

## FLUORESCENCE: ORIGINE, CARACTÉRISTIQUES, INFLUENCE DES PARAMÈTRES D'ENVIRONNEMENT

Marie-Laure Viriot

DCPR, UMR 7630 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, 1 rue Grandville,  
54000 Nancy, France

Marie-Laure.Viriot@ensic.inpl-nancy.fr

### 1. INTRODUCTION

La **fluorescence** correspond à une émission de lumière (luminescence) intervenant à partir d'un état excité électronique d'une substance (généralement singulet), avec conservation de la multiplicité, pour généralement retourner à l'état fondamental. Cette transition entre états de même multiplicité, qui respecte la règle de spin, intervient avec une très forte probabilité, ce qui se traduit par une vitesse de transition importante ( $\approx 10^8 \text{ s}^{-1}$ ) et par conséquent une durée de vie de fluorescence de l'ordre des 10 nanosecondes (typiquement entre  $10^{-11}$  et  $10^{-6} \text{ s}$ ).

La fluorescence se distingue de l'autre émission lumineuse, la **phosphorescence**, qui correspond à une transition entre états de multiplicités différentes, généralement à partir d'un état triplet, et ne respectant pas la règle

de spin. De ce fait, elle intervient avec une faible probabilité, soit une vitesse de transition lente ( $\approx 10^3\text{-}10 \text{ s}^{-1}$ ) et par conséquent une durée de vie de phosphorescence entre la milliseconde et quelques secondes.

L'observation de la fluorescence, tant en excitation continue, qu'en excitation pulsée ou modulée nécessite une instrumentation spécifique (le lecteur pourra se référer à l'ouvrage de Lakowicz, 1999, pour des informations sur les équipements et les méthodes de mesure). De plus, son observation est souvent couplée à des équipements en microscopie de fluorescence, ce qui en fait son grand intérêt pour des visualisations à l'échelle submicrométrique (Dumas et al., 2001; Valeur, 2002).

Si la fluorescence a depuis longtemps été décrite et appliquée, il est certain que ses applications récentes sont multiples et son intérêt ne cesse



Fig. 1 - Représentation de l'énergie quantifiée totale.

d'augmenter dans un nombre considérable de domaines (Wolfbeis, 1991; Valeur, 2002).

Pour décrire la fluorescence, nous en ferons d'abord un bref historique pour ensuite en rappeler son origine en considérant les différents états d'énergie d'une molécule, les conditions de l'absorption photonique (interaction lumière-matière, loi d'absorption...) et les différents états excités (singulet et triplet). Puis nous définirons les trois principales caractéristiques de la fluorescence: la **longueur d'onde** de l'émission (ou fréquence, i.e., résolution spectrale), la **durée de vie** de l'état excité responsable de l'émission (résolution temporelle) et le **rendement quantique** de fluorescence qui traduit l'efficacité de l'émission au regard de la quantité de photons absorbés, en mettant l'accent sur leur variation en fonction des paramètres d'environnement. Enfin, pour argumenter la potentialité de la fluorescence comme méthode analytique et ses développements en termes de capteurs photophysiques, après avoir défini des critères de choix des traceurs fluorescents, nous citerons quelques exemples d'applications se référant à nos propres études.

Cette présentation, qui est destinée à une compréhension de base de la fluorescence, a été élaborée en tirant parti de nombreux ouvrages et plus particulièrement de ceux de Calvert et Pitts, 1966, Lakowicz, 1999 et Valeur, 2002. Elle est aussi le fruit d'un enseignement de longue date à divers publics, en particulier à ceux relevant des biosciences, et surtout elle est basée sur notre propre activité de recherche pour le développement de la fluorescence comme méthode optique

de caractérisation de milieux complexes.

## 2. ORIGINE DE LA FLUORESCENCE

### 2.1. Historique

Les deux luminescences, fluorescence et phosphorescence, remontent à des temps lointains. Mais c'est au fur et à mesure de l'évolution de la science et des techniques que les phénomènes physiques ont pu être de mieux en mieux définis et décrits.

En fait, les termes fluorescence et phosphorescence sont directement liés aux matériaux sources du rayonnement. Chronologiquement, c'est la phosphorescence qui a été la première reportée et cela date de la Chine ancienne: l'empereur possédait un tableau dont le matériau était capable d'emmagasiner la lumière du jour et de la restituer, l'image était un bœuf. Mais ce n'est qu'au début du 17<sup>ème</sup> siècle, que Vincenzo Cascariolo, cordonnier à Bologne en Italie, a retrouvé le procédé de fabrication en calcinant en présence de charbon des minéraux, qui après exposition à la lumière étaient porteurs d'émission de lumière rougeâtre dans le noir (réduction de sulfate de baryum en sulfide). On parla de phosphorescence, car on désigna la pierre "porte lumière" qui se dit *phosphor* en grec.

