

N° d'ordre : 349

50376
1989
65

50376
1989
65

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : Spectrochimie

par

Bruno LENAIN



MICROSPECTROFLUORIMETRIE A EXCITATION LASER ET DETECTION MULTICANALE : INSTRUMENTATION - POSSIBILITES - APPLICATIONS



Soutenu le 29 Mai 1989 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	MM.	M.	LEVILLAIN	Président
		B.	ARRIO	Rapporteur
		P.	DHAMELINCOURT	Rapporteur
		J.	BARBILLAT	Examineur
		E.	DA SILVA	Examineur
		M.	DELHAYE	Examineur
		J.C.	MERLIN	Examineur

Ce travail a été réalisé conjointement au laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR) du CNRS (L.P. 2641) et à la Société DILOR, dans le cadre d'un Groupement d'Intérêt Public (G.I.P.) "instrumentation et spectrométrie".

Je remercie Monsieur M. DELHAYE, Directeur d'Institut au C.N.R.S. et Président du G.I.P., d'avoir encouragé et soutenu notre entreprise. Je suis sensible à l'honneur qu'il me fait de juger ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements à Messieurs, J. CORSET, Directeur du LASIR et DA. SILVA, Directeur de la Société DILOR pour m'avoir accueilli et guidé au sein de leurs équipes respectives. Je remercie tout particulièrement Monsieur DA SILVA pour la confiance qu'il m'a témoignée lors de la réalisation de ce travail.

Je suis très heureux de pouvoir exprimer ici toute ma reconnaissance à Monsieur J.C. MERLIN, Maître de Conférences à l'USTLFA pour avoir dirigé ce travail. J'ai toujours trouvé auprès de lui les encouragements et les conseils qui m'ont permis de mener à terme cette étude.

Je tiens à remercier, Messieurs, J. BARBILLAT, Chargé de recherches au C.N.R.S. et P. DHAMELINCOURT, Professeur à l'I.U.T. de Lille pour m'avoir fait bénéficier de leur grande expérience dans le domaine de l'instrumentation ; qu'ils trouvent ici toute ma gratitude.

Je remercie Monsieur B. ARRIO, pour m'avoir initié aux techniques de fluorimétrie et pour l'honneur qu'il me fait d'apporter à ce travail, la caution de sa haute autorité scientifique. Ces remerciements s'adressent également à tous les membres de l'institut de Biochimie d'Orsay pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Cette étude a nécessité de nombreuses collaborations ; je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur M. LEVILLAIN pour l'intérêt qu'il a accordé à notre travail et pour l'honneur qu'il me fait d'accepter la présidence de ce jury de Thèse. J'adresse également toute ma reconnaissance à Mesdames, F. DELPLACE, Maître de Conférences à l'U.S.T.L.F.A. et J. DUBOIS, Technicienne au laboratoire des douanes de Lille, pour leur contribution efficace à une partie de ce travail.

Je suis tout particulièrement reconnaissant à Madame M. MAURO, pour le soin qu'elle a apporté à la dactylographie de ce mémoire ainsi qu'à Monsieur J.P. LABAEYE qui a exécuté une partie des figures.

Enfin, je remercie tous les membres du LASIR et de la Société DILOR qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

- <u>INTRODUCTION GENERALE</u>	7
- <u>PREMIERE PARTIE</u>	
<u>DESCRIPTION DES DIFFERENTS APPAREILS DEVELOPPES</u>	
<u>TESTS PRELIMINAIRES</u>	17
- Introduction.....	21
- Chapitre I : Le premier prototype de microspectrofluorimètre...	25
- Chapitre II : Le second prototype de microspectrofluorimètre...	57
- Chapitre III : Microspectromètre multi-fonction.....	65
- Conclusion de la première partie.....	85
- <u>SECONDE PARTIE</u>	
<u>APPLICABILITE DE LA MICROSPECTROFLUORIMETRIE</u>	
<u>A EXCITATION LASER</u>	89
- Introduction.....	95
- Chapitre I : Influence de la puissance d'irradiation sur l'émission de fluorescence.....	99
- Chapitre II : Aptitudes de la microfluorimétrie à excitation laser quant à la mesure des paramètres régissant l'émission de fluorescence.....	128
- Conclusion de la seconde partie.....	153
- <u>TROISIEME PARTIE</u>	
<u>APPLICATION A QUELQUES DOMAINES D'INVESTIGATIONS DE LA</u>	
<u>MICROSPECTROFLUORIMETRIE A EXCITATION LASER</u>	155
- Introduction.....	159
- Chapitre I : Application de la microspectrofluorimétrie laser à l'étude de la daunorubicine.....	
- Chapitre II : Mesures temporelles de l'émission de fluorescence cinétiques de réactions enzymatiques au niveau cellulaire.....	173
- Chapitre III : Etude de matériaux dopés : le rubis.....	185
- Conclusion de la troisième partie.....	197
- <u>QUATRIEME PARTIE</u>	
<u>ANNEXE</u>	199
- Rappels sur l'émission de fluorescence.....	201
- <u>CONCLUSION GENERALE</u>	219
- <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	225

- INTRODUCTION GENERALE -

- INTRODUCTION -

Parmi les méthodes analytiques qui peuvent prétendre donner, pour un grand nombre d'espèces moléculaires, des renseignements à la fois d'ordre qualitatif et quantitatif, sans perturber de façon significative le milieu analysé, la suprématie des méthodes spectroscopiques n'est plus à démontrer.

L'interaction de la lumière avec la matière est à la base de nombreuses techniques d'analyse non destructives parmi lesquelles les méthodologies qui utilisent le phénomène d'émission de fluorescence font partie de celles qui actuellement suscitent le plus d'intérêt pour de nombreux pôles de la recherche scientifique.

