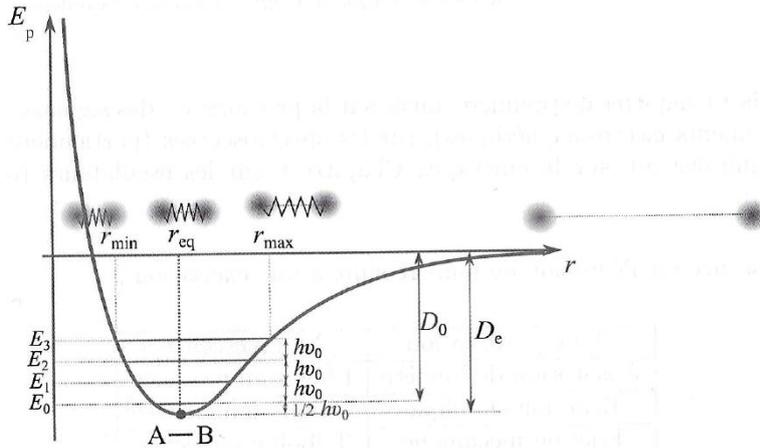


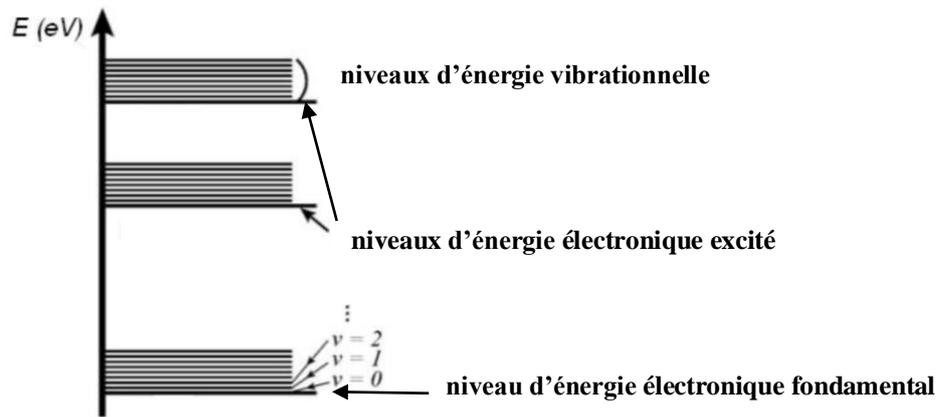
I. Absorption et émission de photons

1. Niveaux d'énergie électronique et vibrationnelle d'une molécule

- **Rappel : Modèle quantique de l'oscillateur anharmonique (cas d'une molécule diatomique)**
 - La mécanique quantique montre que seuls certains niveaux d'énergies sont accessibles par l'oscillateur moléculaire : ce sont les niveaux d'énergie vibrationnelle.
 - Les énergies vibrationnelles de la molécule obéissent alors à la relation : $E_n = (n + \frac{1}{2}) h\nu_0$ avec n entier positif ou nul

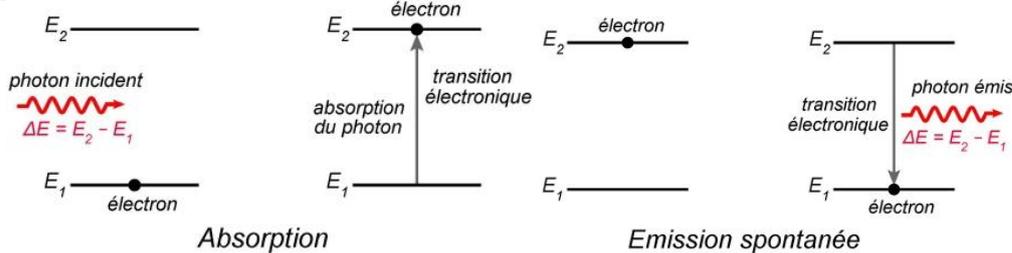


- Représentation schématique des niveaux d'énergie électronique et vibrationnelle d'une molécule