Parallèlement à la fin du 16<sup>ème</sup> siècle, la première manifestation de la fluorescence a été reportée par Nicolas Monardes (en 1565) qui correspond à l'émission de lumière bleue

par une infusion de bois (*Lignum Nephriticum*). Puis d'autres substances ont été décrites comme sources de rayonnement (solutions de chlorophylle, de sulfate de quinine ...), mais ce n'est qu'en 1853 que le terme fluorescence a été introduit par George G. Stokes, en raison du minéral fluorspat (ou fluorspath, fluorure de calcium) qui est capable de donner une émission de lumière si simultanément il absorbe de la lumière.

## 2.2. Différents états d'énergie d'une molécule

L'énergie globale d'une molécule (approximation de Born-Oppenheimer) est la somme de quatre types d'énergie:

$$E = E_t + E_r + E_v + E_e \quad (1)$$

où:

- $E_t$  est l'énergie de **translation**: dans un gaz, une molécule peut se déplacer avec une certaine vitesse  $v$ , elle possède alors une énergie cinétique (ou de translation)  $E_t = 1/2 mv^2$  ( $m$  représentant la masse de la molécule). Cette énergie  $E_t$  est celle qu'il faut fournir pour qu'une molécule immobile acquière la vitesse  $v$ ; inversement, si la molécule vient heurter un substrat par un choc inélastique, elle cède cette énergie  $E_t$  et redevient immobile.
- $E_r$  est l'énergie de **rotation**: une molécule peut tourner sur elle-même; l'énergie  $E_r$  fournie à une molécule pour la mettre

en rotation est l'énergie de rotation possédée par la molécule animée.

- $E_v$  est l'énergie de **vibration**: la molécule peut se déformer (élongation, distorsions diverses) et osciller de la même façon qu'un ressort parfaitement élastique; l'énergie fournie pour créer ces mouvements oscillatoires est l'énergie vibrationnelle  $E_v$ .
- $E_e$  est l'énergie **électronique**: la molécule est constituée d'atomes; des électrons provenant des couches atomiques externes se déplacent entre ces atomes et constituent les liaisons interatomiques. Ces électrons se "déplacent" suivant des orbitales moléculaires et par un apport d'énergie, on peut faire passer un électron d'une orbitale à une autre qui est vide; cet apport d'énergie est une énergie électronique  $E_e$ .

De façon générale, l'ordre est le suivant:

$$E_r < E_t \approx E_v < E_e$$

$E_r$  quelques cal/mole  
 $E_t, E_v$  quelques kcal/mole  
 $E_e$  quelques dizaines de kcal/mole

Les énergies  $E_r$ ,  $E_v$  et  $E_e$  ont des **valeurs quantifiées** (uniquement des valeurs discrètes) et peuvent être représentées de manière schématique selon la Fig. 1. Chaque niveau électronique est alors composé de sous-niveaux vibrationnels, eux-mêmes comportant des sous-niveaux rotationnels et correspond à une énergie électronique  $E_e$ , une énergie vibra-



Fig. 1 - Représentation de l'énergie quantifiée totale

tionnelle  $E_v$  et une énergie rotationnelle  $E_r$ .

Une molécule peut acquérir de l'énergie de translation, de rotation ou de vibration par **chocs**. Elle peut acquérir de l'énergie photonique par l'**absorption d'un photon** (interaction lumière-matière) avec transformation d'énergie lumineuse en énergie rotationnelle, vibrationnelle ou électronique, et passage de la molécule d'un niveau initial  $i$  à un niveau supérieur final  $j$  par un "saut" énergétique ( $E = E_j - E_i$ ) (Fig. 2). Ce phénomène suit la **loi de Planck**:

$$E = E_j - E_i = h\nu \quad (2)$$

$\nu$  est la fréquence correspondante du photon et  $h$  désigne la constante de Planck ( $h = 6,66 \cdot 10^{-27}$  erg.s).

Le phénomène d'absorption est à l'origine de diverses techniques spectroscopiques: microonde (niveaux de rotation), infra-rouge et Raman (niveaux de rotation et vibration), visible et ultraviolet (niveaux de rotation, vibration et électroniques).

Le phénomène inverse peut avoir lieu, c'est l'émission d'un photon par le saut d'énergie d'un niveau initial  $i$  à un niveau inférieur final  $k$  (Fig. 2).

Sur un plan pratique, le niveau énergétique sur lequel se trouve une molécule prise au hasard, en absence de lumière (en théorie, pas de transition électronique), est dépendant de la température du milieu,  $T$ . Le peuplement des niveaux énergétiques est régi par la **loi de Maxwell-Boltzmann**:

$$\frac{n_i}{n_0} = \frac{g_i}{g_0} e^{-\frac{E_i}{kT}} \quad (3)$$

$n_i/n_0$  représente le rapport du nombre de molécules du milieu

sur le niveau  $i$  au nombre de molécules sur le niveau de base 0 (niveau fondamental)  $n_0$ .  $g_i$  et  $g_0$  sont les multiplicités des niveaux, termes intervenant uniquement pour l'énergie rotationnelle (pour les niveaux vibrationnels  $g_i = g_0 = 1$ ).  $E_i$  est l'énergie du niveau  $i$  (par rapport au niveau de base) et  $k$  est la constante de Boltzmann ( $k = 1,3807 \cdot 10^{-23}$  J.K<sup>-1</sup>).