Pendant longtemps, la fluorimétrie n'a représenté pour le chimiste qu'un outil de détection d'éléments en traces. Bien que cet outil se soit révélé remarquable en sensibilité, les possibilités d'analyse qu'il pouvait offrir étaient loin d'être pleinement exploitées. Aujourd'hui de par la grande sensibilité et la sélectivité des appareils modernes de mesures, les scientifiques utilisent de plus en plus les techniques d'émission de fluorescence pour des études structurales et dynamiques. Des investigations à l'échelle de la cellule vivante unique peuvent être envisagées par les biologistes.

Cette transition est essentiellement due à l'évolution technologique de ces dernières années dans les domaines optique, électronique, informatique et à l'ingéniosité de nombreux chercheurs qui contribuèrent efficacement à l'essor de

cette nouvelle méthodologie d'analyse très performante que représente la microspectrofluorimétrie.

DE LA MACRO A LA MICROANALYSE **FLUORIMETRES ET SPECTROFLUORIMETRES**

Les trois composants essentiels de tout instrument d'analyse de l'émission de fluorescence sont : la source d'excitation, la cellule d'échantillonnage et le détecteur. [1]

A la genèse de la fluorescence, ces composants étaient tout simplement le soleil, un tube de verre et l'oeil, mais très rapidement des appareils bien plus sophistiqués ont été développés. Toutefois, la configuration de base de ces appareils reste invariante et peut se schématiser comme suit (fig 1) :

- Une source d'excitation, en général une lampe à arc au mercure ou au xénon,
- Un filtre d'excitation composé soit d'un filtre optique ou d'un monochromateur, pour sélectionner la longueur d'onde de la radiation excitatrice,
- Une cellule d'échantillonnage dont le matériau doit être choisi avec soin, celui-ci ne devant pas avoir de bandes d'absorption dans le domaine d'excitation, ou présenter de fluorescence intrinsèque,
- Un filtre d'émission composé soit d'un filtre optique ou d'un monochromateur permettant d'éliminer la radiation excitatrice du spectre de fluorescence et de sélectionner une bande d'émission particulière de celui-ci,
- Un système de détection, généralement un photomultiplicateur plus récemment un détecteur multicanal.

On appelle fluorimètre les appareils munis de filtres et spectrofluorimètre ceux équipés de monochromateurs. Seuls les spectrofluorimètres permettent l'enregistrement du spectre d'émission et du spectre d'excitation de fluorescence.

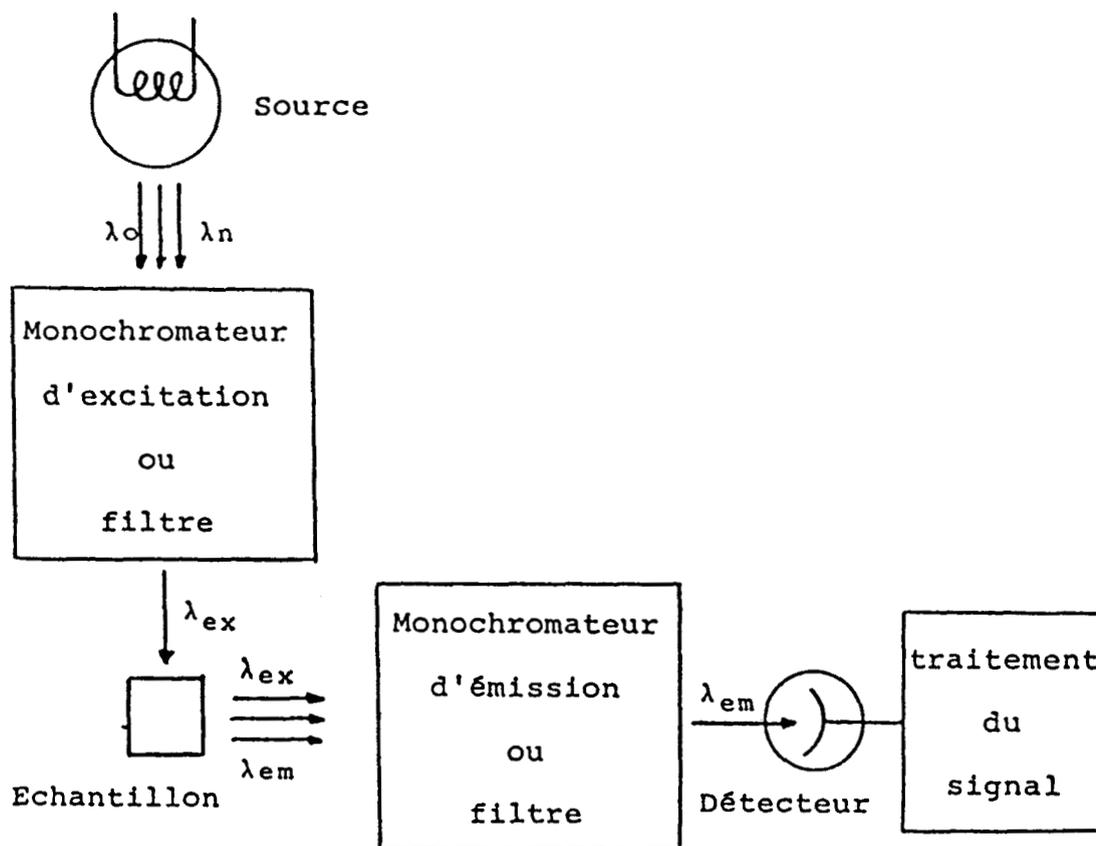


Fig 1 : Configuration de base d'un spectrofluorimètre ou d'un fluorimètre

Le besoin croissant de compléter l'analyse macroscopique par des investigations à l'échelle microscopique a catalysé le génie inventif de nombreux chercheurs qui, pour satisfaire leurs exigences, associent aux spectrofluorimètres un élément d'analyse supplémentaire : le microscope optique.

