

Cour 07 Techniques d'analyses des métabolites (chromatographie, spectrométrie et fluorescence moléculaire)

Métabolisme = réaction

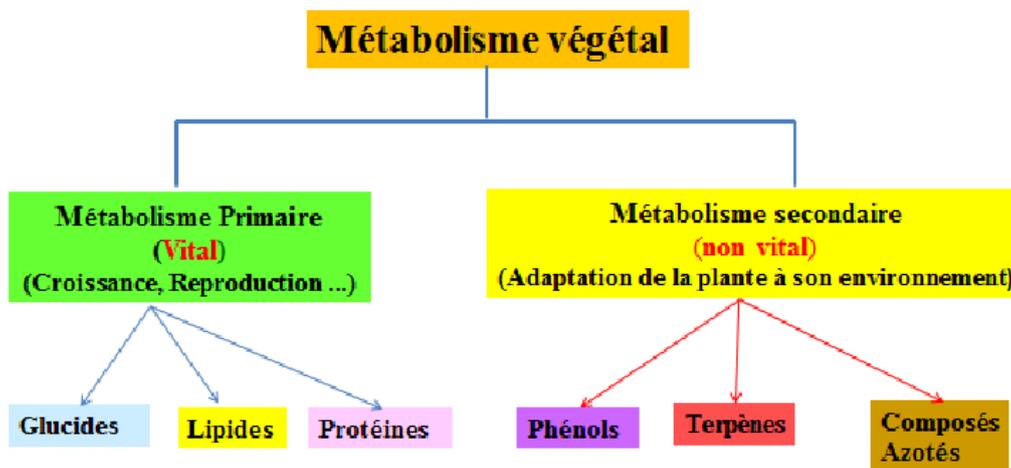
Métabolite = molécule

Un métabolite est un composé organique intermédiaire ou issu du métabolisme.

Le métabolisme est l'ensemble des réactions biochimiques qui se déroulent au sein de la cellule et qui conduisent à la synthèse des molécules nommées métabolites.

Chez les végétaux, on distingue deux classes de métabolismes/métabolites :

- * Métabolisme primaire, qui produit des métabolites primaires
- * Métabolisme secondaire, qui produit des métabolites secondaires



Que trouve-t-on dans les plantes ?

Tous les êtres vivants (les plantes y compris) ont un métabolisme primaire, qui fournit les molécules de base : Glucides, Lipides et Protéines.

Chez les plantes, il existe un métabolisme secondaire (c'est une spécificité du monde végétal).

Les molécules produites par ce métabolisme secondaire ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante. Ces produits à structure chimique souvent complexe sont très différents selon les espèces et c'est seulement à partir de la seconde moitié du XXe siècle, qu'il y a eu une explosion des recherches dans ce domaine, grâce à l'évolution du matériel d'analyse devenu très sophistiqué, comme les différents types de chromatographies, la résonance magnétique, la spectrographie de masse, la spectrophotométrie, etc...

Il existe sans doute plus de 200000 métabolites secondaires classés selon leurs appartenances chimiques (composés acétyléniques, mycotoxines, composés phénoliques, terpènes, alcaloïdes, amines et polyamines, glycosides cyanogéniques, glucosinolates, etc...).

Le métabolisme secondaire des plantes, aussi appelé métabolisme spécialisé, fait référence à la synthèse et l'identification d'un ensemble de biomolécules de structures et de fonctions variées qui interviennent dans l'interaction des plantes avec leur environnement biotique et abiotique.

Le métabolisme secondaire des plantes regroupe un ensemble de molécules de structures et de fonctions très diverses dont la synthèse, l'accumulation ou l'émission permet à la plante d'interagir avec son environnement.

Des composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. On les appelle donc des métabolites secondaires.

Les métabolites secondaires, qu'est-ce que c'est ?

Les métabolites secondaires sont des composés phyto-chimiques non directement impliqués dans les processus vitaux de bases (croissance, la division cellulaire, la respiration, la photosynthèse, reproduction), contrairement aux métabolites primaires.

Mais pourquoi les plantes fabriquent-elles des métabolites secondaires ?

Les métabolites secondaires sont impliqués dans le processus de survie de l'espèce végétale :

- dans une stratégie de protection contre les prédateurs, par exemple des odeurs qui repoussent les herbivores, par une toxicité que les animaux reconnaissent et les dissuade...
- dans une forte attirance des insectes pollinisateurs: certaines plantes (orchidées par exemple) synthétisent des phéromones sexuelles, substances émises pour attirer les insectes mâles et permettre plus facilement la fécondation des fleurs par le transport des pollen...
- dans une action d'inhibition de la croissance d'autres plantes... Cette science, appelée allélopathie, permet de comprendre par exemple le cas du noyer qui produit de la juglone, une substance qui inhibe la croissance des autres plantes dans un rayon de plusieurs mètres autour du tronc...

Les métabolites secondaires vont avoir des fonctions spécifiques en réponse à une adaptation à un environnement. Certains des principaux rôles pour la plante sont :

- La protection des plantes contre ravageurs et pathogènes

- L'allélopathie (compétition plante-plante)
- La symbiose plante-microbe au niveau des nodules racinaire
- l'odeur et le goût. Ils peuvent donc servir d'attractifs pour les pollinisateurs.

Pour s'adapter à leur environnement, les plantes ont développé de nombreuses stratégies. La plus complexe, la plus intrigante et peut-être la moins prospectée de ces stratégies est la synthèse d'une grande diversité de molécules dont la plupart est associée au métabolisme secondaire. La composition en métabolite secondaire est spécifique à chaque famille botanique. La capacité de synthèse de ces molécules, de structures souvent complexes, s'est acquise par le développement de voies de biosynthèse faisant appel à des cascades de réactions dont chacune est catalysée par une enzyme spécifique.

Les plantes se sont adaptées à leur environnement en développant tout un arsenal de molécules ayant des propriétés physico-chimiques intéressantes. Chaque espèce végétale dispose de son propre spectre de métabolites spécialisés. Ces molécules leur permettent de se protéger de contraintes environnementales et de se défendre contre les agressions d'insectes, d'herbivores, ou encore de microorganismes. Si ces molécules actives sont très utiles aux plantes, elles sont souvent utilisées par l'homme pour des applications dans les domaines de la pharmacologie, la cosmétique, de l'agrochimie, etc...

Ces molécules, souvent très complexes du point de vue de leur structure chimique, sont généralement synthétisées grâce à des voies de biosynthèse faisant intervenir de nombreuses étapes catalysées par des enzymes spécifiques (Cytochromes P450s, Dioxygénases, Prényltransférases, Méthyltransférases...)

Actuellement les recherches se sont accentuées sur la reproduction de ces molécules d'intérêt pour l'homme: le génie métabolique.

Pourquoi étudions-nous les métabolites secondaires ?

Les végétaux produisent des métabolites primaires qui entrent dans le fonctionnement vital de la cellule. Les plantes synthétisent également une grande quantité de composés qualifiés de «secondaires» dont toutes les fonctions n'ont pas encore été identifiées mais qui sont fondamentaux pour les plantes, notamment pour leur adaptation à leur environnement.

Des études récentes sur l'effet bénéfique de la consommation de fruits et légumes chez l'homme, ont suggéré l'implication de ces composés dans la prévention et la lutte contre

certaines maladies. Il est donc important de comprendre les conditions de synthèse et d'accumulation de ces composés, pour améliorer la composition des végétaux aussi bien pour des raisons agronomiques qu'alimentaires et préventives pour la santé humaine.

LA CHROMATOGRAPHIE

I. Définition

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes permettant de séparer les éléments (molécules, ions...) d'un mélange en solution plus ou moins complexe. Le mélange à chromatographier entraîné par une phase mobile circule au contact d'une phase stationnaire liquide ou solide. Des interactions physiques ou chimiques s'établissent entre la phase stationnaire qui possède une très grande surface de contact, et les molécules à séparer. Des échanges rapides et réversibles se produisent dont la force dépend de la nature chimique des molécules à séparer. Celles-ci sont plus ou moins retenues selon l'importance de leur interaction avec la phase stationnaire. Les molécules sont alors entraînées plus ou moins vite en fonction de leurs propriétés physicochimiques, ce qui peut être effectuée dans un but analytique quantitatif ou qualitatif ou dans un but préparatif.

II. Nature des phases

II.1. Phase stationnaire "fixe"

Est une phase qui reste en place, soit dans une colonne, soit sur une surface plane. La phase stationnaire peut être solide ou liquide. Les solides : silice ou alumine traitées permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (chromatographie sur couche mince CCM). La phase fixe peut aussi être constituée par un liquide imprégnant un support solide ou encore par une chaîne carbonée fixée sur un support (phase greffée).

Ainsi en chromatographie sur papier, la phase fixe est formée par l'eau que les molécules de cellulose du papier absorbent, alors qu'en chromatographie en phase gazeuse, elle est constituée d'un liquide peu volatil et thermiquement stable imprégnant un granule poreux.

II.2. Phase mobile

Est une phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant l'analyte avec elle.

-Soit un gaz : (ex ; chromatographie en phase gazeuse) : la phase mobile est appelée gaz vecteur ou gaz porteur.

- Soit un liquide : (ex : chromatographie sur papier, couche mince ou colonne) : la phase mobile est appelée éluant.

III. Classification des techniques chromatographiques

Les techniques chromatographiques peuvent être classées en trois modalités.

III.1. Classification selon la nature des phases

La phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz

La phase stationnaire soit un solide, soit un liquide.

La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- Chromatographie liquide-solide (LSC).
- Chromatographie liquide-liquide (LLC).
- Chromatographie gaz-solide (GSC ou GC).
- Chromatographie gaz-liquide (GLC ou GC).

III.2. Classification selon le mécanisme de séparation

Les techniques chromatographiques peuvent être classées selon le mécanisme de séparation qu'elles mettent en jeu et les propriétés de la phase stationnaire, on distingue ainsi

- Chromatographie de partage
- Chromatographie d'adsorption
- Chromatographie ionique
- Chromatographie d'affinité
- Chromatographie d'exclusion
- Chromatographie liquide-solide (LSC).
- Chromatographie liquide-liquide (LLC).
- Chromatographie gaz-solide (GSC ou GC).

□ Chromatographie gaz-liquide (GLC ou GC).

Selon le support de la phase stationnaire, on distinguera

•**Chromatographie sur colonne** (regroupant notamment la chromatographie à haute performance HPLC et la chromatographie en phase gazeuse CPG) : la phase stationnaire est dans un tube étroit et **la phase mobile progresse par gravité ou différence de pression.**

•**Chromatographie planaire** (qui regroupe la chromatographie sur couche mince CCM et la chromatographie sur papier) : la phase stationnaire est sur la surface d'un support plat (CCM) ou dans une feuille de cellulose poreuse (chromatographie sur papier) et la phase mobile se déplace par capillarité ou par gravité.

Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera :

•**La chromatographie par développement** : les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire.

•**La chromatographie d'élution** : les substances sont entraînées hors de la phase mobile

III.2.1. Chromatographie d'adsorption

La phase stationnaire est un milieu solide perméable sur lequel les molécules adhèrent par un double effet de physisorption et de chimisorption. Le paramètre physico-chimique concerné est le coefficient d'adsorption. Les phases stationnaires utilisent le carbonate de calcium, alumine, gel de silice ou l'inuline (un polymère en poudre très fine du sucre ordinaire).

III.2.2. Chromatographie de partage

Elle utilise la différence de solubilité des molécules entre deux phases mobiles et stationnaire non miscibles. Elle est mise en pratique en chromatographie sur papier. Un des fluides est un liquide retenu sur un support inerte et constitue la phase stationnaire. L'autre, liquide ou gaz en déplacement, constitue la phase mobile. Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents. Les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que ceux qui le sont moins.

III.2.3. Chromatographie ionique

La phase stationnaire solide comporte en surface des sites ioniques et la phase mobile est une solution-tampon aqueuse. La séparation met en jeu des échanges entre les ions de l'échantillon

avec ceux de la phase stationnaire. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique.

III.2.4. Chromatographie d'exclusion

La phase stationnaire est un matériau comportant des pores dont les dimensions sont choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise ainsi une sorte de perméation sélective à l'échelle moléculaire. Selon la nature, aqueuse ou organique de la phase mobile, cette technique est désignée par filtration sur gel ou perméation de gel. Le coefficient de distribution prend le nom de coefficient de diffusion.

III.2.5. Chromatographie d'affinité

Elle est basée sur des interactions spécifiques et réversibles entre des composés spécifiques (ligands), lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase fixe et son partenaire d'affinité en solution (substance à analyser ou affinant). Le ligand est fixé sur une matrice (résine) directement ou indirectement à l'aide d'un bras fixateur (espaceur). Dans le complexe de nature biologique, dont la formation est à la base de la chromatographie d'affinité, l'un des partenaires au moins est une protéine ; cette protéine peut constituer le ligand fixe ou le partenaire d'affinité en solution.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) (gas chromatography, GC, en anglais) est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles, appelées ici « analytes ». Cette technique a été développée par A.J.P MARTIN et R.L.M. SYNGE, récipiendaires du Prix Nobel de chimie 1952 pour l'invention de la chromatographie de partage.

Elle est utilisée dans des domaines très variés, tels que la parfumerie, l'œnologie, l'industrie pétrolière, la biologie, la chimie fine et l'industrie des matières plastiques.

Principe physico-chimique

La CPG repose sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse. La séparation des analytes repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire.

Le mélange à analyser est vaporisé puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte, appelé « gaz vecteur », qui constitue la phase mobile.

Le partage est un équilibre dynamique entre l'analyte A dans la phase stationnaire A(phase stationnaire) et le même analyte dans la phase mobile A(phase mobile): $A(\text{phase stationnaire}) \rightleftharpoons A(\text{phase mobile})$.

Le coefficient de partage K est la constante d'équilibre associée à cet équilibre.

Plus la molécule a d'affinité pour la phase stationnaire, moins elle est entraînée par le gaz vecteur et donc plus elle est retenue sur la colonne. Ainsi, sur colonne polaire, les analytes apolaires sortent en premier, alors que sur colonne apolaire, les analytes polaires sortent en premier.

Par ailleurs, plus la température est haute, plus on déplace l'équilibre de partage vers A(phase mobile), et donc plus l'analyte A est entraîné par le gaz vecteur.

Si les analytes d'un échantillon ont des coefficients de partage différents, alors, tous les autres paramètres étant identiques (débit du gaz vecteur, température), leurs durées de parcours dans la colonne seront différentes.

Ainsi, les analytes se séparent puis sortent de la colonne les uns après les autres.

La durée entre la date d'injection et celle de sortie de colonne d'un analyte A est son « temps de rétention ».

Appareillage

L'appareil utilisé pour réaliser une analyse par chromatographie en phase vapeur est appelé chromatographe. Il comporte plusieurs éléments, comme indiqué sur le schéma ci-dessous :

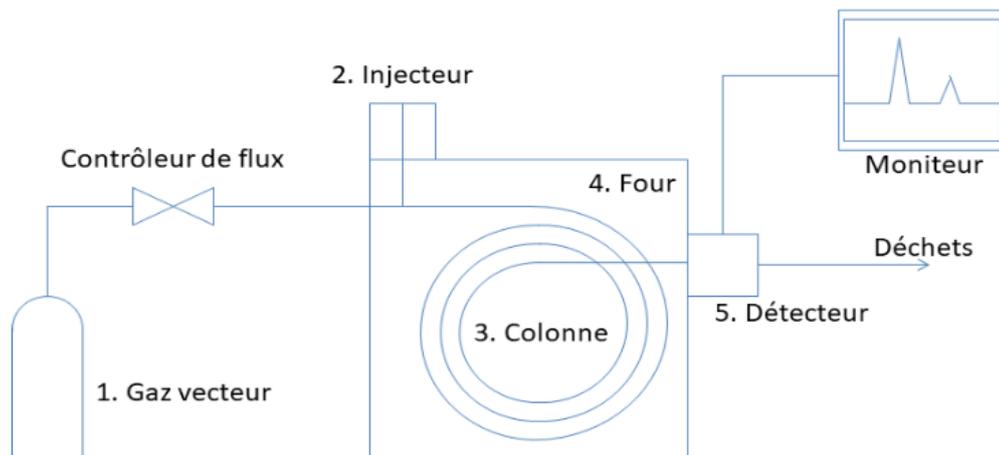


Figure 2 : Schéma d'un chromatographe

1. Le gaz vecteur (phase mobile)

Le gaz vecteur est le gaz qui circule à l'intérieur du chromatographe, entraînant les analytes à travers la colonne, depuis l'injecteur jusqu'au détecteur. Son choix dépend du type de détecteur utilisé ; cela peut être par exemple de l'hélium, de l'azote, de l'argon ou de l'hydrogène.

Le débit de ce gaz vecteur est de l'ordre de 30 à 40 mL/min pour les colonnes remplies et de 0,2 à 2 mL/min pour les colonnes capillaires.

2. Le système d'injection

Ce système permet à la fois l'introduction de l'échantillon dans la colonne du chromatographe, ainsi que la volatilisation des analytes. La température de l'injecteur doit être réglée de manière à entraîner la vaporisation de tous les analytes de l'échantillon : elle est généralement maintenue à 50°C au-dessus de la température d'ébullition de l'analyte le moins volatil.

L'introduction se fait à l'aide d'une microsiringue (le volume à injecter est généralement voisin de 1 μL) à travers un septum (qui assure l'étanchéité) dans un liner (typiquement un tube de verre rempli d'un petit morceau de coton).

Si l'échantillon contient des espèces non-volatiles, celles-ci sont retenues sur le coton et donc non-injectées dans la colonne, ce qui permet de la protéger. Les espèces volatiles sont vaporisées et entraînées par le gaz vecteur vers la tête de la colonne.

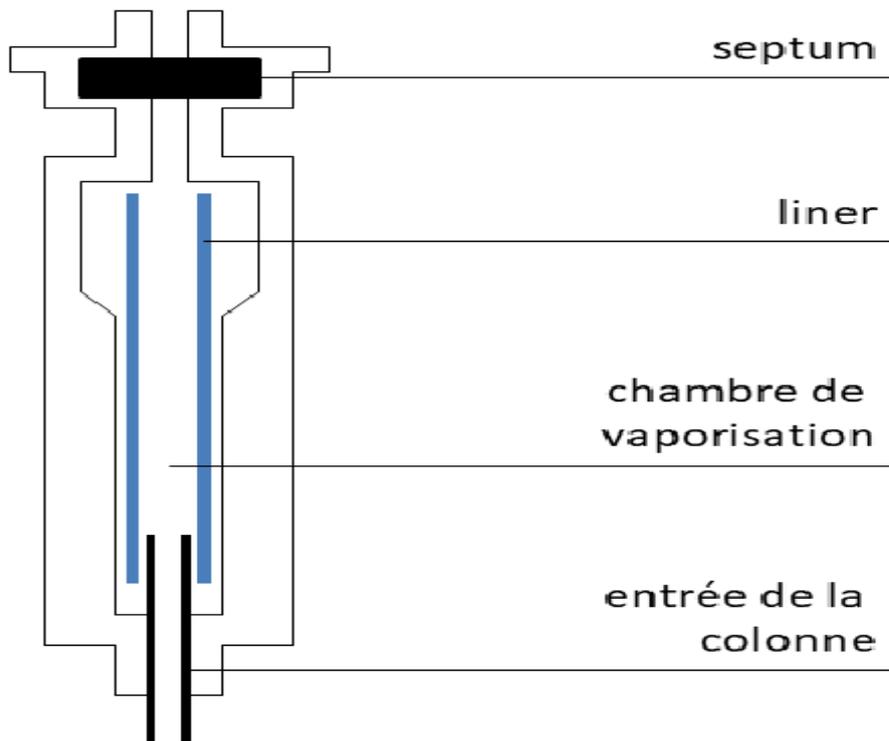


Figure : Schéma d'un injecteur

Certains injecteurs peuvent être munis d'une fonction « Split/Splitless ». La fonction « split » permet de ne pas injecter la totalité de l'échantillon ; cela peut être utile dans le cas d'échantillon en solution concentrée, pour éviter de surcharger la colonne.

La colonne (phase stationnaire)

Il existe deux types de colonnes : les colonnes remplies et les colonnes capillaires. Les colonnes remplies ont un diamètre de quelques millimètres et une longueur de l'ordre du mètre. Elles sont remplies de granules de support inerte, généralement de la silice, dont la surface est imprégnée ou greffée avec la phase stationnaire. Elles sont aujourd'hui supplantées par les colonnes capillaires, dont le pouvoir de résolution est bien supérieur.