### 2.3. Interaction lumière-matière: condition de Bohr et moment de transition

La lumière consiste en la progression d'une onde électromagnétique, i.e., le déplacement d'un couple de vecteurs champ électrique  $\vec{E}$  (vecteur lumineux de Fresnel) et champ magnétique  $\vec{H}$ .

Le processus d'absorption photonique peut être décrit comme la "collision" d'un photon (porteur de l'énergie  $h\nu$ ) avec les électrons d'un atome ou d'une molécule, qui entraîne la promotion d'un électron dans une orbitale inoccupée, telle que l'énergie qui la sépare de l'état fondamental représente justement l'énergie du photon (**condition de Bohr**):  $E_{\text{accueil}} - E_{\text{départ}} = h\nu$ .

Le passage d'une molécule d'un état électronique à un autre peut se faire par absorption (ou émission) d'une radiation. L'onde électromagnétique associée agit essentiellement sur la matière par l'intermédiaire de son champ électrique. L'étude théorique montre que, si un système est susceptible d'être dans deux états 1 et 2 d'énergies respectives croissantes  $E_1$  et  $E_2$ , la probabilité pour que le pas-

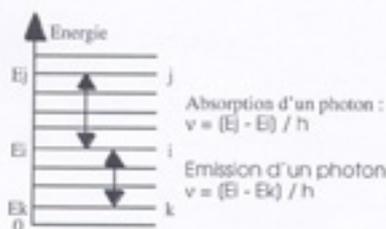
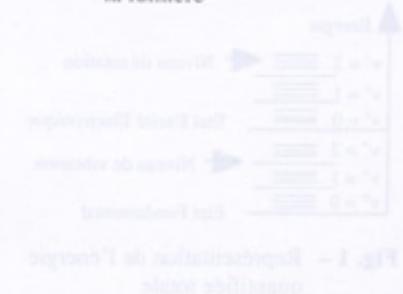


Fig. 2 - Interaction d'une molécule possédant une énergie  $E_i$  avec la lumière



sage de l'état 1 à l'état 2 se fasse par absorption d'une radiation de fréquence  $\nu$  vérifiant  $E_1 - E_2 = h\nu$  (condition de Bohr) est proportionnelle au carré du module d'un vecteur  $\vec{\mu}_{1,2}$  appelé **moment de transition**. Chaque fois que le moment de transition est nul, la transition est dite interdite, en particulier des moments de transition sont nuls chaque fois qu'ils sont relatifs à deux états de spin différents: **les seules transitions permises sont des transitions entre états de même multiplicité**.

#### 2.4. Nature des états excités: Singulet et Triplet

La représentation d'un état excité comme un état où un électron se trouve sur une orbitale moléculaire élevée est en fait approchée. En effet, le comportement de l'électron est déterminé non seulement par l'orbitale moléculaire sur laquelle il "gravite", mais également par son **spins**, le spin représentant de manière approchée le mode de rotation de l'électron sur lui-même (ce qui est désigné par  $s$  est en toute rigueur la composante sur un axe choisi Oz du moment cinétique de rotation de l'électron).

Par ailleurs, le **principe de Pauli** affirme que, au plus, deux électrons peuvent parcourir la même orbitale, et sont alors de spins opposés (+ 1/2 et - 1/2).

Une représentation plus exacte de la distribution électronique fait donc intervenir le spin des électrons. Une telle représentation est donnée sur la Fig. 3; les électrons de spin  $s = + 1/2$  sont représentés par une flèche ascendante et de spin  $s = - 1/2$  par une flèche

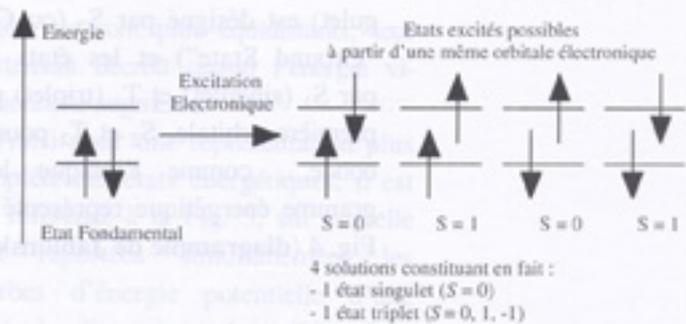


Fig. 3 – Distribution des spins électroniques dans l'état fondamental et dans l'état excité

che descendante.