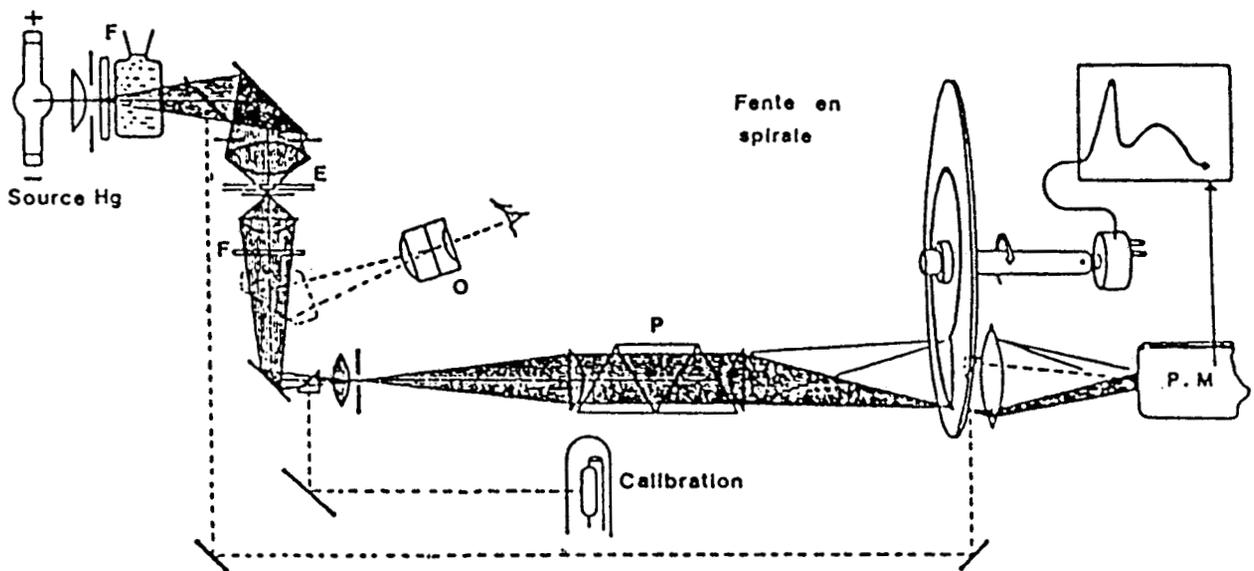
MICROSPECTROFLUORIMETRES

Dès 1953, Norden puis Rousseau en 1957, développent les premiers microspectrofluorimètres permettant l'analyse de la fluorescence de préparation tissulaire. [2.3]

En 1959, B. Chance est le premier à proposer un appareil capable de fournir des informations à partir d'une cellule vivante isolée ou d'un petit agrégat cellulaire. [4]

La même année, B. Chance et B. Thorell développent un microspectrofluorimètre différentiel permettant de compenser les erreurs provoquées par la fluctuation de la source d'excitation. [5]

En 1960, RA. Olson conçoit un appareil très original utilisant une fente en spirale qui permet d'envoyer successivement sur la photocathode d'un photomultiplicateur les radiations de fluorescence préalablement dispersées par un prisme (fig 2). [6]



(F : filtre - E : échantillon - O : oculaire - P :prisme)

Fig 2 : Microspectrofluorimètre developpé par Olson

Plus récemment, KOHEN, désireux d'obtenir une information spatiale issue de deux sites cellulaires distincts, met à profit une technique électronique séduisante. Son montage [7] [8] est équipé d'un photomultiplicateur à cathode vibrante, oscillant entre deux positions soigneusement calibrées du champ microscopique. Ce système permet de stocker, dans deux blocs mémoires différents, les signaux émis par deux compartiments présélectionnés d'une cellule. [9]

Une étude comparative de l'accroissement de l'intensité de fluorescence due à la formation de NAD(P)H dans le cytoplasme et dans le noyau après injection de Glucose 6 Phosphate a montré la potentialité de cet instrument. [10]

L'intensité de l'émission de fluorescence étant proportionnelle au nombre de molécules de fluorophore présentes dans le volume analysé, l'émission issue de volumes cellulaires est généralement extrêmement faible et souvent très difficile à mettre en évidence par les systèmes de détection jusqu'ici présentés. On pourrait penser pallier cet inconvénient en augmentant l'intensité de la radiation excitatrice, toutefois l'étude d'un système biologique est souvent rendue délicate par l'apparition d'une décroissance rapide de l'émission lors d'une irradiation trop importante ou d'une exposition prolongée du matériau à l'onde incidente. Ces considérations ont fortement limité le champ d'application des appareils précédemment énoncés. En effet, ces instruments qui fonctionnent en mode monocanal et utilisent un détecteur sensible au flux nécessitent, pour l'enregistrement d'un spectre un balayage en longueur d'onde dont la durée est souvent préjudiciable à la viabilité de l'échantillon. L'apparition des détecteurs multicanaux qui permettent l'enregistrement simultané d'un grand nombre d'éléments spectraux, a permis de résoudre ce problème.

La possibilité d'associer ces détecteurs à des tubes intensificateurs d'images a considérablement amélioré la détectivité des instruments.