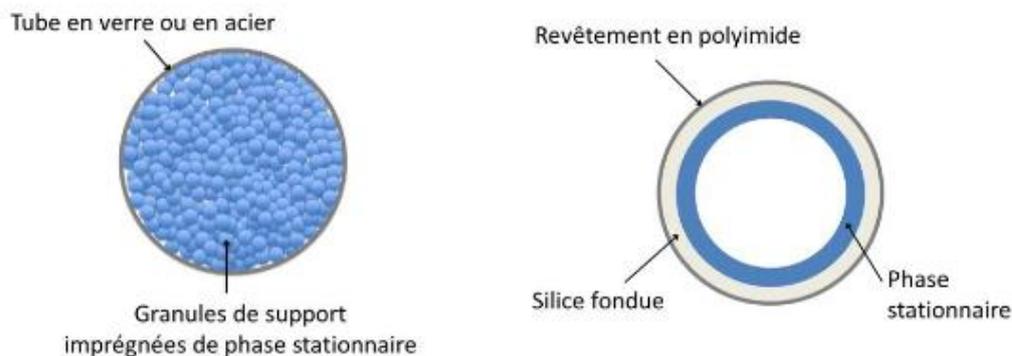


Figure : Schéma (en coupe) d'une colonne remplie (à gauche) et d'une colonne capillaire (à droite)

Les colonnes capillaires sont de simples tubes d'acier inoxydable, de verre ou de silice fondue (matériau inerte vis-à-vis de la phase stationnaire et des échantillons) de diamètre intérieur compris entre 0,1 et 0,5 mm, et d'une longueur typique de plusieurs dizaines de mètres, pouvant aller jusqu'à 100 m.

Pour tenir dans l'appareil, la colonne est enroulée, avec des spirales ayant 10 à 30 cm de diamètre. La surface interne de ce tube est recouverte d'un film de 0,1 à 5 μm d'épaisseur constitué de la phase stationnaire. Ce film est mis en place par greffage ou simple déposition, le greffage étant généralement préféré pour des raisons de stabilité thermique. Par exemple, la Carbowax® est une colonne capillaire comportant un film polaire de polyéthylène glycol greffé en surface, film qui constitue la phase stationnaire. La SE-30® est une colonne capillaire apolaire comportant un film de polydiméthylsiloxane qui constitue la phase stationnaire.

4. Le four

La colonne est contenue dans un four de type chaleur tournante, dont la température est précisément ajustable (typiquement entre 20 °C et 350 °C) et programmable. Les températures utilisables en pratique dépendent des domaines de stabilité en température de la colonne utilisée, et de ceux des composés analysés.

Plus la température du four (et donc de la colonne) est élevée, plus les analytes se déplacent rapidement dans la colonne, mais moins ils interagissent avec la phase stationnaire, et donc moins les analytes sont séparés. Plus la température du four est basse, meilleure est la séparation des analytes mais plus longue est l'analyse. Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré.

Une méthode pour laquelle la température est gardée constante tout au long de l'analyse est appelée « isotherme ». A l'inverse, on peut choisir d'augmenter la température du four au cours de l'analyse : cette méthode est appelée « gradient ».

D'une manière générale, une méthode isotherme tend à donner des pics larges pour les espèces les plus retenues, et donc une moins bonne séparation. Ce phénomène est partiellement dû à la diffusion : plus une espèce chimique circule longuement dans la colonne, plus elle a le temps de diffuser, élargissant ainsi le pic, et donc diminuant la hauteur des pics par la même occasion.

5. Le détecteur

En sortie de colonne, les analytes rencontrent le détecteur, aujourd'hui généralement couplé à un enregistreur numérique du signal qui permet son traitement. Cet élément mesure en continu une grandeur proportionnelle à la quantité des différents analytes. Il en existe de nombreux modèles, dont

- **Le FID** (en anglais flame ionisation detector, en français détecteur à ionisation de flamme), qui est le plus utilisé. La sortie de colonne traverse une flamme maintenue à une tension d'une centaine de volts. La pyrolyse ionise les composants, provoquant l'apparition d'un courant électrique entre les électrodes, ensuite amplifié. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs azote, hélium et hydrogène
- **Le TCD** (en anglais thermal conductivity detector, en français détecteur à conductivité thermique), ou catharomètre. La sortie de colonne arrive sur l'une des résistances d'un pont de Wheatstone ; le passage de composants fait varier la tension aux bornes du pont. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs hélium et hydrogène.
- **Le MS** (en anglais mass spectrometer, en français spectromètre de masse), généralement en mode EI (electron ionisation) ou CI (chemical ionisation), qui provoque l'ionisation des molécules organiques éluées et analyse ces ions. Ce couplage GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) permet, au-delà de la simple détection de présence d'espèces chimiques, d'avoir des informations concernant lesdits composants. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs azote, hélium et hydrogène.

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

I. Principe de la chromatographie

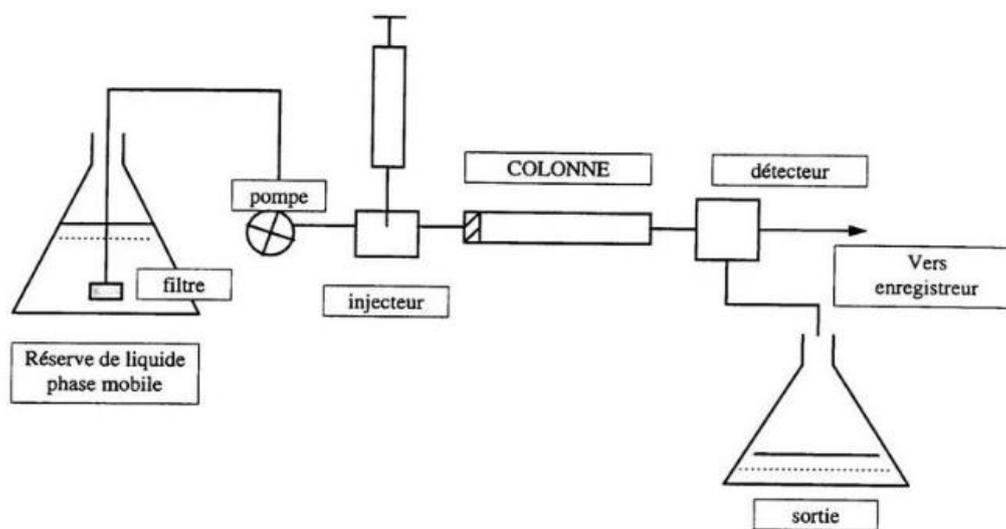
La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange même très complexe.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...).

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.



principe de fonctionnement de l'HPLC

II. Les éléments de l'HPLC

a) Un réservoir de solvant (éluant) qui contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

b) La pompe : elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min.

c) Vanne d'injection : c'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utiliserons une boucle de 20 μl . Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

d) La colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au-delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

e) La phase stationnaire

- La phase normale : est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

- La phase inverse : est majoritairement composée de silices greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant

polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

- La phase mobile :

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;

- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés.

Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'éluion est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'éluion en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'éluion).

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile.

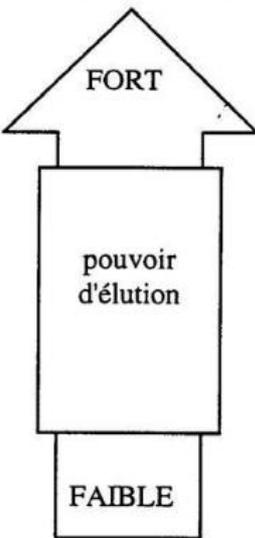
phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

Tableau : pouvoir d'élution de la phase mobile en HPLC

f) Détecteurs

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés

* détecteur UV-visible (celui que nous utilisons) : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. E opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. La lampe Deuterium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisé à la longueur d'onde non variable de 254 nm. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

- le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption ϵ soit suffisamment grand ;
- la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

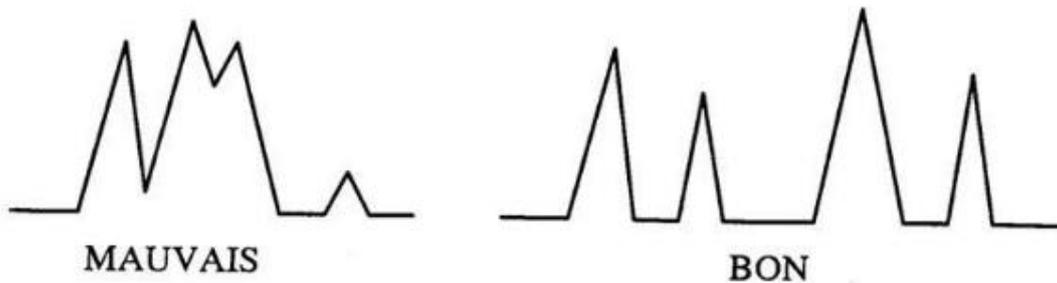
* réfractomètre : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice. Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur.

Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une station d'acquisition.

III. Application de la chromatographie à l'analyse

1. Analyse des chromatogrammes

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.



Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible.

La composition de la phase mobile est un paramètre particulier à la HPLC.

Il faut donc préciser pour chaque analyse :

- le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support...
- la nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, débit, mode de détection λ en nm.
- la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur, etc...

2. Analyse qualitative

Le temps de rétention (t_R en min) est une caractéristique de chaque soluté dans les conditions opératoires fixées.

On peut comparer le t_R de deux solutés en définissant :

- le facteur de sélectivité α entre les deux solutés
- l'efficacité d'une colonne qui est mesurée en nombre de plateau théorique
- Nombre de molécule sortant de la colonne en fonction du temps

3. Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

La spectrophotométrie

1- Définition

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

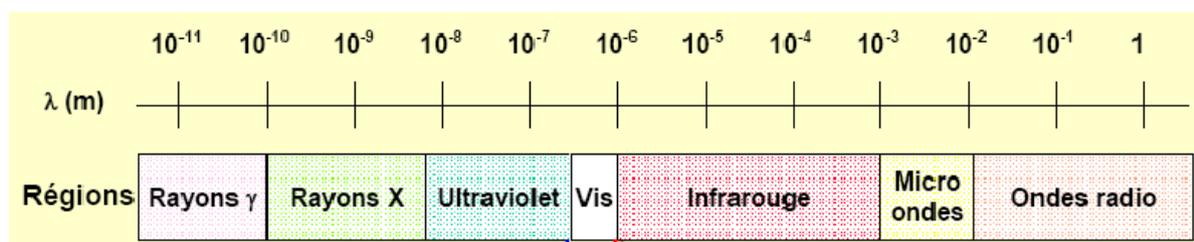
L'absorbance mesure la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse. On utilise aussi les termes densité optique, opacité ou d'extinction selon les domaines.

Les rayonnements les plus souvent utilisés sont l'ultraviolet (UV), la lumière visible et l'infrarouge (IR). Le domaine du visible et de l'UV a été abondamment étudié, et ce depuis longtemps. Mais s'il est indispensable pour une approche expérimentale de la nature de la liaison chimique, il est pauvre en information structurale. Son emploi est de plus en plus réservé à l'analyse quantitative via la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.

2- Le spectre électromagnétique

Le spectre électromagnétique est la description de l'ensemble des rayonnements électromagnétiques classés par fréquence, longueur d'onde. Le spectre électromagnétique s'étend théoriquement de zéro à l'infini en fréquence (ou en longueur d'onde), de façon continue. On le divise en plusieurs grandes classes de rayonnement, qui s'étudient par des moyens particuliers à chacune d'entre elles.



