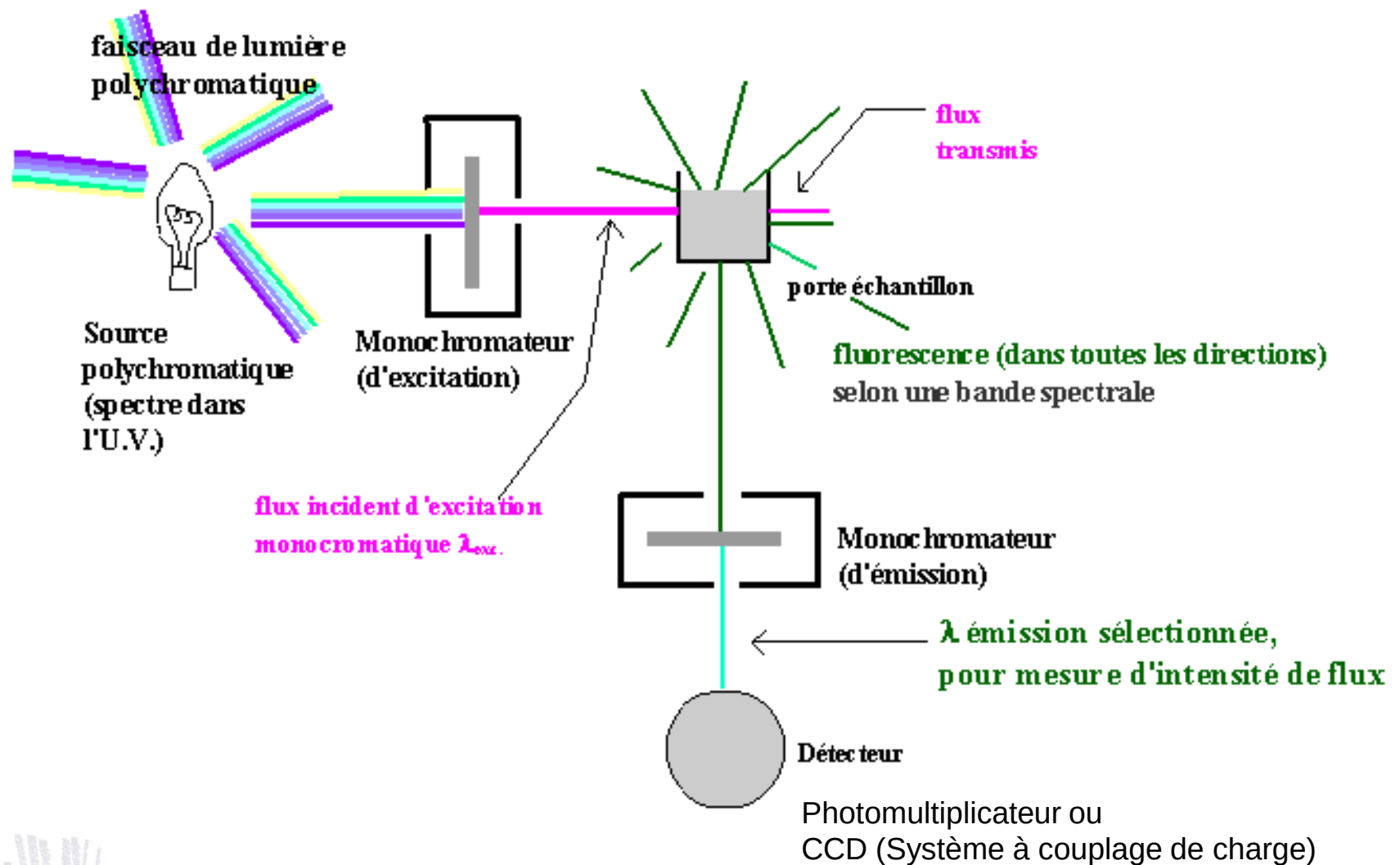


Utilisations : Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est utilisé en imagerie cellulaire pour rechercher des interactions moléculaires