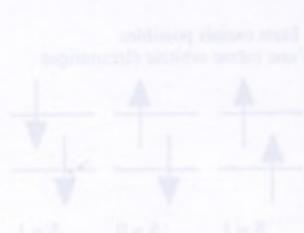
En général, dans l'état fondamental les électrons sont rassemblés par paires de spins opposés (exceptions: oxygène, NO). Le spin global de la molécule  $S = S_s$  est donc nul ( $S$  étant le nombre quantique de spin), l'état est dit singulet. Par contre, pour l'état excité, quatre solutions sont possibles, comme indiqué sur la Fig. 3 (les niveaux de basse énergie qui n'interviennent pas dans le phénomène ne sont pas représentés).

Selon la mécanique quantique (et en première approximation), on considère que deux états excités sont possibles pour une même orbitale d'accueil de l'électron promu:

- un état **singulet** de multiplicité 1 ( $S = 0$ ).
- un état **triplet** de multiplicité 3 (triplement dégénéré) ( $S = 0, -1, +1$ ), ces trois états étant indiscernables dans les conditions habituelles.

L'existence du spin électronique conduit à distinguer au lieu de simples orbitales électroniques des couples d'états excités singulet et triplet d'énergie et de nature différentes.

Dans la représentation générale des états excités, l'état fondamental (sin-



gulet) est désigné par  $S_0$  (ou G, pour "Ground State") et les états excités par  $S_1$  (singulet) et  $T_1$  (triplet) pour la première orbitale,  $S_2$  et  $T_2$  pour la seconde..., comme l'indique le diagramme énergétique représenté sur la Fig. 4 (diagramme de Jablonski).

d'onde plus grandes que celles de l'émission de fluorescence. Il a été rappelé que les transitions entre états de multiplicité différente étaient interdites (règle de spin). Cette règle est très importante, car elle implique que le peuplement d'un état triplet d'une mo-

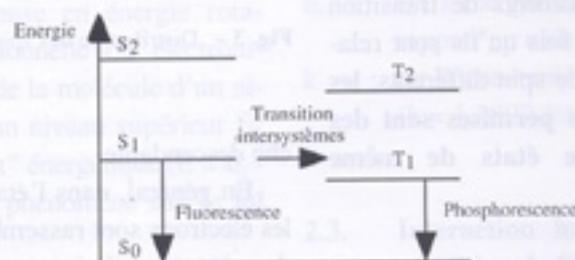


Fig. 4 – Représentation des états excités moléculaires électroniques

L'état triplet est de plus basse énergie que l'état singulet, en raison d'une plus faible énergie d'interaction entre les deux électrons de spin parallèles (distance moyenne supérieure) par comparaison à celle où les deux électrons sont de signes opposés. L'énergie des photons de phosphorescence est donc plus faible que celle des photons de fluorescence et donc l'émission de phosphorescence a lieu à des longueurs

lécule ne pourra avoir lieu directement par excitation lumineuse à partir de l'état fondamental (sauf pour des cas particuliers, cf. les travaux de Lewis et Kasha qui mirent en évidence la transition  $S_0 \Rightarrow T_1$  pour la molécule de benzène [Lewis et Kasha, 1945]).

Le Tableau I rassemble les caractéristiques des deux types d'états excités, singulet et triplet.

TABLEAU I – Comparaison des propriétés des états singulet et triplet

	Singulet	Triplet
Multiplicité ( $2S + 1$ )	1	3
Energie par rapport à l'état fondamental	$E_{\text{Singulet}} > E_{\text{Triplet}}$	
Propriétés magnétiques	Diamagnétique	paramagnétique, actif en RPE
Transitions radiatives avec l'état fondamental		
Absorption	$\epsilon \sim 10^4 \text{ à } 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon \ll 1 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$
Emission	$k_f \sim 10^8 \text{ s}^{-1}$	$k_p \sim 10^3 \text{ à } 10^4 \text{ s}^{-1}$
Transfert d'énergie électronique	formation de nouveaux singulets	formation de nouveaux triplets
Propriétés chimiques	peuvent être spécifiques de l'état	

### 2.5. Courbe d'énergie potentielle

Pour décrire les différents niveaux d'énergie d'une molécule, il est fait appel à sa **courbe d'énergie potentielle**. Dans le cas le plus simple, cas d'une molécule diatomique dans l'hypothèse de l'oscillateur harmonique (**loi de Hooke**: force de rappel  $F$  proportionnelle à l'éloignement de leur position d'équilibre  $x$  de deux atomes:  $F = -kx$ ), la courbe représentative des variations de l'énergie potentielle est une parabole:

$$E = (1/2) kx^2 \quad (4)$$

En fait cette hypothèse d'harmonie est mise en défaut pour les grands déplacements des noyaux. La courbe  $E$  vs  $x$  n'est plus une parabole, mais une courbe asymétrique. Les niveaux de vi-

bration ne sont plus équidistants, leur écartement décroît quand l'énergie vibrationnelle augmente.