2. Transition entre les niveaux d'énergie électronique et vibrationnelle d'une molécule

- **Rappel pour un atome**



Soient deux niveaux énergétiques E_1 et E_2 d'un atome. L'absorption d'un photon de fréquence ν et d'énergie $h\nu = E_2 - E_1$ provoque le passage d'un électron d'un niveau énergétique inférieur E_1 à un niveau supérieur E_2 . On a la relation : $E_2 - E_1 = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$. L'émission d'un photon de fréquence ν , de longueur d'onde λ dans le vide et provient du passage d'un électron d'un niveau énergétique supérieur E_2 à un niveau inférieur E_1 .

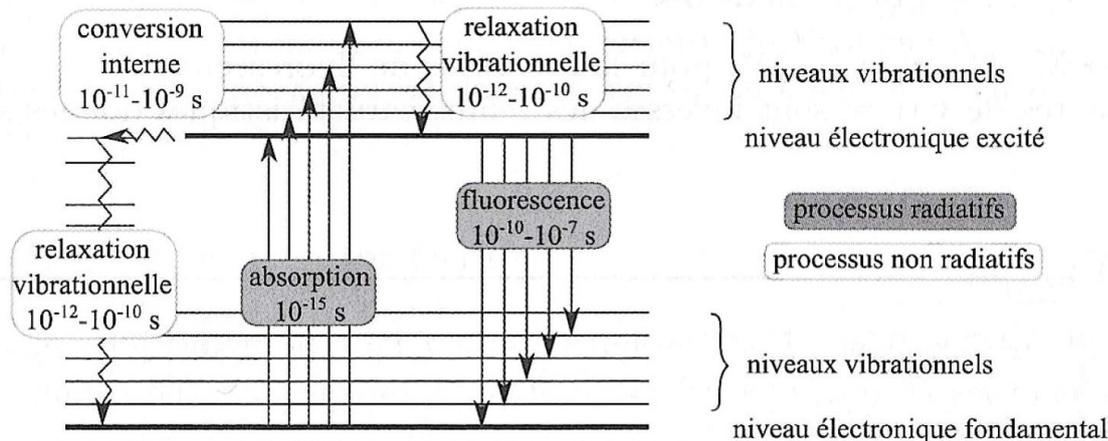
- **Cas d'une molécule**

Le domaine utilisé de la radiation λ dans le vide pour une transition

- entre deux niveaux d'énergie vibrationnelle d'une molécule (pour un même niveau d'énergie électronique) est celui de l'infra-rouge : $2,5 \mu m < \lambda < 20 \mu m$
- entre deux niveaux d'énergie électronique est celui de l'UV-visible : $190 nm < \lambda < 800 nm$

II. Phénomène de fluorescence

1. Origine : desexcitation radiative et non radiative



- Suite à l'absorption **radiative** d'un photon, la molécule initialement à l'état électronique fondamental atteint un niveau électronique excité. Elle subit alors une desexcitation (relaxation vibrationnelle) **non radiative** ($\sim 10^{-13} - 10^{-11} \text{ s}$) jusqu'à l'état vibrationnel fondamental de l'état électronique excité, avant de subir une desexcitation **radiative** et d'émettre un photon pour retomber à l'état électronique fondamental : c'est le **phénomène de fluorescence**. Le retour à l'état électronique fondamental peut aussi se faire par des processus **non radiatifs** (conversion interne puis relaxation vibrationnelle).
- **Durée de vie de l'état excité** $\sim 10^{-10} - 10^{-7} \text{ s}$

- La lumière est émise par fluorescence à une plus grande longueur d'onde que celle absorbée :

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} : \Delta E \searrow \Rightarrow \lambda \nearrow$$

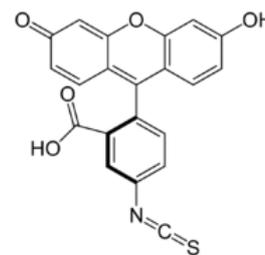
2. Caractéristiques

- Espèce chimique fluorophore

Espèce chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.