Donneur : cryptate d'Europium

Accepteur : Allophycocyanine



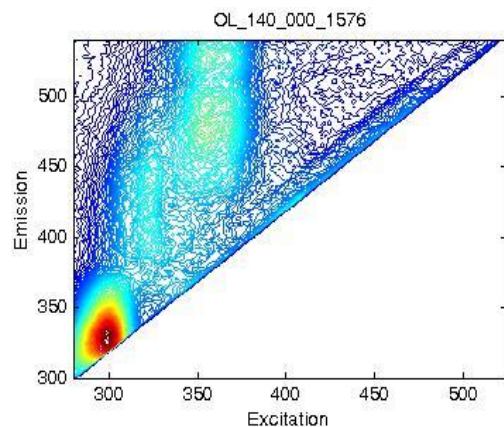


Quelques applications en spectroscopie de fluorescence

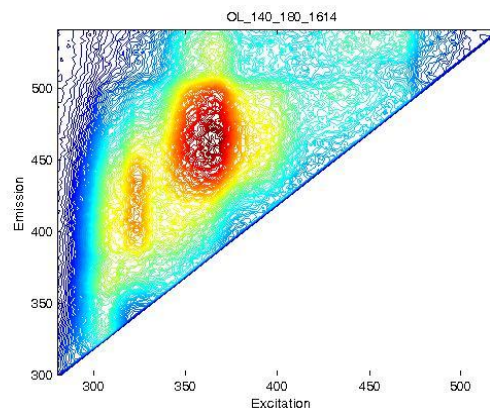


Spectres de fluorescence frontale 3D huile olive

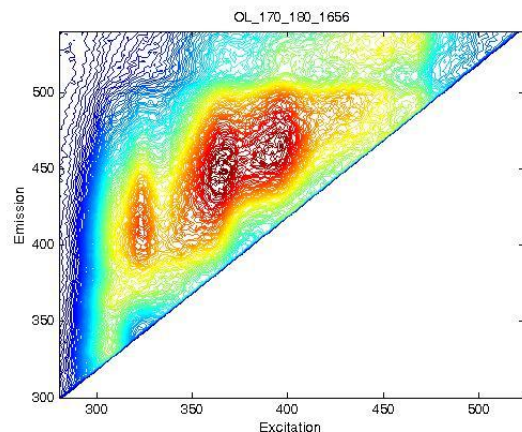
À froid



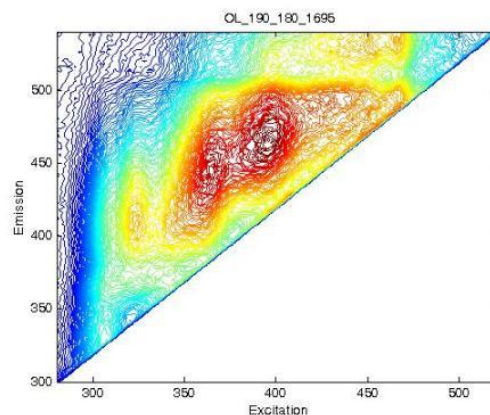
3h 140 C



3h 170 C



3h 190 C



Huile d'olive Puget chauffée à différentes températures pendant 3 h (3ml prélevés toutes les 5 min) paramètres : λ_{ex} =280-550nm et λ_{em} =290-550nm pas = 2 nm