Ainsi pour une représentation plus complète des états énergétiques, il est fait référence à la Fig. 5, sur laquelle sont reportées simultanément les courbes d'énergie potentielle d'une molécule diatomique dans l'état fondamental (courbe 1) et dans l'état excité électronique singulet (courbe 2) et triplet (courbe 3).

### 2.6. Approximation de Franck et Condon

Sur la Fig. 5, on note par un trait vertical la transition électronique en raison de l'**approximation de Franck**

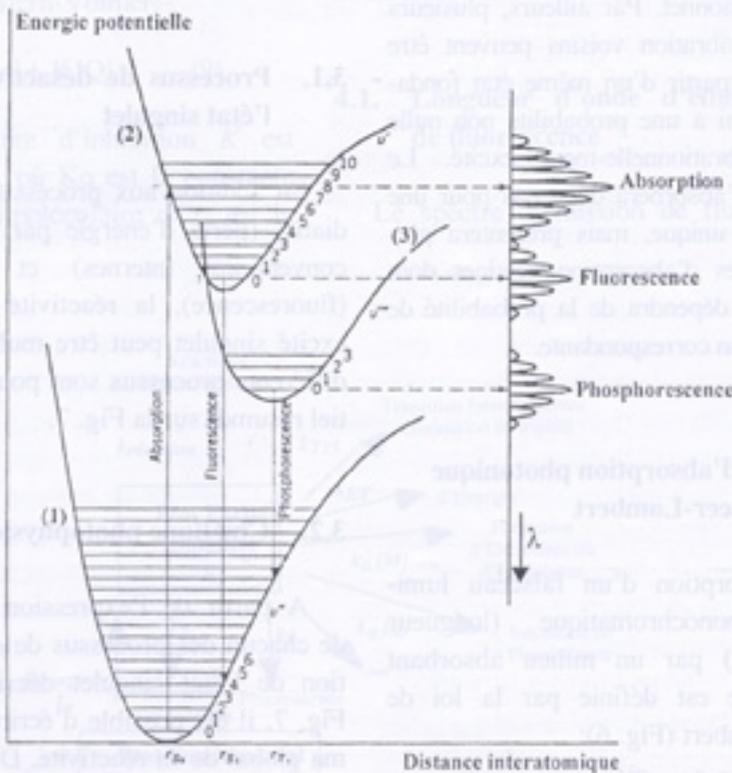


Fig. 5 - Transitions entre les courbes d'énergie potentielle de l'état fondamental et d'un état excité d'une molécule diatomique (états singulet et triplet).

et Condon: "le temps requis pour l'absorption d'un photon et la promotion d'un électron qui en est la conséquence est si court ( $10^{-15}$  s) par rapport à la période de vibration de la molécule ( $10^{-13}$  s) que pendant l'excitation (ou l'émission), les distances interatomiques des noyaux et leurs énergies cinétiques ne varient pas".

Dans le cas de la molécule diatomique, les conséquences de l'approximation de Franck et Condon sont immédiates. Supposons qu'à l'état fondamental la molécule soit dans l'état de vibration le plus bas. Les transitions verticales amènent la molécule à l'état excité avec une énergie supérieure à celle de cet état au plus bas niveau de vibration. Ces transitions peuplent donc des états excités non seulement électriquement, mais également du point de vue vibrationnel. Par ailleurs, plusieurs états de vibration voisins peuvent être atteints à partir d'un même état fondamental, qui a une probabilité non nulle d'être vibrationnellement excité. Le système n'absorbera donc pas pour une fréquence unique, mais présentera plusieurs raies d'absorption voisines dont l'intensité dépendra de la probabilité de la transition correspondante.

## 2.7. Loi d'absorption photonique de Beer-Lambert

L'absorption d'un faisceau lumineux monochromatique (longueur d'onde  $\lambda$ ) par un milieu absorbant homogène est définie par la loi de Beer-Lambert (Fig. 6):

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) e^{-\epsilon(\lambda) C l} \quad (5)$$

où

$I_0(\lambda)$  est l'énergie incidente (nombre de photons)

$\epsilon(\lambda)$  est le coefficient d'extinction molaire ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

$C$  est la concentration de l'absorbant ( $mol \cdot L^{-1}$ )

$l$  est la largeur du parcours optique (cm)

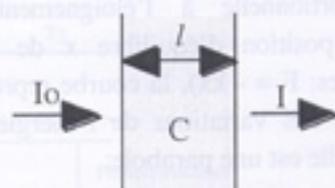


Fig. 6 - Schéma représentant l'absorption

## 3. REACTIVITE DE L'ETAT SINGULET - CINETIQUE PHOTOPHYSIQUE

### 3.1. Processus de désactivation de l'état singulet

En addition aux processus non radiatifs (perte d'énergie par chocs ou conversions internes) et radiatifs (fluorescence), la réactivité de l'état excité singulet peut être multiple. Les différents processus sont pour l'essentiel résumés sur la Fig. 7.