2-1- Décomposition de la lumière blanche (visible)

La lumière blanche est composée d'une infinité de couleurs, comme nous pouvons le voir au quotidien en observant un arc-en-ciel.

La lumière blanche résulte de la superposition des radiations monochromatiques de longueur d'onde dans le vide comprise entre 400 et 800 nm. C'est une radiation polychromatique (à la différence de la lumière laser, par exemple).

2-2- Le rayonnement ultraviolet (UV)

Les UV, également appelé lumière noire, parce qu'il n'est pas visible à l'œil nu, est un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde plus courte que celle de la lumière visible, mais plus longue que celle des rayons X (190 à 400 nm). Il ne peut être observé qu'indirectement, soit par fluorescence, soit à l'aide de détecteurs spécialisés.

3- Domaine UV-visible de la spectrophotométrie

La spectrophotométrie est l'étude quantitative des interactions entre la lumière et la matière.

Lorsque de la lumière traverse une substance, elle est en partie transmise et en partie absorbée.

Un soluté coloré ou chromophore absorbe la lumière visible. Certaines solutions absorbent dans l'ultraviolet. Les infrarouges ne sont pas utilisés en spectrophotométrie, car ils dépendent surtout de la température de la solution et non de sa concentration, ils sont plutôt couverts par la spectroscopie en infrarouge.

4- Principe

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'absorbance de la solution comme le logarithme décimal du rapport entre l'intensité énergétique I_0 à une longueur d'onde donnée, avant traversée du milieu, et l'intensité énergétique transmise I .

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right).$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

4-1- loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert est une relation empirique reliant l'absorption de la lumière aux propriétés des milieux qu'elle traverse. La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique. Alors, pour une solution limpide contenant une seule espèce absorbante :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l c$$

A_{λ} est l'absorbance ou la densité optique de la solution pour une longueur d'onde λ ;

c (en mol) est la concentration de l'espèce absorbante ;

l (en cm) est la longueur du trajet optique ;

ε_{λ} (en mol.cm⁻¹) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution. Ce coefficient dépend de :

- la nature de la substance
- la longueur d'onde λ de la lumière
- la nature du solvant
- la température.

La loi de Beer-Lambert est additive (mais non la transmittance).

$$A = \sum_{i=1}^n A_i(\varepsilon_{\lambda,i}, l = 1\text{cm}, c_i) = \varepsilon_{\lambda,1} c_1 + \varepsilon_{\lambda,2} c_2 + \dots + \varepsilon_{\lambda,n} c_n$$

4-2- Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert

- la lumière utilisée est monochromatique
- la concentration n'est pas trop élevée : $c \approx 10^{-2}$ mol.L⁻¹
- la solution n'est pas fluorescente : pas de réémission de lumière dans toutes les directions
- la dilution n'entraîne pas un déplacement de l'équilibre chimique :

$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (orange) + $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{HCrO}_4^-$ (incolore en milieu acide)

• la solution doit être limpide (pas de précipité ou de trouble qui entraîneraient une diffusion de la lumière).

5- Spectrophotomètre

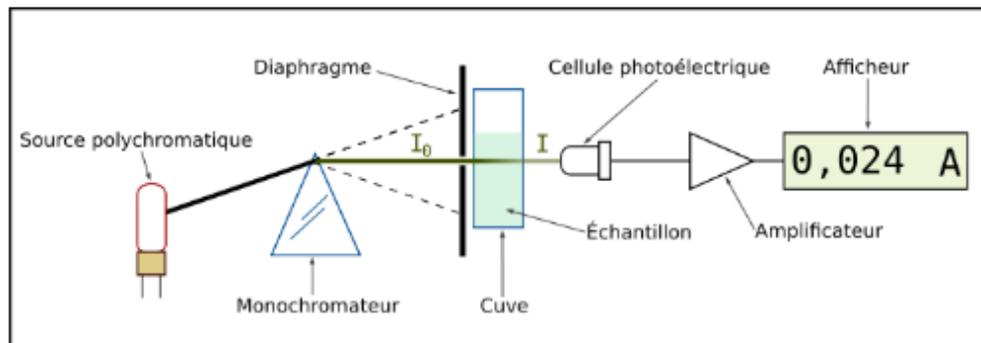


Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible mono faisceau

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

Le spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer de manière instantanée une absorbance à une longueur d'onde donnée, ou pour produire un spectre d'absorbance. Dans ce dernier cas, le dispositif monochromateur décrit en un temps court l'ensemble des longueurs d'onde comprises entre deux valeurs choisies par l'opérateur.

Un spectrophotomètre U.V./visible comprend 4 parties essentielles.

➤ La source lumineuse : elle est constituée par :

- Une lampe à décharge au deutérium utilisée dans le domaine des UV
- Une lampe à filament de tungstène pour le domaine visible
- Une lampe à décharge au xénon utilisée dans le domaine UV et visible. Ce type de lampe est très énergétique. Elle fonctionne sous forme de flash, juste au moment de faire une mesure.

➤ La cuve :

Elle contient soit l'échantillon soit la référence. La longueur de la cuve est définie (1, 2, 4 ou 5 cm de trajet optique). Elle doit être transparente aux radiations d'étude. Par exemple en UV, les cuves sont en quartz, elles ne peuvent être ni en verre ni en plastique.

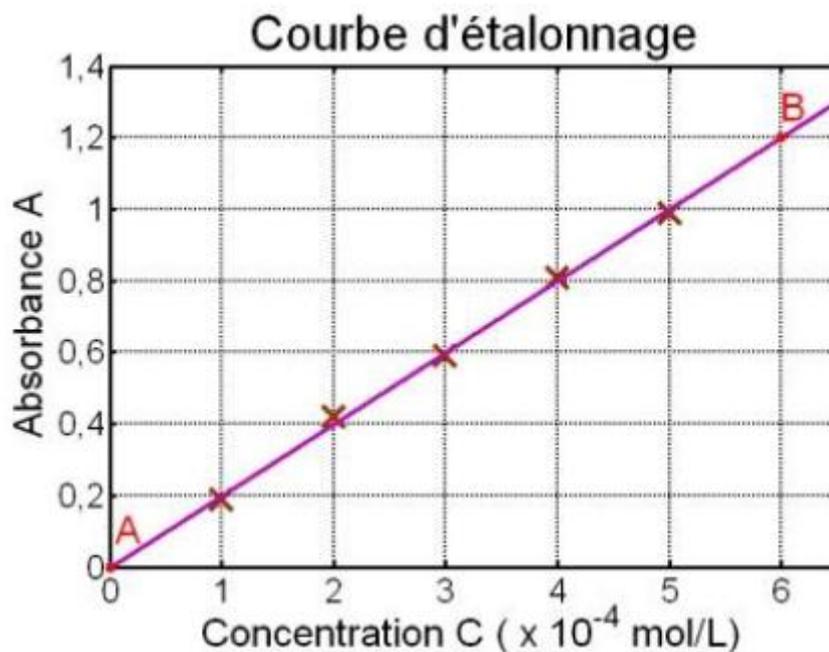
6- Applications

Détermination d'une concentration inconnue. Suivi de la cinétique d'une réaction chimique.

Colorimétrie (connaître la couleur de l'échantillon).

6-1- Détermination d'une concentration inconnue

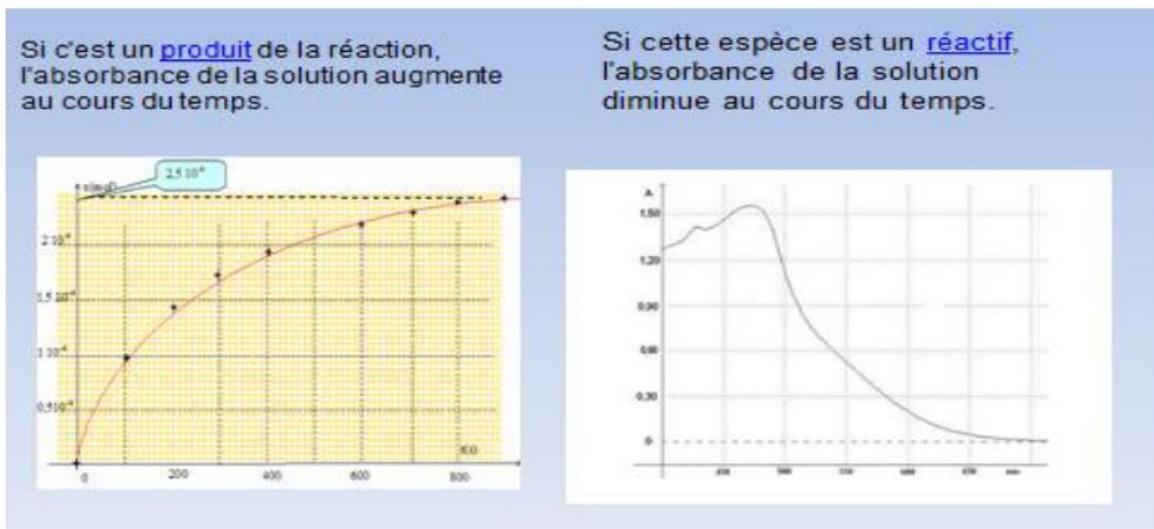
Connaissant le spectre d'absorption d'une espèce chimique, on peut mesurer, à l'une de ses longueurs d'onde λ max. Les variations de l'intensité I d'un faisceau lumineux traversant une même épaisseur l de solutions de concentrations diverses. Ceci permet d'établir expérimentalement la courbe $A = f(c)$ reliant l'absorbance et la concentration de la substance étudiée (avec $l = 1$ cm), en effectuant les mesures de A pour diverses concentrations. Cette courbe est une courbe d'étalonnage.



La courbe expérimentale d'étalonnage permet ensuite de déterminer la concentration inconnue d'une solution de cette substance par simple mesure de son absorbance et report sur le graphe $A = f(c)$.

6-2- Suivi de la cinétique d'une réaction chimique

Lorsqu'au cours d'une réaction chimique dont on veut étudier la cinétique de l'une des espèces chimique en solution, on peut par spectrophotométrie d'absorption suivre la concentration de cette espèce. Si cette espèce est un réactif, l'absorbance de la solution diminue au cours du temps. Si au contraire, c'est un produit de la réaction, l'absorbance de la solution augmente au cours du temps.



6-3- Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN

□ Détermination de la pureté :

260 nm et 280 nm sont respectivement les longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines. Le rapport de la DO à 260 nm sur la DO à 280 nm est utilisé pour s'assurer de la pureté d'ADN de tout contaminant d'ADN soit protéine ou ARN.

- Ce rapport (DO_{260}/DO_{280}) doit être compris entre 1.6 et 2 pour que l'ADN soit suffisamment pur
- Si ce rapport est supérieur à 2 ($DO_{260}/DO_{280} > 2$) cela veut dire que l'ADN est contaminé par les ARN
- Si ce rapport est inférieur à 1.6 ($DO_{260}/DO_{280} < 1.6$), cela veut dire que l'ADN est contaminé par les protéines.