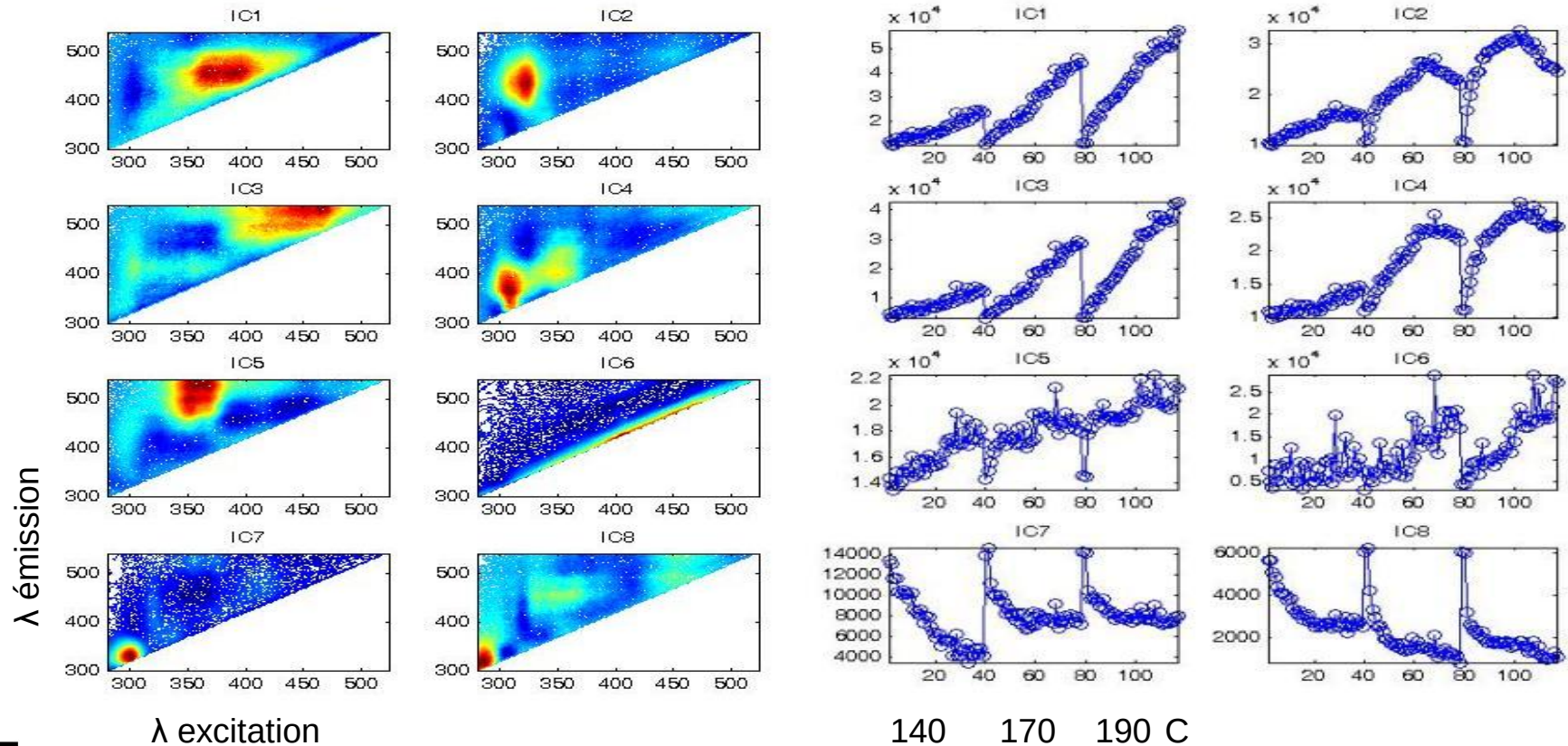
Analyse en composantes indépendantes (ICA)

ICA: méthode de séparation à l'aveugle, vise à extraire des signaux purs contenus dans un jeu de signaux observés

8 composantes indépendantes

Signaux

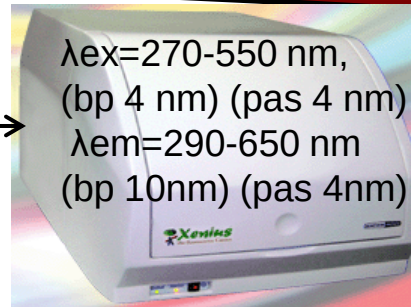
« Concentrations »