### 3.2. Cinétique photophysique

A partir de l'expression cinétique de chacun des processus de désactivation de l'état singulet décrits sur la Fig. 7, il est possible d'écrire le schéma global de sa réactivité. De plus, en faisant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire, i.e., équilibre entre produc-

tion et désactivation de l'état singulet ( $d[S_1]/dt = 0$ ), on obtient:

$$I_e = [S_1] (k_a + k_r + k_{nr} + k_{cr} + k_q [Q] + k_{ex} [M] + \dots) \quad (6)$$

### 3.3. Inhibition de fluorescence – Droite de Stern-Volmer

La diminution de l'intensité de fluorescence (inhibition ou "quenching") peut être due à une variété de processus. Du point de vue cinétique, on peut écrire les équations de désactivation de l'état singulet respectivement:

- en absence de l'inhibiteur:  
 $[S_1]_0 = I_e / (k_{ar} + k_{f0} + \dots) \quad (7)$

- en présence de l'inhibiteur:  
 $[S_1] = I_e / (k_{ar} + k_f + \dots + k_q [Q]) \quad (8)$

Le ratio conduit à l'expression de l'équation de Stern-Volmer:

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = 1 + K [Q] \quad (9)$$

La constante d'inhibition  $K$  est égale à  $K_q \tau_0$ , où  $K_q$  est la constante d'inhibition bimoléculaire et  $\tau_0$  est la

durée de vie de l'état singulet en absence d'inhibiteur:

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (10)$$

Le lecteur pourra se reporter à l'ouvrage de Valeur, 2002, pour une description complète de la cinétique et des phénomènes d'inhibition de fluorescence.

## 4. CARACTERISTIQUES DE LA FLUORESCENCE

Comme il a été dit dans l'introduction, à la fluorescence est associée trois caractéristiques: la **longueur d'onde** de l'émission, la **durée de vie** de l'état excité responsable de l'émission et le **rendement quantique** de fluorescence.

### 4.1. Longueur d'onde d'émission de fluorescence

Le spectre d'émission de fluores-

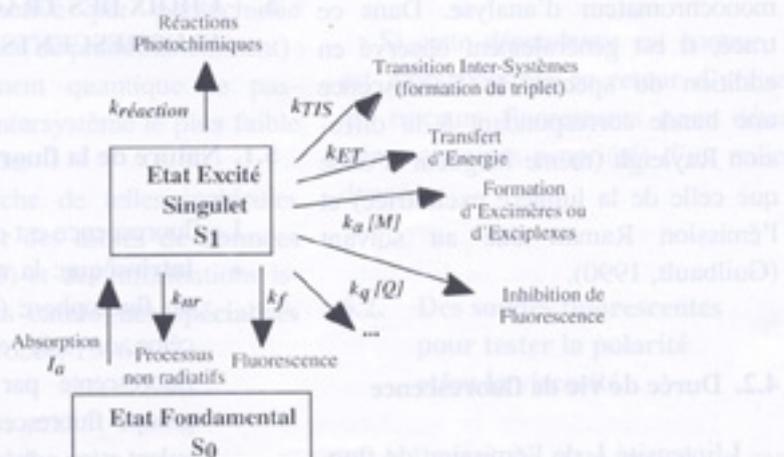


Fig. 7 – Représentation schématique de la production et de la désactivation de l'état singulet

cence d'une substance est caractéristique de sa structure pour un environnement donné (solvant, température, pH, pression...). Il apparaît à des longueurs d'onde supérieures à celles correspondant au spectre d'absorption, puisque généralement il y a perte d'énergie (conversions internes, retour à l'état vibrationnel excité  $v = 0 \dots$ ):

$$h\nu_{\text{absorption}} < h\nu_{\text{émission}}$$

soit:  $\lambda_{\text{émission}} > \lambda_{\text{absorption}}$

Le spectre d'émission de fluorescence se compose d'une ou plusieurs bandes selon les composés et leur environnement. Pour un spectre monobande, on entend par longueur d'onde d'émission de fluorescence, la longueur d'onde au maximum d'intensité notée  $\lambda_{f \text{ max}}$ . La différence entre les longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission de fluorescence pour un environnement donné correspond au **déplacement de Stokes**.

En pratique, le tracé d'un spectre de fluorescence se fait pour une longueur d'onde d'excitation déterminée (d'après le spectre d'absorption de la substance, de préférence dans les mêmes conditions d'environnement) en balayant les longueurs d'onde du monochromateur d'analyse. Dans ce tracé, il est généralement observé en addition du spectre de fluorescence une bande correspondant à la diffusion Rayleigh (même longueur d'onde que celle de la lumière excitatrice) et l'émission Raman due au solvant (Guilbault, 1990).