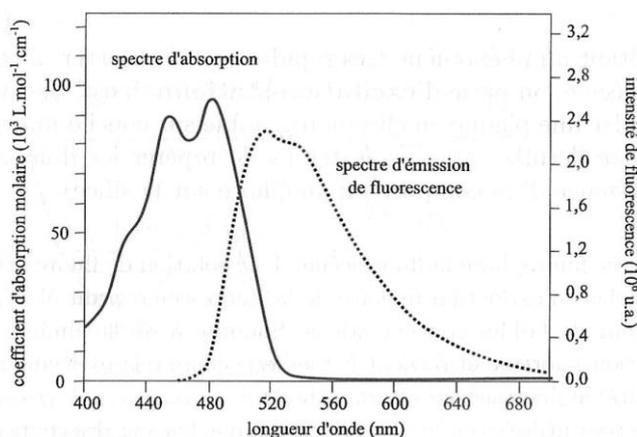
Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore des molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons π .

Exemple du FITC (utilisé en tant que marqueur biologique)



- Déplacement de Stokes :

Le **déplacement de Stokes** correspond à la différence en longueur d'onde entre les pics d'absorption et d'émission (pour la même transition électronique) : $\lambda_{max,flu} - \lambda_{max,abs}$.



- **Intensité de fluorescence**

Rappel : l'intensité d'absorbance I_{abs} est la quantité de matière (en mol) de photons absorbé par unité de temps et par unité de volume

L'intensité de fluorescence I_f est la quantité de matière (en mol) de photons émis par unité de temps et par unité de volume

- **Coefficient d'absorption molaire et rendement quantique de fluorescence**

- Rendement quantique de fluorescence moléculaire Φ_f

$$\Phi_f = \frac{\text{nombre de photons émis par fluorescence}}{\text{nombre de photons absorbés}} = \frac{I_f}{I_{abs}}$$

- $0 \leq \Phi_f \leq 1$

→ des molécules très fluorescentes comme le FITC, ont des rendements quantiques proches de 1.

- Efficacité de la fluorescence = brillance :

$$B = \varepsilon \times \Phi_f$$

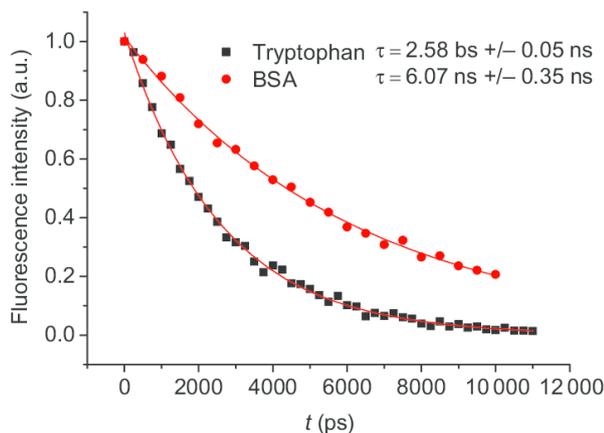
→ plus la brillance est élevée, plus l'intensité de fluorescence sera élevée.

- **Constante de vie radiative**

- constante de vie radiative = **durée de vie de l'état excité**.

- La durée de vie de l'état excité peut être estimée à partir du **déclin de la fluorescence**, une fois l'excitation stoppée.