39 spectres par température soit 117 spectres

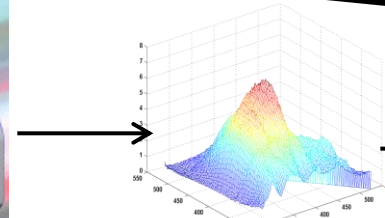


Broyage



$\lambda_{ex}=270-550$ nm,
(bp 4 nm) (pas 4 nm)
 $\lambda_{em}=290-650$ nm
(bp 10nm) (pas 4nm)

Spectrofluorimètre SAFAS Xenius



Spectres de fluorescence
3D Frontal

ICA

Paramètres de cuisson

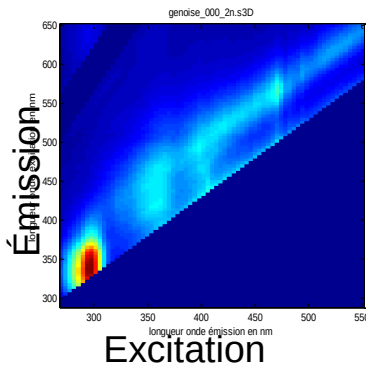
140 C, 170 C, 200 C

5, 10, 15, 20, 25 et 30 min

140 C

170 C

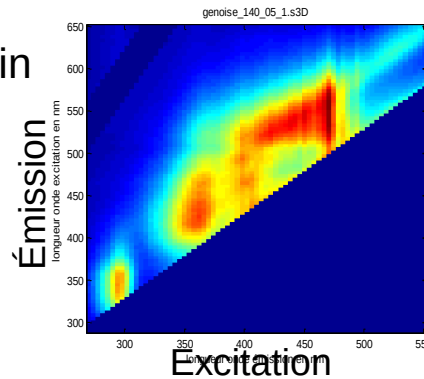
200 C



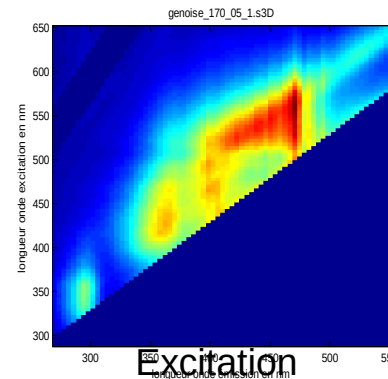
Crue

4 répétitions

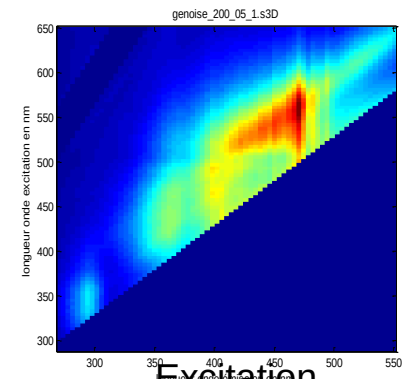
5 min



Excitation

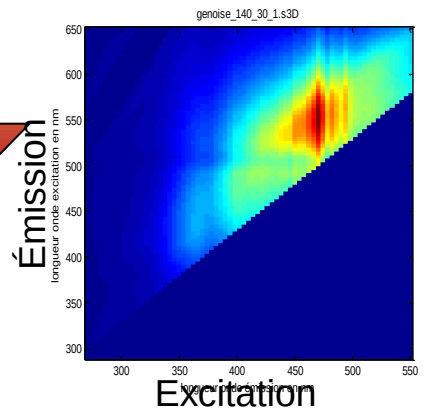


Excitation

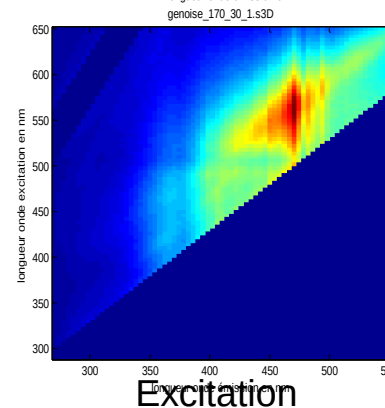