□ Détermination de la concentration :

À 260 nm une unité de densité optique correspond à 50 µg / ml pour une solution d'ADN double brin. On mesure à 260 nm la DO d'une dilution d'ADN et on déduit la concentration d'ADN grâce au calcul suivant :

$$[C] (\mu\text{g} / \text{ml}) = \text{facteur de dilution} * DO_{260} * 50 \mu\text{g} / \text{ml}$$

Le facteur de dilution est égal à : Vol total / vol d'ADN

Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Elle est utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifiques : physique, astrophysique, chimie en phase gazeuse, chimie organique, dosages, biologie, médecine... le temps de détection est très rapide.

La spectrométrie de masse est d'abord une méthode d'analyse spectrale capable de fournir la masse moléculaire et des renseignements structuraux sur les molécules.

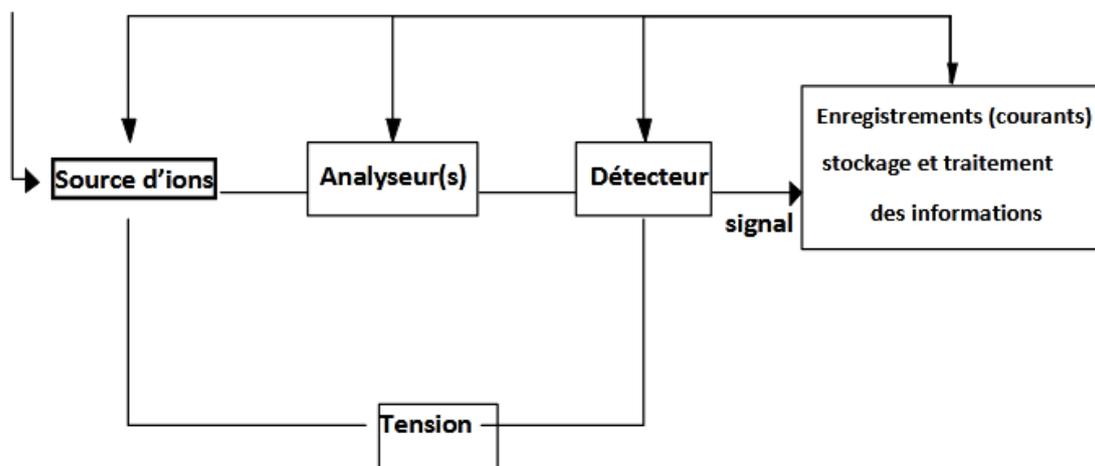
2. Structure d'un spectromètre de masse. SM

Le spectromètre de masse, comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal.

Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z , où m représente la masse et z la valence (ou m/q , q représentant la charge) des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe de ordonnées.

Les différents composants d'un spectromètre de masse. SM.

Echantillon



3. Principe d'un spectromètre de masse.

Fondamentalement, un spectromètre de masse contient 5 parties :

- Introduction de l'échantillon
- une source de production d'ions,
- un système analyseur des rapports masse sur charge (m/z),
- un détecteur,
- Un système de traitement, stockage de données (microinformatique) est associé au spectromètre pour gérer les signaux résultants de l'analyse et imposer un rétrocontrôle de l'appareil.

4. Les différents composants du spectromètre de masse SM.

Le système d'introduction de l'échantillon : l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme gazeuse, liquide (infusion directe) ou solide ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire...). La source d'ionisation : elle consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Il existe plusieurs sources d'ionisation, nous ne citerons que quelques sources d'ionisations.

- L'ionisation électronique (EI),
- l'ionisation chimique (CI)
- Le bombardement par atomes rapides (FAB),
- Electrospray ionisation ESI ou L'électronébulisation.

L'analyseur : il sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Il comporte un système comprenant un secteur magnétique couplé à un secteur électrique qui permet de terminer le temps de vol (TOF), de chaque ion.

Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.

Le détecteur et système de traitement : le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

5. Utilisation

Un spectromètre de masse permet de réaliser les fonctions suivantes :

Identification des molécules : un spectre de masse peut être caractéristique d'une molécule. Ainsi en le comparant avec le contenu de banques de spectres, il est possible d'identifier la molécule. La spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse mono-isotopique d'un ion et d'en déduire sa formule brute.

Analyse structurale : Les ions moléculaires peuvent se fragmenter dans un spectromètre de masse : dans la source d'ionisation, dans l'analyseur ou dans une cellule de collision. Comme les fragmentations respectent des lois précises, l'étude de ces fragments permet de déterminer la structure des molécules ionisées.

Quantification : Un spectromètre de masse possède un détecteur très sensible permettant de faire une quantification fiable des molécules ionisées. (Densité optique ou Intensité relative).

La source d'ionisation

Les ionisations EI et CI, qui nécessitent un certain niveau de vide, sont préférentiellement utilisées en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse (la CI fonctionnant à partir d'une source EI). En revanche, les deux sources à pression atmosphérique (electrospray et APCI) dites à « ionisation douce », sont principalement utilisées en couplage avec la chromatographie en phase liquide.

L'ionisation électronique (EI)

Source d'ionisation électronique. Des électrons émis par un filament rencontrent les molécules qui entrent dans la source : lors de la rencontre, si l'énergie cinétique des électrons est suffisante, un électron est arraché de la molécule M, la transformant en un ion radical $M^{\cdot+}$. Celui-ci peut

ensuite se fragmenter suivant son énergie interne. L'EI conduit ainsi à un spectre assez fourni, avec de nombreux fragments, très riche en informations structurales.

L'ionisation chimique (CI)

Source d'ionisation chimique. En plus du dispositif EI ci-dessus, un gaz réactif est introduit dans la source et ionisé par impact électronique. S'ensuit une série de réactions qui donne naissance à des ions pouvant réagir avec les molécules d'analyte arrivant dans la source. Ce type de réactions ions-molécules produit principalement (en mode positif) des ions $[MH]^+$, et $[M+\text{adduit}+H]^+$, permettant ainsi d'accéder à la masse moléculaire de la molécule à analyser. Le méthane, l'isobutane et l'ammoniac sont parmi les gaz d'ionisation chimique les plus utilisés.

L'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB).

Elle permet d'analyser des molécules non vaporisables sous vide (grosses molécules biologiques). L'ionisation est effectuée par expulsion en phase vapeur des ions contenus dans un échantillon liquide à la suite d'un bombardement d'atomes rapides (Ar ou Xe). Les molécules ainsi ionisées n'ont pas beaucoup d'énergie interne, la fragmentation est donc faible mais l'ion moléculaire est facilement reconnaissable et la masse moléculaire est facile à déterminer.

Electrospray ionisation (ESI) ou électronébulisation : C'est une ionisation douce. Son principe est le suivant : à pression atmosphérique, les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire porté à un potentiel élevé.

Sous l'effet du champ électrique et grâce à l'assistance éventuelle d'un courant d'air, l'effluent liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes (spray) chargées suivant le mode d'ionisation.

Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant.

En faisant varier les potentiels électriques appliqués dans la source il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes.

L'analyseur

Les analyseurs se différencient par leur principe de mesure du rapport m/z des ions.

- Ils permettent la dispersion des ions, grâce aux instruments à secteur magnétique ou électrique

- Ils permettent la séparation des ions, en fonction de la masse moléculaire et le temps de vol ou Time Of Flight (TOF) lié avec la vitesse de vol.

- Ils permettent la transmission des ions traversant un champ magnétique ou électrodynamique ;

L'analyseur à temps de vol consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré préalablement par une tension, à parcourir une distance donnée. Le rapport masse sur charge est directement mesurable à partir du temps de vol.

L'analyseur à secteur magnétique

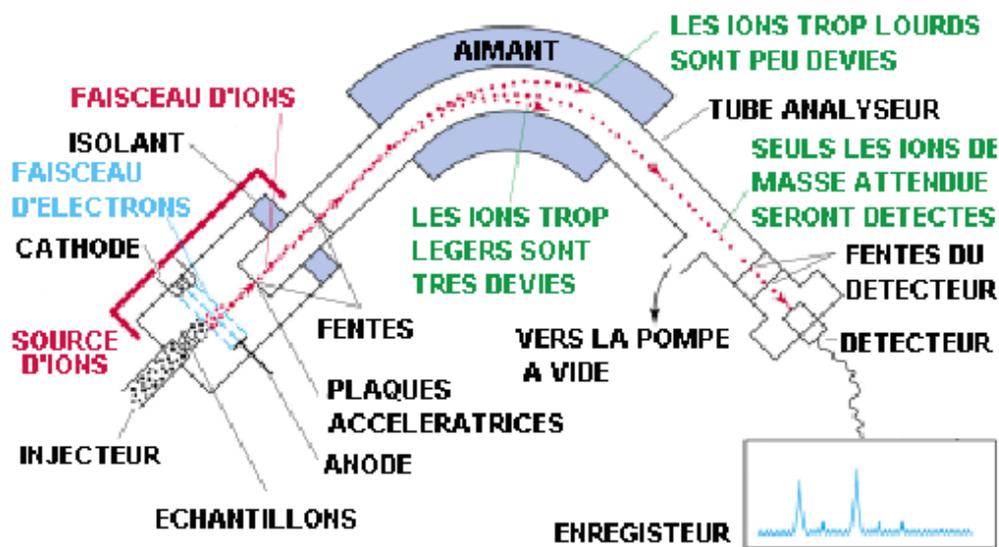


Schéma de la structure d'un spectromètre de masse.

Le détecteur

Comme les analyseurs et les sources d'ionisation, il existe différents types de détecteurs. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais leur rôle reste le même, compter les ions.

Les détecteurs sont des compteurs et amplificateurs signaux des ions, ils permettent de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Ils fournissent des informations sur le temps d'arrivée des ions au détecteur et leur intensité.

Le système informatique :

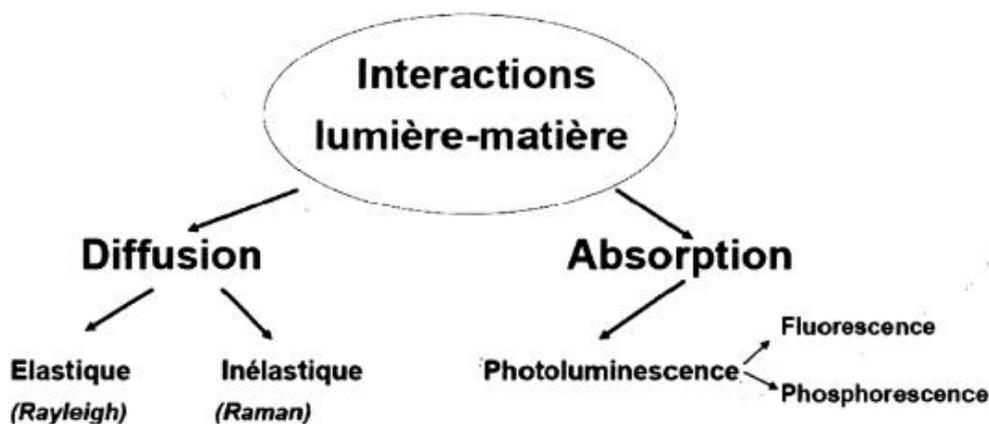
C'est au système informatique qui détermine la masse sur charge (m/z) en fonction du temps d'arrivée au détecteur et les paramètres de l'analyseur.