S.S. West est un des premiers à tirer bénéfice de ce type de détection et son appareil est sans doute celui qui s'apparente le plus aux microspectrofluorimètres actuels. [11]

L'utilisation des détecteurs multicanaux, qui a permis de diminuer considérablement le temps dévolu à l'analyse, a été mise à profit pour mener des études temporelles ou topographiques d'émission de fluorescence [12-13]. Ainsi Salmon développe un appareil qui permet de repérer le passage de substances exogènes à travers la membrane cellulaire, et de suivre ensuite leur métabolisation (fig 3). [14-15]

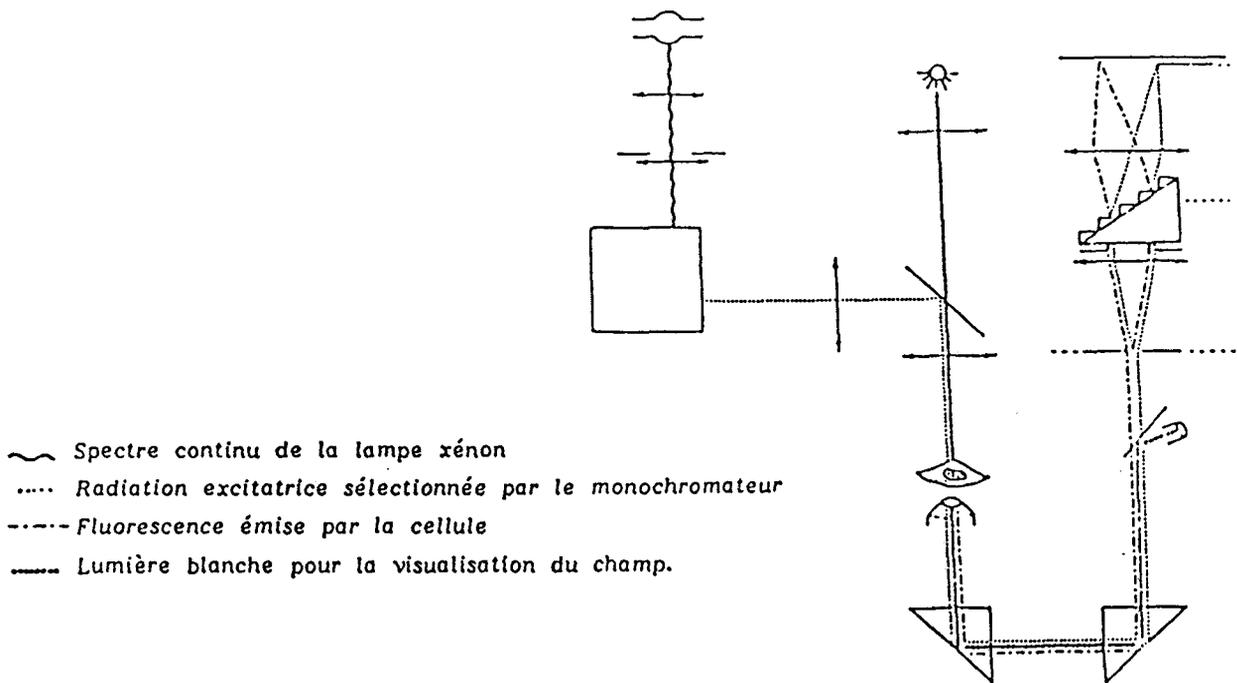


Fig. 3 : Microspectrofluorimètre de Salmon

Si l'utilisation d'une lampe à arc au mercure ou au xénon permet de bénéficier d'un grand choix de longueur d'onde d'excitation, la nécessité d'utiliser un monochromateur pour la sélection de ces longueurs d'onde réduit considérablement la densité de puissance disponible à l'échantillon.

Tirant profit d'une longue expérience acquise dans le développement de spectromètres et de microsondes Raman [16-19], nous avons pensé faire bénéficier la microspectrofluorimétrie non seulement des derniers développements instrumentaux qui conduisent à une amélioration de la sensibilité mais aussi de l'excitation de la zone analysée par un faisceau laser. L'utilisation d'une telle source d'excitation permet de bénéficier à la fois d'une densité photonique élevée et d'une très bonne résolution spatiale au niveau de l'échantillon. [20]

MICROSPECTROFLUORIMETRIE MULTICANALE INDUITE PAR LASER

Dans le cadre d'un Groupement d'Intérêt Public (G.I.P.) "Instrumentation et spectrométrie" formé par le C.N.R.S. (L.A.S.I.R.), l'Université des Sciences et Techniques de Lille et la Société DILOR, plusieurs prototypes d'appareils

autorisant, sur un échantillon de taille microscopique des études spectrales, spatiales et temporelles ont été développés. [21]

Dans une première partie, nous présentons la configuration de base des différents appareils réalisés et illustrons par quelques exemples d'applications, les possibilités d'analyses qui leurs sont propres.

La seconde partie consiste à vérifier que les lois qui régissent le phénomène d'émission de fluorescence sont applicables lors de l'irradiation par un faisceau laser d'un très petit volume d'échantillon. Nous serons amenés à discuter, la géométrie "excitation-collection" de l'instrument, la focalisation du faisceau laser, l'irradiance de l'échantillon et soulignerons les effets que ces différents facteurs peuvent engendrer quant à l'analyse de l'émission de fluorescence. Pour cela une molécule test, la fluoresceine, a été sélectionnée, quelques propriétés particulières de ce fluorophore seront étudiées.

Dans la troisième partie de ce mémoire, nous présentons quelques applications développées autour des prototypes de microfluorimètre. Dans les différents domaines d'investigations envisagés (milieux biologiques et matériaux dopés), notre but a été de montrer l'aptitude de l'instrument à réaliser les mesures concernées.