Excitation

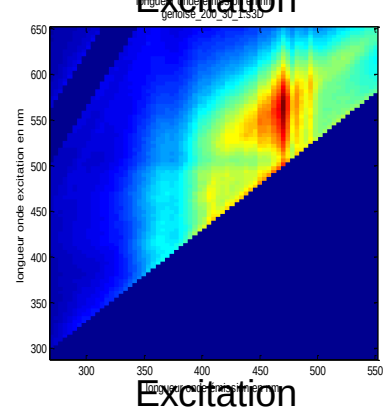
30 min



Excitation



Excitation



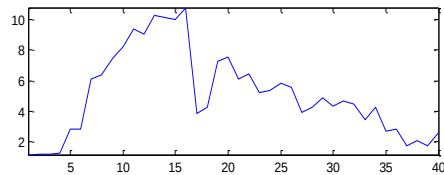
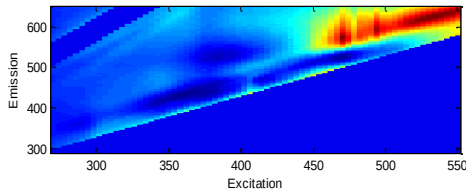
Excitation

12 spectres
par température

Analyse en composantes indépendantes (ICA)

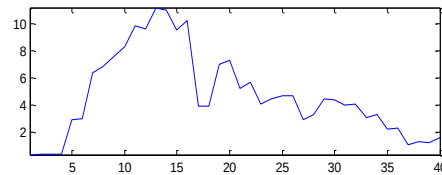
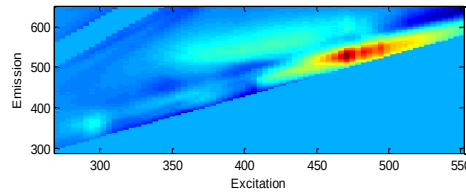
ICA: vise à extraire des signaux purs contenus dans un jeu de signaux observés

IC1_{IC1}



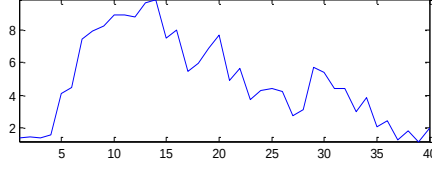
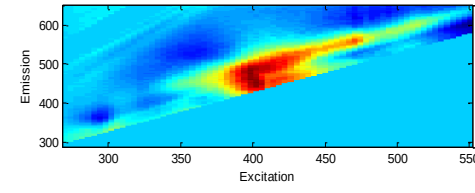
λ ex 480-550 nm
 λ em 540-650 nm

IC2_{IC2}



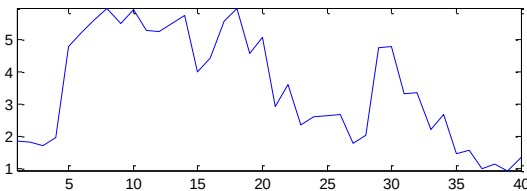
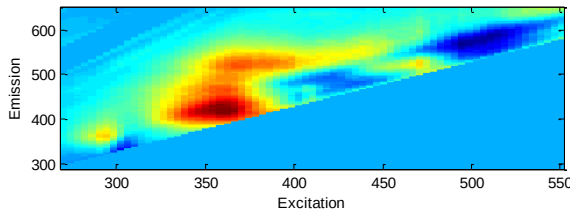
λ ex: 450-530 nm
 λ em : 490-560 nm