#### 4.2. Durée de vie de fluorescence

L'intensité  $I_f$  de l'émission de fluorescence suit une loi de décroissance

de type exponentiel:

$$I_f(t) \approx e^{-(t/\tau)} \quad (11)$$

où  $\tau$  (assimilable à un temps) est la durée de vie de l'espèce excitée (valeur moyenne de l'existence de la molécule excitée). Si on considère les molécules isolées,  $\tau$  est la **durée de vie naturelle** (notée  $\tau_0$ ). En revanche, si les molécules sont en interaction avec le milieu (présence d'inhibiteur par exemple), la durée de vie mesurée devient la **durée de vie réelle** (notée  $\tau$ ).

#### 4.3. Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence,  $\Phi_f$ , traduit l'efficacité de l'émission au regard de l'absorption photonique:

$$\Phi_f = I_f / I_a \quad (12)$$

$$\text{soit: } \Phi_f = k_f \tau_{\text{Singulet}} \quad (13)$$

Sa détermination nécessite généralement une substance de référence, pour laquelle le rendement quantique de fluorescence est connu.

### 5. CHOIX DES TRACEURS FLUORESCENTS

#### 5.1. Nature de la fluorescence

La fluorescence est de nature :

- **intrinsèque**: la molécule est soit un fluorophore (pyrène, fluorescéine...), soit elle est rendue fluorescente par greffage d'un groupe fluorescent (greffage covalent et/ou adhésion physique).
- **extrinsèque**: la sonde fluo-

rescente est simplement incorporée dans le milieu à étudier, il est évident qu'il faudra connaître sa localisation précise dans le cas de milieux complexes (milieux hétérogènes, milieux biologiques...) pour pouvoir analyser de manière sûre les propriétés de fluorescence et surtout les corréler à leur structure et à leur dynamique.

### 5.2. Critères pour choisir une molécule hautement fluorescente

Les principaux critères pour qu'une molécule présente une fluorescence efficace ( $\Phi_f$  le plus proche possible de 1) peuvent être résumés comme suit:

- forme plane qui présente des conjugaisons (possibilité de résonance, colorants xanthéniques, aromatiques...)
- absence de torsion intramoléculaire (diminuer les pertes par rotations internes)
- non active par photochimie (absence de photoblanchiment)
- rendement quantique de passage intersystème le plus faible possible.

La recherche de telles molécules s'appuiera sur des **tables de données** (Murov, 1973) et des informations issues de divers **catalogues spécialisés** (Molecular Probes, 1996).

## 6. INFLUENCE DES PARAMETRES D'ENVIRONNEMENT SUR LES CARACTERISTIQUES DE FLUORESCENCE

### 6.1. Les principaux paramètres d'environnement

Comme il a été rappelé dans l'introduction, les propriétés de fluorescence ( $\lambda_f$  max,  $\tau$ ,  $\Phi_f$ ) sont dépendantes des paramètres d'environnement, dont les principaux sont reportés sur la Fig. 8.

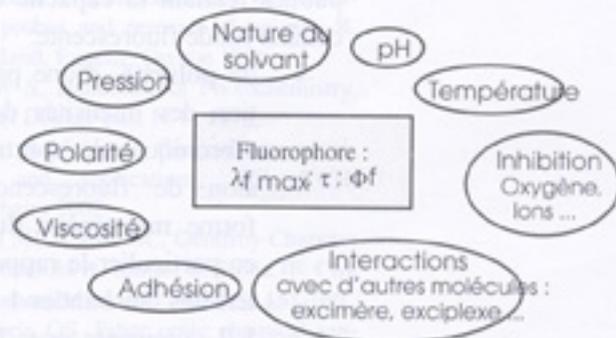


Fig. 8 – Rappel des principaux paramètres d'influence des caractéristiques de l'émission de fluorescence

Si cette dépendance est connue, il est alors possible en retour d'utiliser les traceurs fluorescents pour déterminer certaines propriétés d'un milieu donné.

### 6.2. Des sondes fluorescentes pour tester la polarité et/ou la viscosité

A l'appui de cette notion de capteurs photophysiques, nous allons ci-

ter plus particulièrement des exemples de nos propres recherches où le pyrène et/ou des rotors moléculaires ont été utilisés comme sondes de polarité et/ou de viscosité. Les exemples cités ont aussi comme buts de mettre l'accent sur les potentialités de la fluorescence pour des applications en biosciences.

Pour une description plus complète, le lecteur pourra se référer à l'ouvrage de Valeur, 2002.