La quatrième partie a trait aux rappels théoriques concernant les principes fondamentaux de l'émission de fluorescence et des règles essentielles qui régissent ce phénomène, elle tiendra lieu d'annexe au lecteur non averti.

- PREMIERE PARTIE -

DESCRIPTION DES DIFFERENTS APPAREILS DEVELOPPES

TESTS PRELIMINAIRES

- <u>INTRODUCTION</u>	21
- <u>CHAPITRE I : LE PREMIER PROTOTYPE DE MICROSPECTROFLUORIMETRE</u>	
I-1 : <u>Configuration de base de l'instrument</u>	25
I-2 : <u>Tests préliminaires de l'appareil</u>	39
a) <u>Microfluorescence</u>	39
b) <u>Micro Raman</u>	45
c) <u>Microabsorption</u>	46
I-3 : <u>Analyse critique des performances du premier prototype de microspectrofluorimètre</u>	51
- <u>CHAPITRE II : LE SECOND PROTOTYPE DE MICROSPECTROFLUORIMETRE</u>	
II-1 : <u>Description de l'appareil</u>	57
II-2 : <u>Tests préliminaires</u>	60
a) <u>Fluorescence</u>	60
b) <u>Diffusion Raman</u>	62
c) <u>Absorption</u>	63
- <u>CHAPITRE III : MICROSPECTROMETRE MULTI-FONCTIONS</u>	65
III-1 : <u>Description</u>	66
III-2 : <u>Mise en oeuvre de l'instrument</u>	68
a) <u>Diffusion Raman</u>	68
b) <u>Fluorescence</u>	75
c) <u>Absorption</u>	78
d) <u>Réflexion</u>	81
- <u>CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE</u>	85

Dans les différents chapitres de cette première partie, nous présentons les divers prototypes réalisés ainsi que quelques applications qui résument leur champ d'application.

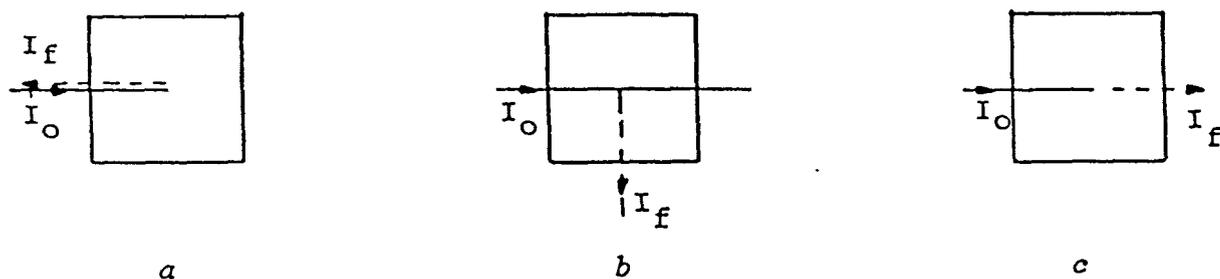
Si pour ces appareils nos motivations quant au choix de la source d'excitation et du système de détection à adopter ont été définies en introduction, nous n'avons encore émis aucune directive quant au choix de la géométrie "excitation collection" à leur donner [1,22]. La géométrie classique qui consiste dans les appareils conventionnels, à détecter l'émission de fluorescence à 90° de la radiation excitatrice, pour éviter une collection trop importante de celle-ci ou une émission de fluorescence parasite issue des parois de la cellule d'échantillonnage, ne s'adapte pas à la microanalyse. Aussi d'autres géométries doivent être envisagées :

- la méthode "frontale" où l'angle entre les directions d'excitation et de collection est de 0°

- la méthode "axiale" où l'émission est collectée à 180° de l'excitation.

En considérant les phénomènes d'absorption de la radiation excitatrice et de réabsorption de la lumière émise par fluorescence on peut évaluer, pour les trois géométries énoncées, l'intensité de fluorescence observée en fonction de la concentration d'une espèce moléculaire fluorescente en solution. On montre alors que si les géométries à "angle droit" et "frontale" sont bien adaptées à la mesure de l'émission de fluorescence, il n'en est pas de même pour la géométrie "axiale" où la collection d'une grande partie de la lumière excitatrice augmente considérablement le taux de lumière parasite [21].

Les figures II (a,b,c) schématisent les trois géométries précédemment définies pour l'excitation et la collection de la lumière.



: Méthodes d'excitation - collection de la lumière réémise

a) frontale (à 180°)

b) à angle droit

c) à 0°

Fig.I.1 : Géométries "excitation-collection"

La majorité des microspectrofluorimètres utilisent toutefois la géométrie "axiale". De manière à éviter les inconvénients inhérents à cette configuration nous avons préféré, pour la conception des divers prototypes, adopter la géométrie "frontale"; l'objectif de microscope est utilisé à la fois pour focaliser la radiation excitatrice et collecter la lumière émise ou diffusée.

Sur ces bases, un premier prototype de microspectrofluorimètre a été développé. Cet instrument équipé d'un laser à argon ionisé permet une analyse de l'émission de fluorescence dans l'ensemble du domaine du visible. [23]

Cet appareil a servi de base à la conception d'un second prototype dont la configuration autorise non seulement l'enregistrement de spectres de fluorescence et de spectres de diffusion Raman mais permet d'étendre le champ d'application dans le domaine du proche UV. [24,25]

Le désir de plus en plus prononcé de l'analyste, autant chimiste que biologiste, de disposer d'un appareil unique permettant, au niveau microscopique de réaliser plusieurs types d'analyses complémentaires, a amené à définir pour la Société DILOR un microspectrophotomètre multi-fonctions.