IC3_{IC3}



λ ex: 370-450 nm
 λ em : 410-530 nm

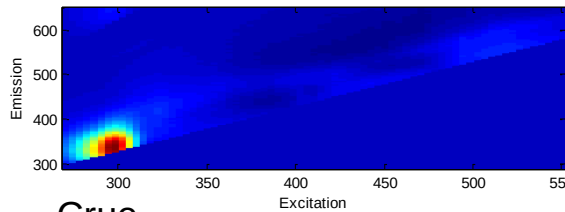
IC4_{IC4}



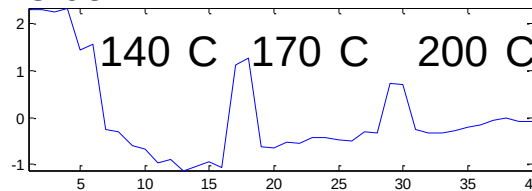
λ ex 330-400 nm
 λ em 380-550 nm

Produits de Maillard probablement

IC5_{IC5}



Crue



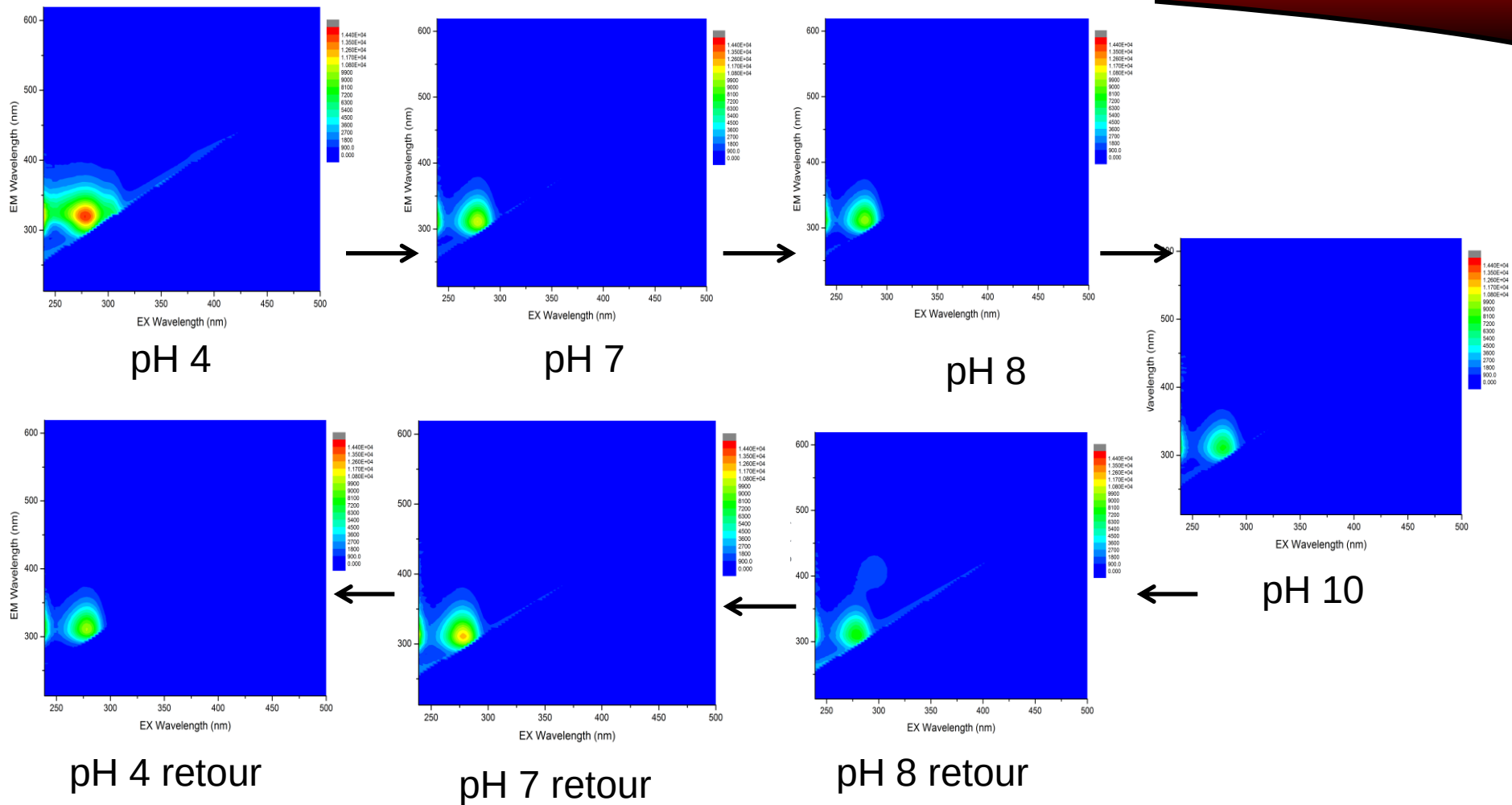
λ ex 280-290 nm
 λ em 320-360 nm

Probablement tryptophane

Signal extrait du fluorophore