LA FLUORESCENCE MOLECULAIRE (La Spectrofluorimétrie)

1. Introduction :

La spectroscopie est l'analyse du rayonnement électromagnétique émis, absorbé ou diffusé par les atomes ou les molécules. Elle fournit des informations sur l'identité, la structure et les niveaux énergétiques des atomes et des molécules du fait de l'interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière.

La spectrométrie de fluorescence ou spectrofluorimétrie permet la mesure et l'étude des spectres de fluorescence.



2. La luminescence

La luminescence est le phénomène d'émission de photons à partir d'un atome ou d'une molécule dans un état électroniquement excité. En retournant à son état fondamental à partir de l'état excité, l'énergie perdue par l'atome ou la molécule se transforme en un photon, le phénomène est radiatif.

Ces différents phénomènes dépendent du processus physique qui a provoqué l'excitation de l'atome ou de la molécule.

En fonction du mode d'excitation On distingue :

2.1-la chimiluminescence : l'énergie est apportée par une réaction chimique exothermique

2.2-la thermoluminescence : l'énergie est apportée par chauffage

2.3-l'électroluminescence : l'énergie provient d'une décharge électrique dans des vapeurs ou des gaz (champs électrique)

2.4-la bioluminescence : l'énergie est produite par une réaction enzymatique dans des organismes vivants (bactéries, végétaux et animaux).

2.5- la photoluminescence : l'énergie provient de l'absorption de photons (fluorescence, phosphorescence)

3. Définitions :

3.1. Photoluminescence :

La photoluminescence est un phénomène de luminescence due à l'absorption de photons.

Selon la durée de la luminescence, on distingue :

3.1.1. La fluorescence

La fluorescence est un phénomène de luminescence : des molécules émettent un rayonnement dans toutes les directions grâce à l'énergie reçue d'une lumière incidente. Elle est la propriété des composés cycliques aromatiques. Sa mesure s'effectue à partir de spectrofluorimètres avec lumière incidente UV et lecture à 90° en lumières UV et visible. Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) provenant de la source lumineuse, et de restituer rapidement (quelques nanosecondes) une fraction de cette lumière absorbée sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission) dans le domaine du visible ou proche UV.

Elles émettent à une longueur d'onde supérieur à celle du faisceau incident.

a. Fluorescence naturelle

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine, etc.), certaines vitamines du groupe B, Pyridoxine (B6), riboflavine (B2), Folates (B9), les polyphénols (catéchine, acide gallique, etc.), la chlorophylle, tryptophane, adrénaline, chloroquinine, digitaline, pénicilline, certains alcaloïdes sont des fluorophores naturels.

b. Fluorescence artificielle

La molécule n'est pas naturellement fluo, on la rend fluo (dérivation) -en la complexant avec une molécule fluorescente

-en oxydant le composé (par bromure de cyanogène)

-en cyclisant la molécule

-en lui greffant des groupements fluorescents

Les vêtements à haute visibilité, les surligneurs fluorescents.

3.1.2. Phosphorescence

Le terme phosphorescence est une extension de phosphore. Car le phosphore blanc possède la propriété d'émettre de la lumière dans le noir.

Le phénomène de phosphorescence correspond à une propriété de certains matériaux qui peuvent emmagasiner de la lumière et la restituer ensuite petit à petit dans l'obscurité. Dans le cas de la phosphorescence, l'émission de lumière résulte d'une perte d'énergie par des électrons qui ont, au préalable, été excités par une énergie lumineuse. Ils retournent alors à leur niveau d'énergie le plus bas lentement.

3.2. Principe de la fluorescence et de la phosphorescence

La phosphorescence et la fluorescence ont de nombreuses applications dont la fluorimétrie qui est une méthode de dosage. Pour bien comprendre le phénomène, il est utile d'étudier le diagramme de Jablonski. C'est un diagramme énergétique comparant les phénomènes de retour à l'équilibre par fluorescence et phosphorescence.

1. Origine de la photoluminescence

1- Domaine spectral

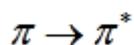
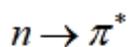
Le visible : 400-800 nm

Le proche ultraviolet : 200-400 nm

2- Domaine énergétique :

Les énergies électroniques et vibrationnelles

3-Transitions électroniques :



En fluorescence : Les transitions électroniques se font entre deux états énergétiques de même multiplicité.

En phosphorescence : Les transitions électroniques se font entre deux états énergétiques de multiplicités différentes.

4. Règle de multiplicité :

1. Nombres quantiques électroniques

Chaque électron est caractérisé par les nombres quantiques :

- Principal « n »
- Secondaire « l »
- Magnétique (spin) « m » ($m = \pm \frac{1}{2}$)

2. La multiplicité

La multiplicité M définit deux états électroniques : Singulet ou Triplet

$M = 2S + 1$ Avec $S =$ Somme de « m » des électrons d'une orbitale moléculaire

Etat Singulet : $M = 1$

Etat Triplet : $M = 3$

On distingue ainsi les états électroniques suivants :

Etat fondamental

Spin = $\frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$

Multiplicité de spin $2S+1 = 2 \times 0 + 1 = 1$ état singulet

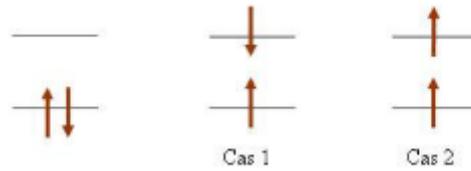
Etats excités

Cas 1 : Spin = $\frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$

Multiplicité de spin $2S+1 = 2 \times 0 + 1 = 1$ état singulet

Cas 2 : Spin = $\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$

Multiplicité de spin $2S+1 = 2 \times 1 + 1 = 3$ états triplet



5. Diagramme de Jablonski :

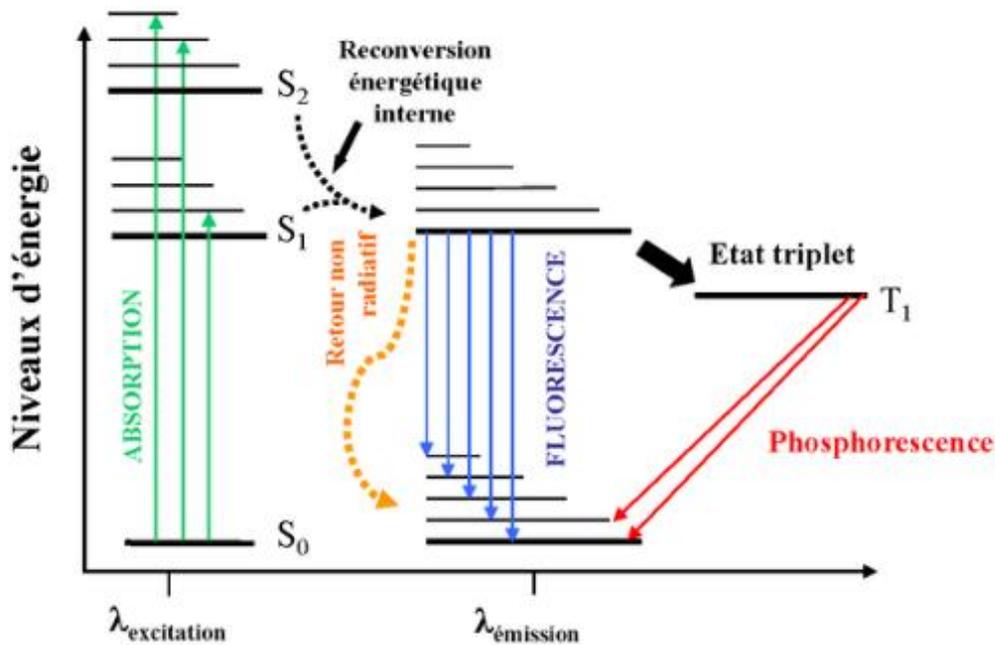


Figure : Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski montrant la différence entre fluorescence et phosphorescence

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 (délocalisation des électrons).

Différents types de dissipation de l'énergie en excès peuvent alors se produire. Ce sont des phénomènes de relaxation :

1- Relaxation radiative (rayonnante)

2- Relaxation non radiative (non rayonnante)

- Conversion interne
- Relaxation vibrationnelle

3- Autres types de processus de fluorescence

- Fluorescence de Stokes
- Diffusion de Rayleigh
- Diffusion Raman
- Fluorescence de résonance

Relaxation radiatives (rayonnante) : fluorescence

a - Relaxation directe :

Retour à l'état fondamental avec émission de radiations.

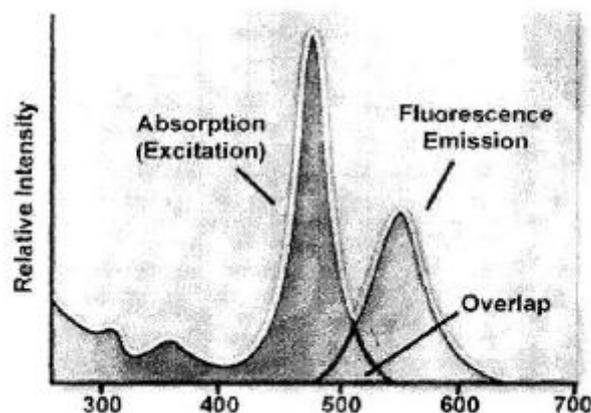
La fluorescence moléculaire se produit par émission d'un photon (à λ_{em}) dont l'énergie correspond à la transition entre l'état électronique S1 et l'un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental S0. L'excès d'énergie vibrationnel par rapport à S0 est à nouveau perdu par un processus de relaxation vibrationnelle.

C'est un phénomène rapide : il faut entre 10^{-9} et 10^{-7} seconde pour qu'une molécule retourne à l'état fondamental.

b - Relaxation après changement de multiplicité :

Passage d'un état excité Triplet T1 à l'état fondamental Singulet S0.

- Désactivation par émission de lumière de longueur d'onde plus grande que celle de la lumière initialement absorbée ou celle émise par fluorescence. Il s'agit de **la Phosphorescence**.



2. relaxation non radiative :

Dissipation de l'énergie sous forme de chaleur.