Les évolutions techniques mises en oeuvre pour le développement des deux prototypes du G.I.P., ainsi qu'une analyse critique des avantages et des inconvénients de ces appareils contribuèrent efficacement à la réalisation de ce dernier instrument. Celui-ci, dont l'originalité est de permettre sur un même microéchantillon des études, de fluorescence, de diffusion Raman, d'absorption électronique et de réflexion a été développé dans le cadre d'une convention entre le C.N.R.S. (LASIR) et le Ministère de l'Intérieur (Direction Générale de la Police Nationale). La Société DILOR en a assuré l'étude et la réalisation.

- CHAPITRE I : LE PREMIER PROTOTYPE DE MICROSPECTROFLUORIMETRE
A EXCITATION LASER

I-1 : Configuration de base de l'instrument [14-15]

Cet appareil (photos I-1 et I-2) a été conçu pour être aussi polyvalent que possible, il permet, sur un large domaine spectral, l'enregistrement de spectres d'émission en temps court, à partir d'échantillons de taille microscopique.

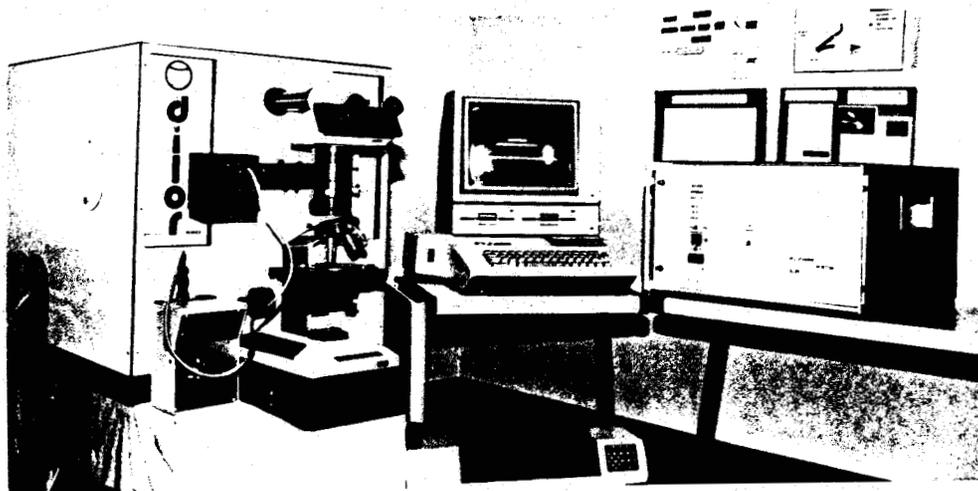
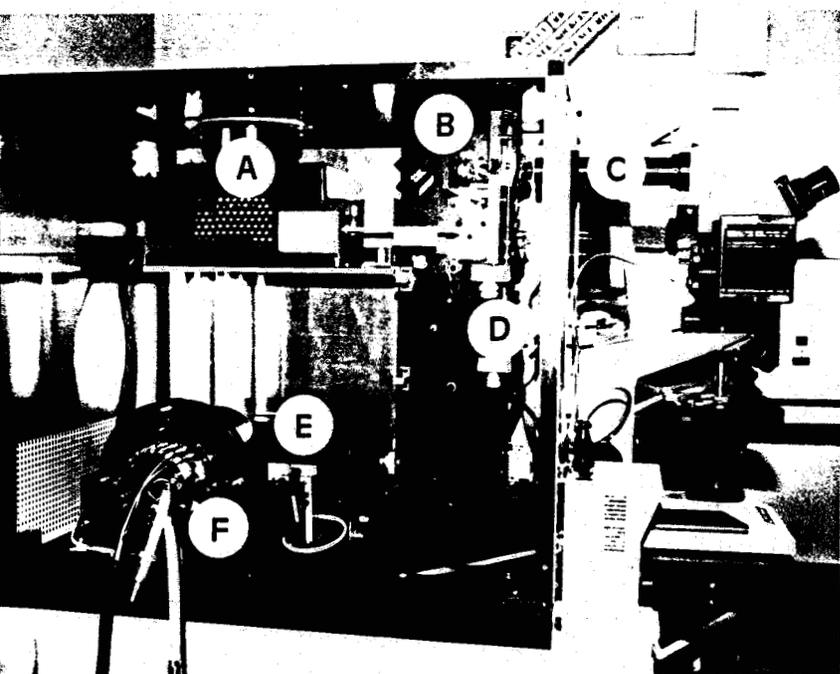


Photo I-1 : vue d'ensemble de l'appareil



- (A) source d'excitation laser
- (B-C) optique d'excitation et de collection de la lumière émise ou diffusée
- (D) système de balayage de l'échantillon par le faisceau laser focalisé
- (E) spectrographe
- (F) tête de détection

Photo I-2 Vue interne de l'instrument

La figure I-2, représente le schéma synoptique de l'instrument :