Exemples du tryptophane et de la protéine BSA (bovine serum albumine) :



3. Applications

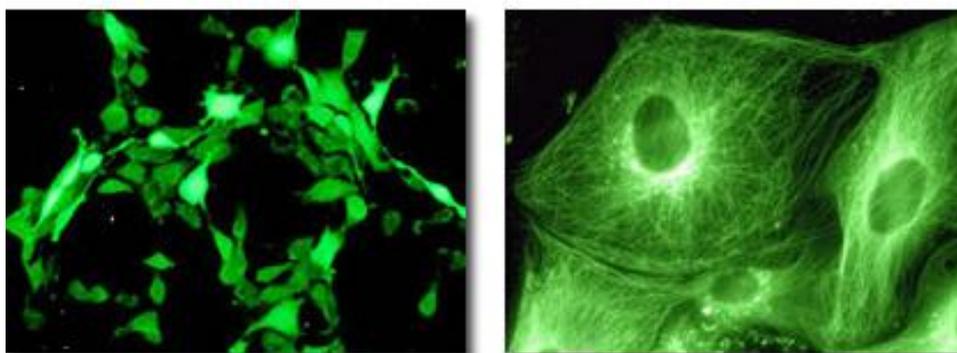
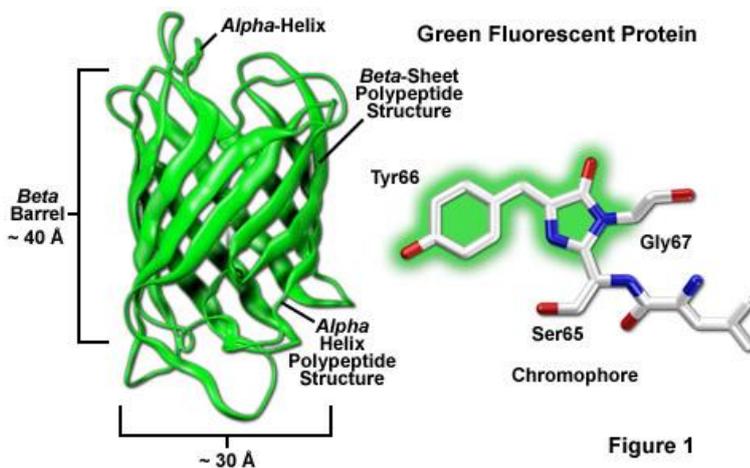
a. **Révélation UV en CCM**

- Usuellement un agent de fluorescence est incorporé dans la phase stationnaire, généralement du silicate de zinc activé au manganèse, dont le maximum d'absorption est à 254 nm.
- La fluorescence est émise dans le vert ce qui donne la couleur verte à la plaque sous la lampe UV.
- Si le composé déposé sur la plaque absorbe le rayonnement UV, cela diminue la fluorescence. Les composés sont alors révélés sous forme de tâches sombres car provoquant localement une extinction de la fluorescence.

b. **Imagerie en biologie cellulaire : exemple de la GFP**

- La protéine fluorescente verte (GFP : « Green Fluorescent Protein ») est une protéine ayant la propriété d'émettre une fluorescence de couleur verte. Elle possède en effet un pic d'excitation à une longueur d'onde de 395 nm (bleu). Excitée à cette longueur d'onde, elle réémet la lumière dans le vert à une longueur d'onde de 498 nm.

- Le gène codant la protéine GFP est incorporé dans le génome de l'organisme, dans la région du gène qui code la protéine d'intérêt, et qui sera ainsi contrôlée par la même séquence régulatrice. Dans les cellules où le gène sera exprimé, et la protéine d'intérêt produite, la GFP sera synthétisée au même moment. Ainsi, ces cellules deviendront fluorescentes pendant que celles n'exprimant pas le gène d'intérêt resteront inertes sous la lumière de la microscopie à fluorescence.



c. Détection explosifs

- Explosifs ciblés :** RDX, HMX, PETN
- Fluorophore :** DCM dont le pic d'absorption est dans le bleu (480nm) et celui d'émission de fluorescence est dans le rouge (620 nm)
- Principe :** en présence d'UV (254 nm), les explosifs subissent une photolyse et produisent l'ion NO_2^+ et le radical $\text{NO}_2\cdot$. Ces derniers sont capturés par le DCM pour former le DCM- NO_2 qui n'est plus fluorescent. L'absence de fluorescence permet alors de détecter la présence d'explosifs.