- Conversion externe :

Transfert de l'énergie au solvant ou à la matrice.

- Relaxation vibrationnelle :

Transfert de l'énergie au niveau vibrationnel le plus bas du même niveau énergétique excité.

- Conversion interne :

Transfert de l'énergie du niveau vibrationnel le plus bas d'un état excité à un état électronique inférieur.

- Conversion inter-système :

Changement de multiplicité nécessitant un retournement de spin et évolution d'un état excité Singulet à un état excité triplet d'énergie voisine et de durée de vie plus longue.

6. Aspect du spectre :

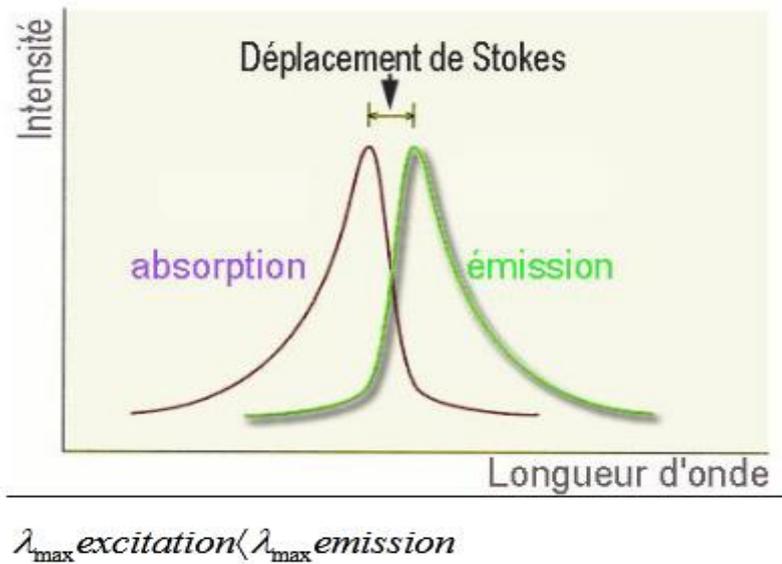
Spectres d'émission (absorption) et d'excitation de fluorescence

Chaque molécule fluorescente présente deux spectres caractéristiques :

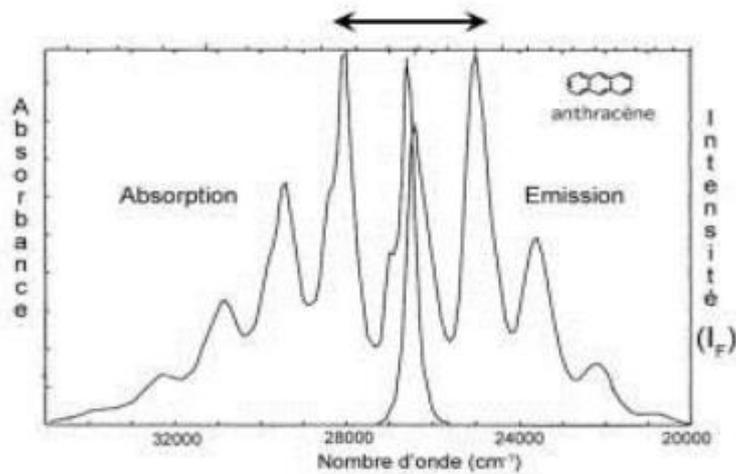
- un spectre d'absorption qui permet de déterminer l'efficacité relative des différentes longueurs d'onde des rayonnements incidents sur la fluorescence

- un spectre d'émission qui montre l'intensité relative des rayonnements émis à différentes longueurs d'onde

Chaque bande observée dans le spectre d'absorption (excitation) aura une bande d'émission (ou de fluorescence) correspondante. Ces deux bandes seront approximativement des images miroirs l'une de l'autre. Cependant, plus le composé est complexe, plus la bande de fluorescence est large et moins la symétrie des spectres sera avérée.



Le déplacement vers de plus grandes longueurs d'onde est appelé déplacement de Stokes



Exemple :

- Energies

$$E_e < E_a \iff \lambda_e > \lambda_a$$

(e pour émission et a pour absorption)

- Déplacement de Stokes \longleftrightarrow
- Symétrie miroir

7. Propriété quantitative :

Caractéristiques des fluorophores

Un fluorochrome ou fluorophore est une substance 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 .

1. 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 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ = 80 000 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ pour 488 nm pour la fluorescéine

2. Rendement quantique de fluorescence :

On définit le rendement quantique de fluorescence comme étant le rapport de l'intensité de fluorescence émise sur l'intensité absorbée.

Soit :

Φ_f : le rendement quantique de fluorescence

I_f : l'intensité de fluorescence émise (nombre de photons de fluorescence émis)

I_a : intensité absorbée (nombre de photons absorbés)

$$\Phi_f = I_f / I_a$$

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

Φ_f Grandeur sans dimension 0,05 à 1

Φ_f représente le rapport entre le nombre de photons émis (I_f) sur le nombre de photons absorbés (I_a).

Φ_f est indépendant de l'intensité lumineuse, plus la valeur de Φ_f est élevée, plus le composé est fluorescent.

$$0 \leq \Phi_f \leq 1$$

Φ_f dépend de la substance, du solvant, et de la température (diminuer quand la température augmente)

Φ_f ne dépend pas l'intensité de la source lumineuse I_0 et de la longueur d'onde d'excitation

3. 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 :

$$I_f = \Phi_F \cdot I_a = \Phi_F \cdot (I_0 - I_t)$$

$$I_f = \Phi_F \cdot I_0 \cdot \left(1 - \frac{I_t}{I_0} \right)$$

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

$$10^{-A} = 1 - 2.303A + \frac{(2.303A)^2}{2!} - \dots + \dots$$

I_f = Intensité de fluorescence

I_a = Intensité de rayonnement absorbé

I_0 = Intensité de rayonnement incident

I_t = intensité du rayonnement transmis

A = absorbance ($A = \log I_0/I_t = \epsilon_\lambda \cdot L \cdot C$)

$$I_f = K \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot (2.3 \cdot \epsilon_\lambda \cdot L \cdot C)$$

Le facteur K regroupe les paramètres propres au composé et à l'appareillage

L'intensité de fluorescence dépend de :

- l'intensité I_0 de la source

- l'appareillage

La longueur d'onde d'excitation

- la concentration de la solution fluorescente

8. Durée de vie de fluorescence ou temps de déclin

Durée de vie moyenne de l'état excité : plus ce temps est court, plus la sensibilité du fluorochrome est élevée.

$$\tau = \Phi \cdot \tau_N$$

Avec :

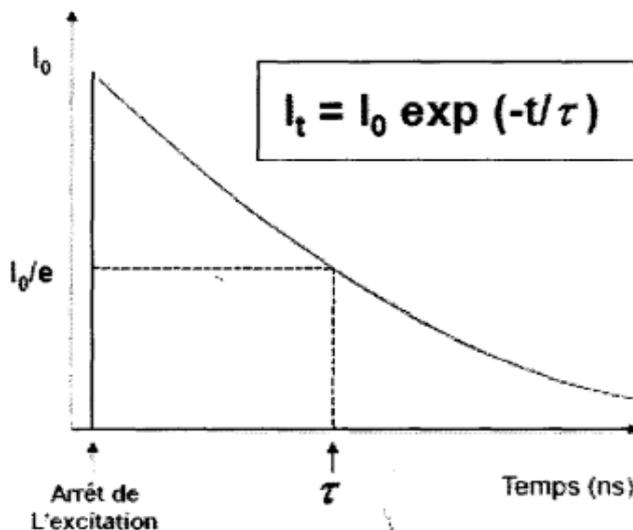
τ : durée de vie de fluorescence

Φ : rendement quantique

τ_N : constante de temps intrinsèque de l'état excité (fluorescence seule)

Le temps de vie radiatif est caractéristique de chaque espèce moléculaire fluorescente, il est de 1 à 100 ns

Décroissance exponentielle de l'intensité de fluorescence à l'arrêt de l'excitation

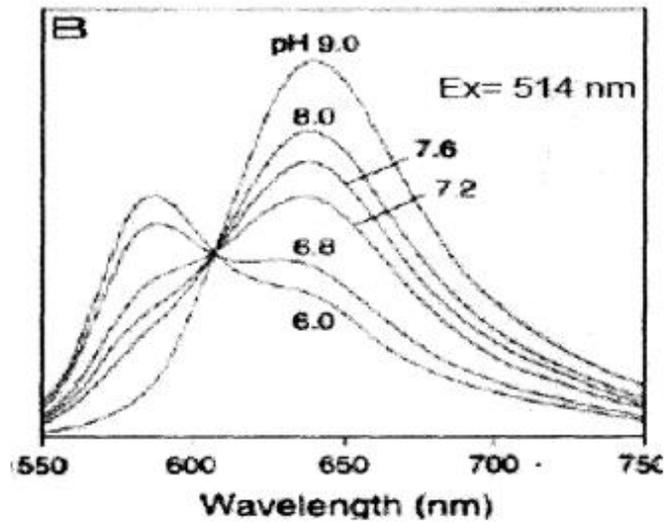


- Plus τ est court, meilleurs sera la fluorescence
- τ varie en fonction de l'environnement : solvant, pH...
- l'environnement, la nature du solvant, la température et le pH.

9. Effets de l'environnement sur la fluorescence moléculaire

1. Effet de pH :

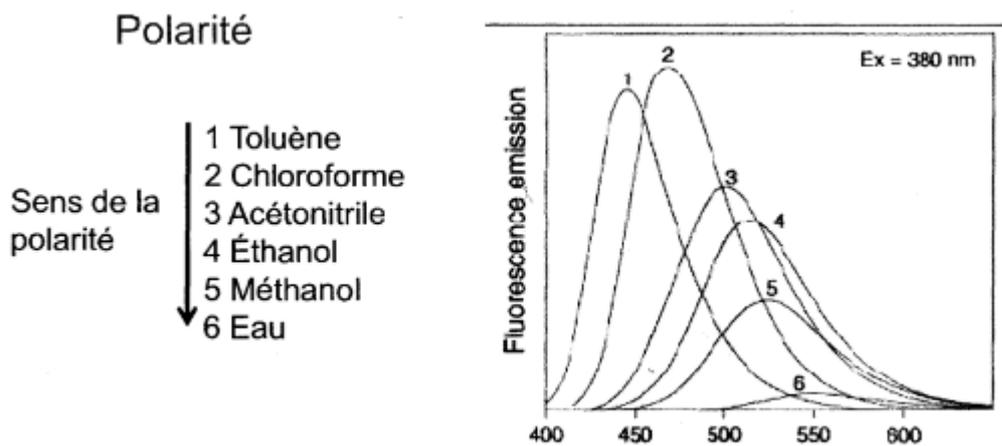
Modifications du rendement quantique et spectres d'émission et d'excitation



Spectres d'émission de fluorescence dépendant du pH

2. Effet de polarité

Quand la polarité augmente λ émission augmente



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

Par ailleurs des phénomènes de « Quenching » (extinction) peuvent se produire en présence d'autres composés à des concentrations importantes. En effet les collisions entre molécules entraînent des pertes d'énergie non radiatives et donc une baisse de la fluorescence.