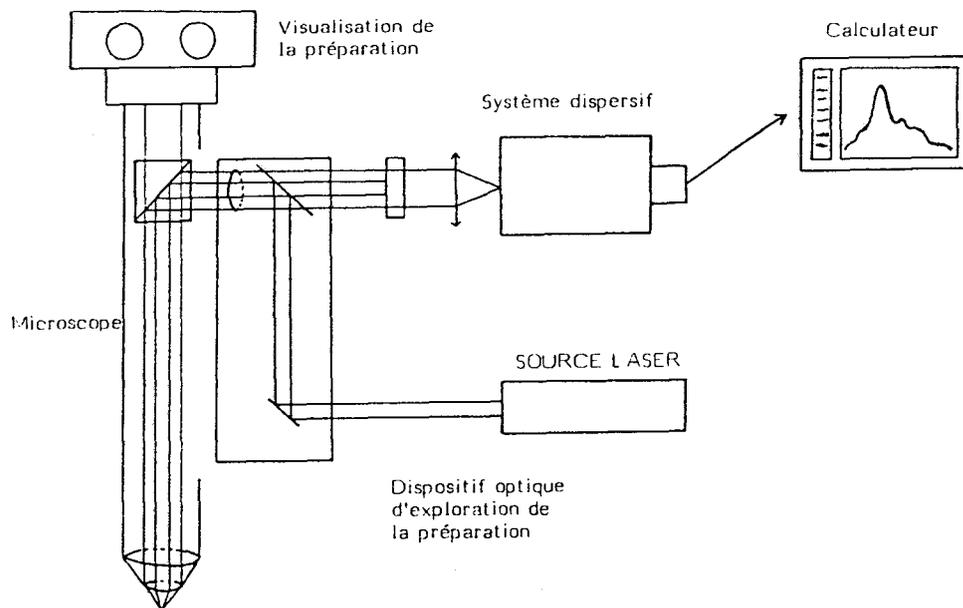


Figure I-2 : Schéma synoptique du premier prototype de microspectrofluorimètre

- Le dispositif d'excitation :

La source d'excitation est un laser à argon ionisé (Spectra Physics 162 A07) permettant de disposer des radiations à 4579,4880 et 5145 Å, avec des puissances de l'ordre de 2 mW pour la première et de 10 mW pour les deux autres.

Ces puissances bien que considérablement diminuées au niveau de l'échantillon (d'un facteur 7 environ par rapport à la puissance disponible en sortie laser), à cause de l'efficacité de l'optique de couplage, de la lame séparatrice et du filtre interférentiel, restent toutefois largement suffisantes pour engendrer l'émission de fluorescence de substances faiblement émissives ou en très faibles concentration. Souvent l'utilisation de filtres de densité est nécessaire pour éviter une irradiation trop intense.

Le faisceau laser après réflexion sur une lame semi-transparente est acheminé à travers le corps du microscope jusqu'à l'objectif de focalisation.

- Le microscope :

C'est un microscope optique (Olympus BH2) autorisant tous les modes classiques d'observation de l'échantillon, soit en réflexion, soit en transmission éclairé par des lampes quartz-halogène. Il est équipé d'un système de miroirs commutables permettant, l'entrée du faisceau laser pour l'excitation de l'échantillon, la visualisation de la préparation et l'envoi de la lumière à analyser vers le spectrographe.

L'objectif du microscope est utilisé à la fois pour focaliser le faisceau laser sur la préparation et collecter la lumière émise ou diffusée.

Le mode d'observation de l'échantillon par transmission permettra d'utiliser notre microspectrofluorimètre en tant que microspectrophotomètre d'absorption visible. La lampe blanche du microscope jouera alors le rôle de source d'excitation.

- le système de balayage du champ microscopique : [19,21]

Un système optique (figure I-3a et b) permet de balayer la surface de la préparation par le faisceau laser focalisé sans avoir à déplacer la platine du microscope, ceci avec une résolution spatiale meilleure que le micromètre. Pour ce faire, une lentille (L1) placée sur le trajet des faisceaux d'excitation et d'émission, reprend l'image de la préparation fournie par l'objectif du microscope. Cette lentille déplacée selon deux directions orthogonales, par des moteurs à micro-pas, permet de balayer tout le champ microscopique par le faisceau laser focalisé, la lentille de champ (L3) permet de couvrir correctement la pupille de l'objectif lors du déplacement de (L1). La lumière émise ou diffusée est focalisée sur la fente d'entrée du spectrographe par la lentille (L2). La conjugaison des pupilles du microscope et du spectrographe est assurée par la lentille (L4).

a) Focalisation au centre du champ

b) Focalisation en un point quelconque du champ

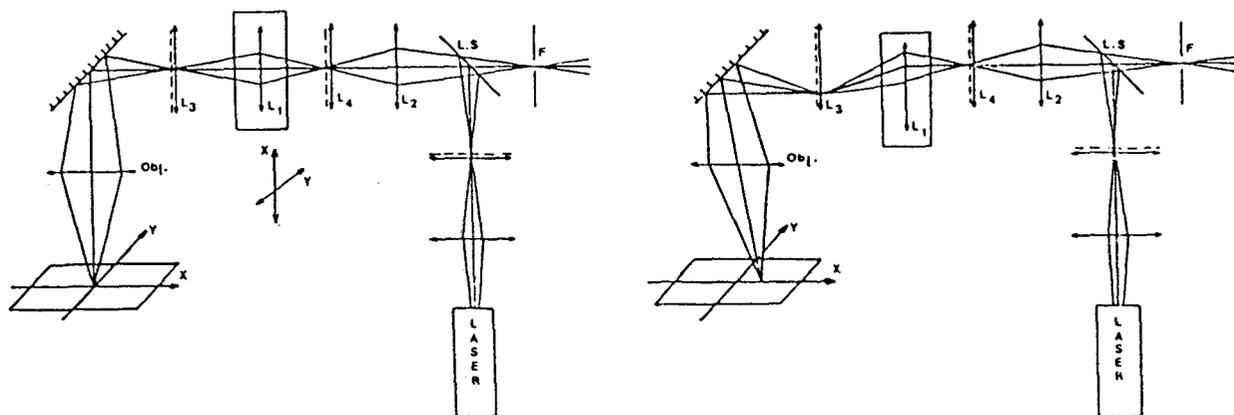


Figure I-3 : Schéma de principe du système de balayage du champ microscopique par le faisceau laser.