#### a) Le pyrène

De nombreux travaux ont déjà été publiés relatant la capacité du pyrène comme sonde fluorescente:

- de **polarité**, d'une part: variation des intensités des bandes vibroniques du spectre d'émission de fluorescence de la forme **monomère du pyrène**, en particulier le rapport des intensités des bandes 1 et 3 notée  $I_1/I_3$  augmente avec la polarité de l'environnement (Dong et Winnik, 1984);
- de **viscosité**, d'autre part: variation des intensités de fluorescence pour respectivement les formes monomère ( $I_{mon}$ ) et excimère ( $I_{ex}$ ) du pyrène avec la viscosité du milieu (la notion de viscosité à l'échelle locale étant assez complexe, on parlera aussi en termes de diffusion, diffusivité, cohésion, volume libre, microviscosité...), ainsi le rapport  $I_{ex}/I_{mon}$  diminue avec l'augmentation de la viscosité (à concentration constante en pyrène) (Birks, 1970).

Pour se référer à nos propres études, nous citerons d'une part, l'utilisation du pyrène comme sonde de polarité pour détecter la formation de microdomaines hydrophobes lors de l'agrégation de polymères cationiques amphiphiles (Damas et al., 1997) et d'autre part, comme sonde de viscosité pour suivre l'avancement de la polymérisation du MMA en PMMA (Carré et al., 1998).

Ces deux séries d'études montrent la capacité du pyrène pour suivre l'organisation des molécules amphiphiles (tensioactifs, lipides...) en systèmes moléculaires organisés (SMO: micelles, liposomes, membranes biologiques...) et détecter les changements de phases et d'autre part à tester les changements d'ordre moléculaire (polymérisations, rigidification de milieux complexes...).

#### b) Les rotors moléculaires

Les rotors moléculaires sont généralement des composés de type donneur-accepteur, capables d'un transfert de charge à l'état excité (sensible à la polarité du solvant) et qui peuvent selon l'environnement subir une(des) rotation(s) interne(s) conduisant à des processus de désactivation non radiatifs (sensible à l'ordre moléculaire).

Dans la plupart des applications, les rotors moléculaires seront utilisés comme sondes fluorescentes:

- de **polarité**: une augmentation de la polarité se traduit par une augmentation de la longueur d'onde d'émission,  $\lambda_{f,max}$ .
- de **viscosité**: une augmentation de la viscosité (i.e., cohésion,

ordre local...) se traduit par une augmentation de l'efficacité de fluorescence,  $\Phi_f$ .

Nous avons largement développé l'utilisation des rotors moléculaires comme sondes fluorescentes dans nos propres travaux, d'une part en synthétisant de nombreux composés de type benzène, benzylidène, cinnamylidène, coumarine..., et d'autre part en mettant à profit leurs propriétés de fluorescence pour étudier des polymères (Carré et al., 1998; Frochot et al., 2000), des micelles (Damas et al., 2001) ou des milieux biologiques (Viriot et al., 1998).

## 7. REFERENCES

- Birks JB. *Photophysics of aromatic molecules*, Wiley, London 1970.
- Calvert JG, Pitts JN Jr. *Photochemistry*, John Wiley & Sons Inc., N.Y. 1966.
- Carré MC, Dorion C, Rebizak R, Pla F, Brembilla A, Viriot ML. *Macromol Symp* 1998; 127: 173-180.
- Damas C, Adibnejad M, Benjelloun A, Brembilla A, Carré MC, Viriot ML, Lochon P. *Colloid Polymer Sci* 1997; 275: 364-371.
- Damas C, Frochot C, Naejus R, Brembilla A, Viriot ML, Coudert R. *J Colloid Interface Sci* 2001; 241: 188-198.
- Dong DC, Winnik MA. *Can J Chem* 1984; 62: 2560-2565.
- Dumas D, Viriot ML, Stoltz JF. *Récents Progrès en Génie des Procédés (Visualisation, Image, Modélisation)*, Tech. Doc. Lavoisier, Cachan 2001; vol. 15 (78): 111-120.
- Frochot C, Muller C, Brembilla A, Carré MC, Lochon P, Viriot ML. *Int J Polym Anal Charact* 2000; 6: 109-122.
- Guilbault G. *Practical fluorescence*, Marcel Dekker, New York 1973 (1<sup>st</sup> edn), 1990 (2<sup>nd</sup> edn).
- Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers; N.Y. 1999 (2<sup>nd</sup> edn).
- Lewis GN, Kasha M. *J Am Chem Soc* 1945; 67: 994.
- *Molecular Probes. Handbook of fluorescent probes and research chemicals*, R. Haugland, Eugene, Oregon 1996.
- Murov S. *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker Inc., N.Y. 1973.
- Valeur B. *Molecular fluorescence, principles and applications*, Wiley-VCH, Weinheim 2002.
- Viriot ML, Carré MC, Geoffroy-Chapotot C, Brembilla A, Muller S, Stoltz JF. *Clin Hemorheol Microcirc* 1998; 19: 151-160.
- Wolfbeis OS. *Fiber optic chemical sensors and biosensors*, Vol. I et II, CRC Press, Boca Raton 1991.