Proportions du fluorophore

Modification du pH d'un polyphénol : la catéchine



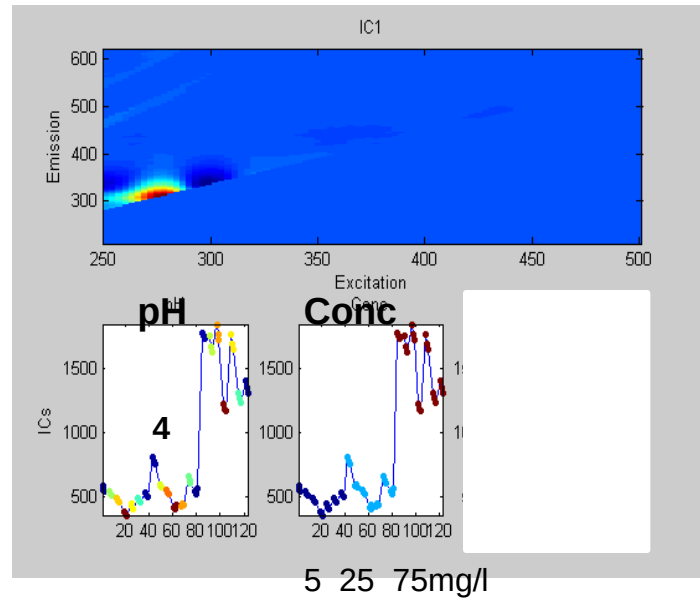
Solution de catéchine (25mg/l dilué) dans vin synthétique (3g/l d'acide tartrique, 13% éthanol dans l'eau). Variation du pH par ajout de NaOH et HCl.

Spectre de fluorescence λ_{ex} = 240-500 nm (pas 3 nm) λ_{em} = 240-620 nm (pas 3,28 nm)