10. Emission parasite en fluorimétrie

Des émissions radiatives parasites dues au solvant peuvent gêner la lecture de la fluorescence si les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont proches :

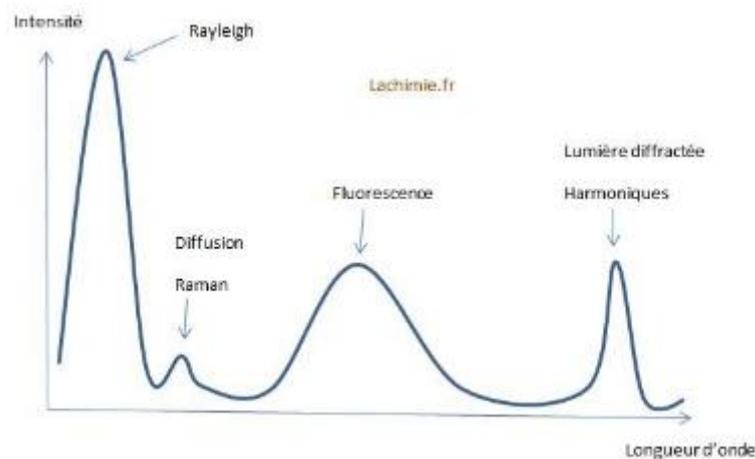
1. La diffusion Rayleigh :

Le solvant réémet une partie de l'intensité incidente à la même longueur d'onde

2. La diffusion Raman :

Il y a excitation des molécules du solvant (énergie de vibration). Le retour à l'état fondamental s'effectue avec émission de photons à de plus grande longueur d'onde. Elle est beaucoup plus faible que la diffusion Rayleigh.

C'est une collision non élastique. Observation d'une émission à des longueurs d'onde supérieures à celles à d'excitation.



11. Quenching de fluorescence

On appelle quenching l'effet physicochimique qui détermine une diminution de l'émission de fluorescence par transfert d'énergie à une autre molécule (le quencher).

Le quenching est la collision correspond au phénomène suivant :

- Le quencher entre en collision par diffusion avec le fluorophore excité, à la suite de cette collision, l'énergie d'excitation est transférée au quencher et le fluorophore.

- Le quenching par formation d'un complexe (quenching dit statique)

Un complexe se forme entre le quencher et le fluorophore et le complexe n'est pas fluores.

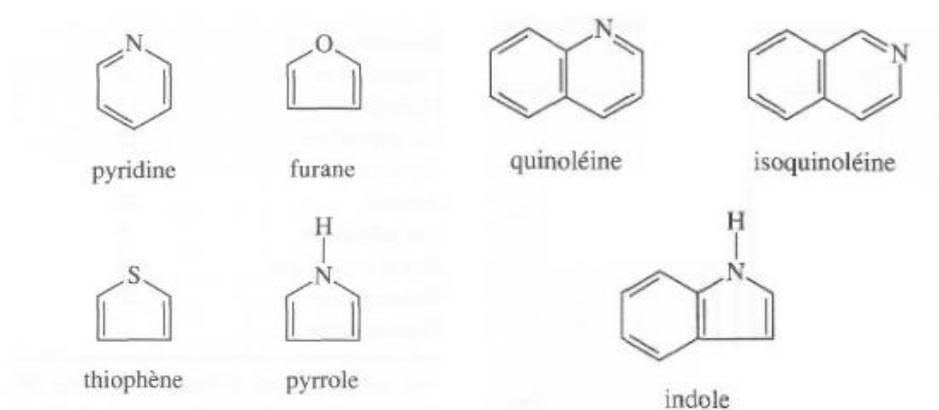
12. Fluorescence et Structure

Les composés qui contiennent des noyaux aromatiques produisent l'émission fluorescente Moléculaire la plus intense et donc la plus utilisée.

- La plupart des hydrocarbures aromatiques non substitués sont fluorescents en solution et le

Rendement quantique \nearrow avec le nombre de cycles et leur degré de condensation.

- Les hétérocycles simples ne présentent pas de fluorescence



Quelques exemples de molécules aromatiques qui ne sont pas fluorescentes.

Quelques exemples de molécules aromatiques qui sont fluorescentes.

13. Les appareils de fluorescence

Un fluorimètre, tout comme un photomètre, utilise des filtres comme sélecteur de longueurs d'onde.

1-Source lumineuse : Lampe au xénon, deutérium, laser

2-Monochromateur d'excitation : Sélection de λ photon d'excitation

3-Cuve :

Visible : Verre ou plastique

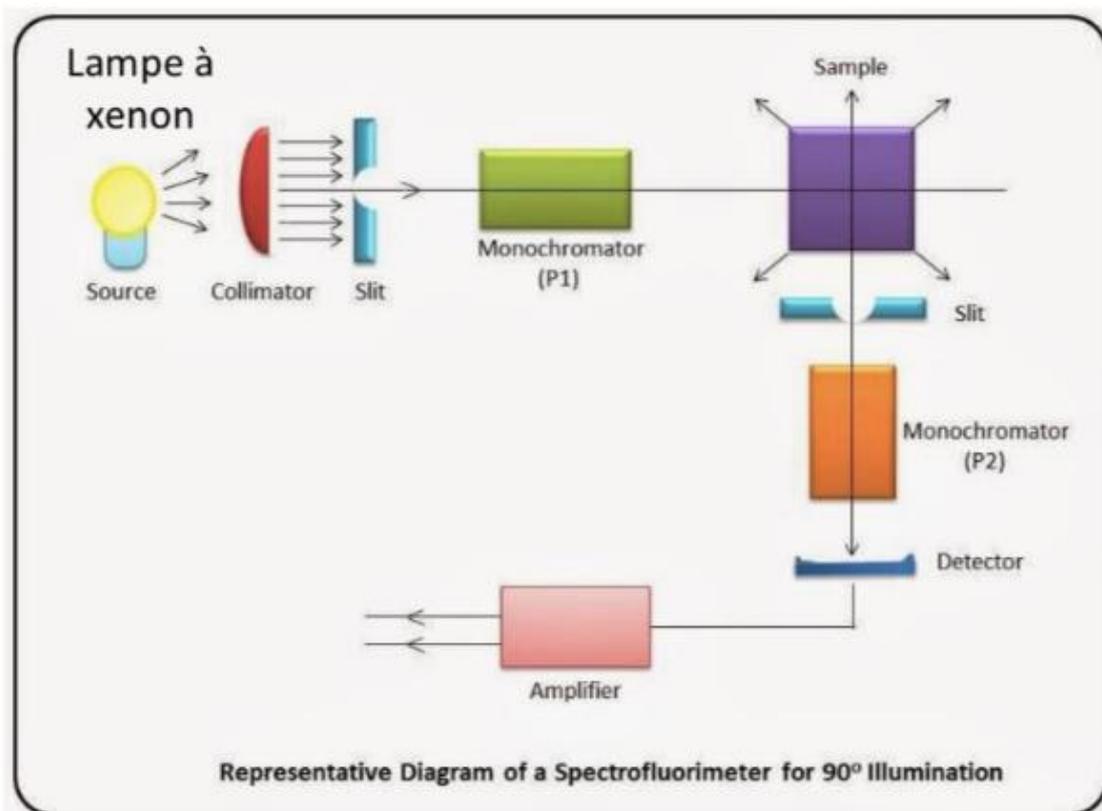
UV : Quartz

4-Monochromateur d'émission : Sélection de λ photon d'émission (placé dans une direction perpendiculaire à celle de la source)

5-Détecteur : photomultiplicateur

Mesure du faisceau émis perpendiculairement au faisceau incident, pour éviter que la lumière venant de la source ne fausse pas les mesures.

6-Système de recueil et d'analyse des données



Le faisceau de l'échantillon traverse d'abord un monochromateur primaire (P1) (monochromateur d'excitation) qui transmet le rayonnement qui provoque la fluorescence. Le rayonnement fluorescent est émis par l'échantillon dans toutes les directions, mais il s'observe le plus facilement perpendiculairement au faisceau incident ; aux autres angles. Le rayonnement émis atteint un détecteur photoélectrique après avoir traversé un monochromateur secondaire P2 (monochromateur d'émission) qui isole le pic de fluorescence sélectionné par la mesure.

14. Applications des méthodes de fluorescence

La spectrofluorimétrie est une méthode sensible et spécifique qui est utilisée, aussi bien dans le contrôle de qualité, qu'en biochimie, ou dans l'étude du métabolisme des médicaments.

Les applications principales de la fluorimétrie concernent surtout l'analyse des produits alimentaires, des produits pharmaceutiques, des prélèvements médicaux et des produits naturels. La sensibilité et la sélectivité de la méthode en font un outil particulièrement bien adapté à ces domaines.

Elles sont de 2 types :

1. Méthodes directes :

Elles sont basées sur la réaction de l'analyte avec un agent chélatant pour former un complexe fluorescent.

2. Méthodes indirectes :

Elles dépendent de la diminution ou désactivation (quenching) de la fluorescence d'un réactif causée par sa réaction avec l'analyte. La désactivation est surtout utilisée pour le dosage des anions.

3. Méthodes utilisées pour les espèces organiques et biochimiques

Dosage de substances organiques comme :

- l'adénine, l'acide anthranilique, des hydrocarbures polycycliques aromatiques, la cystéine, la guanidine, l'indole, des naphhtols, des protéines, l'acide salicylique, le scatole, le tryptophane, l'acide urique et le warfarin.

- Des produits médicaux :

L'adrénaline, l'alkyl morphine, la chloroquine, la digitaline, le diéthylamide de l'acide lysergique (LSD), la pénicilline, le phénobarbital, la procaïne et la réserpine.

4. Applications quantitatives :

Études des spectres :

- L'analyse quantitative nécessite une très faible quantité de substance de l'ordre du microgramme par prise d'essai

- limite de détection : la limite de détection est de l'ordre 10^{-9} mol/l

Etudes des substances végétales :

Chlorophylle, la phéophytine, huiles, flavonoïdes....

Imagerie moléculaire de fluorescence (biomédical)

-visualiser les molécules qui dépassent la limite de résolution du microscope optique

- Diagnostic clinique :

- Dosages par immunofluorescence de tissus, microbiologie, pathologie, cytogénétique

-Extraire des informations sur le fluorophore et son environnement (interactions entre protéines)

-Détecteur en HPLC

-Détecteur en Electrophorèse Capillaire

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.