Analyse en Composante Indépendante (ICA) catéchine à différents pH

ICA: vise à extraire des signaux purs contenus dans un jeu de signaux observés

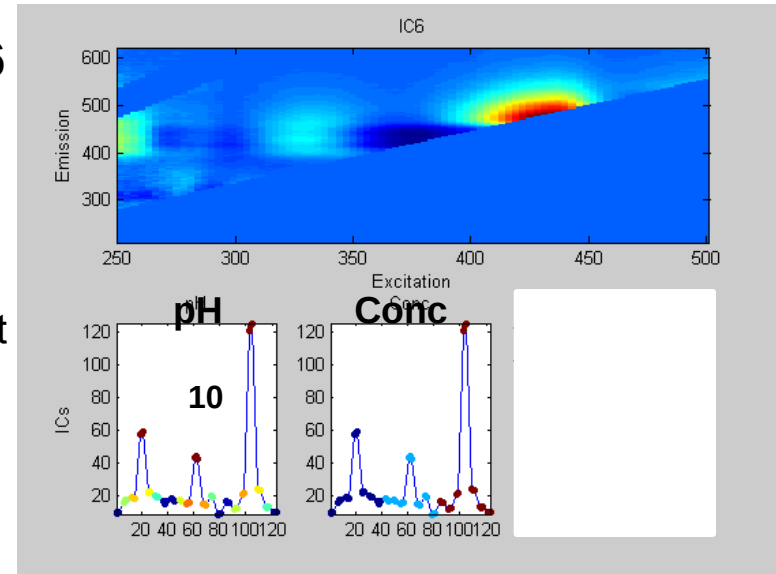
IC1



IC6

Signal d'IC

Proportion d'IC par rapport au signal du spectre en fonction des paramètres



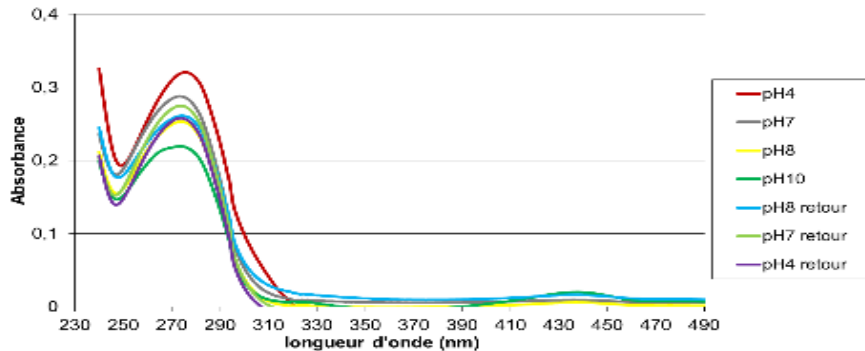
$\lambda_{ex} = [265; 280] \text{ nm}$ $\lambda_{em} = [280; 320] \text{ nm}$

- 6 IC dont IC1 = signal de la catéchine
- Proportion du pic maximale à pH 4 à 16,75 mg/l

$\lambda_{ex} = [400; 450] \text{ nm}$
 $\lambda_{em} = [420; 500] \text{ nm}$

Proportion maximale à pH10 à forte concentration

Catéchine 25 mg/l diluée
Absorbance en fonction de longueur d'onde



Hypothèses

- Déprotonation de l'hydrogène du groupement OH par NaOH : **base conjuguée de la catéchine**
- Oxydation partielle de la catéchine: **quinone**

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, mais aussi de distinctions variétales ou géographiques...

Le **couplage de la spectroscopie de fluorescence avec la chimiométrie** (en particulier ICA) est un bon outil pour caractériser des phénomènes telles que le changement de pH, des procédés tels que le chauffage de matrices alimentaires comme la génoise, les huiles végétales mais aussi des caractéristiques de variétés, de cépage...des applications existent aussi en environnement comme la caractérisation de l'eau, des sols, l'analyse de contaminants ...

Pour un chimiste analytique, la spectroscopie de fluorescence permet ainsi de développer des méthodes d'analyse rapide qui, associés à la chimiométrie, permettent de remplacer les méthodes d'analyse plus longues telles que HPLC, LC-MS, RMN....

Pour les biologistes, ce sont surtout les sondes de fluorescence qui sont utilisées pour marquer les molécules et/ou les organites à étudier afin de mieux comprendre les interactions des molécules ou les phénomènes dans la cellule en particulier....

- J.R. Albani ; Absorption et Fluorescence principes et applications ; 2001 éditions Tec-doc
- J.R. Lakowicz ; Principes of fluorescence spectroscopy; 3rd édition 2006 Springer
- B. Valeur ; Invitation à la fluorescence moléculaire ; 2004 édition De Boeck