- Dispositif de filtrage de la lumière émise ou diffusée

Filtrage spectral, élimination de la radiation excitatrice :

De par la géométrie d'illumination et de collection de la lumière, une partie non négligeable de la radiation excitatrice est réfléchiée par l'échantillon et accompagne l'émission de fluorescence ou la diffusion Raman. Il convient donc pour éviter l'éblouissement du détecteur et une augmentation du taux de lumière parasite à l'intérieur du monochromateur, de réduire le plus possible l'intensité de la radiation excitatrice avant la focalisation de la lumière émise ou diffusée sur la fente d'entrée du spectrographe.

Pour ce faire l'appareil est équipé de filtres d'arrêt de la radiation excitatrice. Deux types de filtres ont été utilisés :

- Des filtres colorés passe-haut spécifiques à chaque longueur d'onde d'excitation disponibles à savoir OG495, OG515 et OG550 pour les radiations à 4579, 4880 et 5145 Å respectivement (OG pour "orange sharp cut-off glass"). Ces

filtres placés sur le trajet du faisceau diffusé ou émis permettent d'atténuer considérablement la radiation excitatrice et de transmettre la lumière à des longueurs d'onde supérieures (fig I-4) [26].

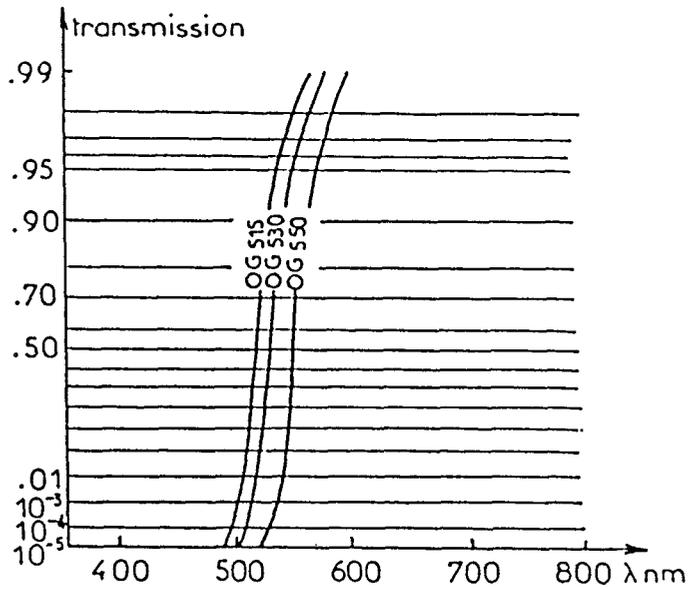


Figure I-4 : Courbes de transmission des filtres
OG 495, OG 515, OG 550

- Des filtres passe-bande du type Raman NOTCH.

Ces filtres constitués de quatre filtres interférentiels fonctionnant en réflexion permettent d'atténuer sélectivement une radiation excitatrice donnée (fig I-5).

L'avantage de l'utilisation de filtres d'arrêt est que ceux-ci représentent le moyen le plus simple pour filtrer la radiation excitatrice. L'association au spectrographe d'un prémonochromateur aurait compliqué considérablement la configuration de l'appareil.

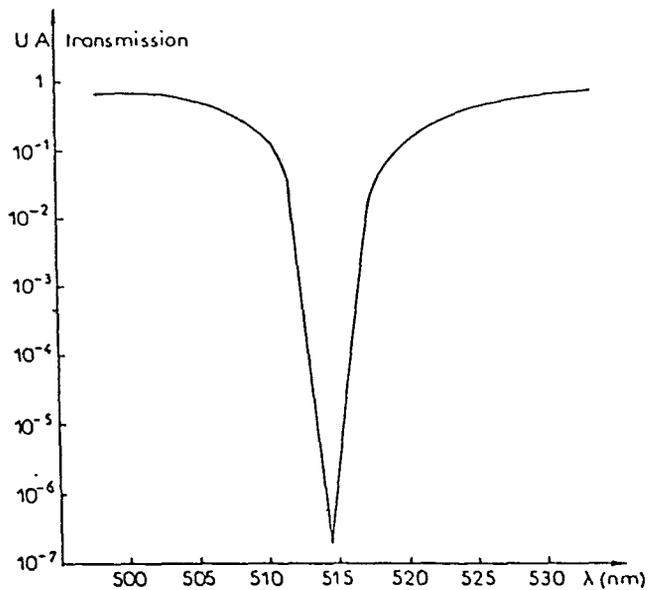


Figure I-5 : Courbe de transmission du filtre Raman NOTCH 514.5 nm

- Filtrage spatial et axial, sélection du volume analysé :

Supposons un échantillon constitué de micro-particules correspondant à des fluorophores de nature différente. Si la mise au point du microscope est faite sur une de ces particules, il y a de fortes chances pour que le spectre d'émission du fluorophore concerné soit perturbé par le spectre d'émission d'une particule situé au voisinage ou dans un plan différent du point de focalisation.

Pour minimiser ce phénomène, l'appareil a été équipé d'un diaphragme de champ (iris réglable) optiquement conjugué de la fente d'entrée du spectrographe et du plan focal de l'objectif du microscope. Ce diaphragme, placé sur le trajet du faisceau diffusé ou émis, joue le rôle de filtre spatial (diminue la hauteur de la fente d'entrée) et limite la profondeur de champ de l'appareil, il permet ainsi de sélectionner un volume particulier de l'échantillon effectivement vu par le détecteur.

Nous reviendrons sur l'utilité de ce diaphragme lors de l'évaluation de la profondeur de champ des différents appareils développés ainsi que lors des applications en microabsorption.

- Le spectrographe (photo I-3)

C'est un spectrographe simple étage, développé par la société DILOR sous l'appellation "spectrinfo".

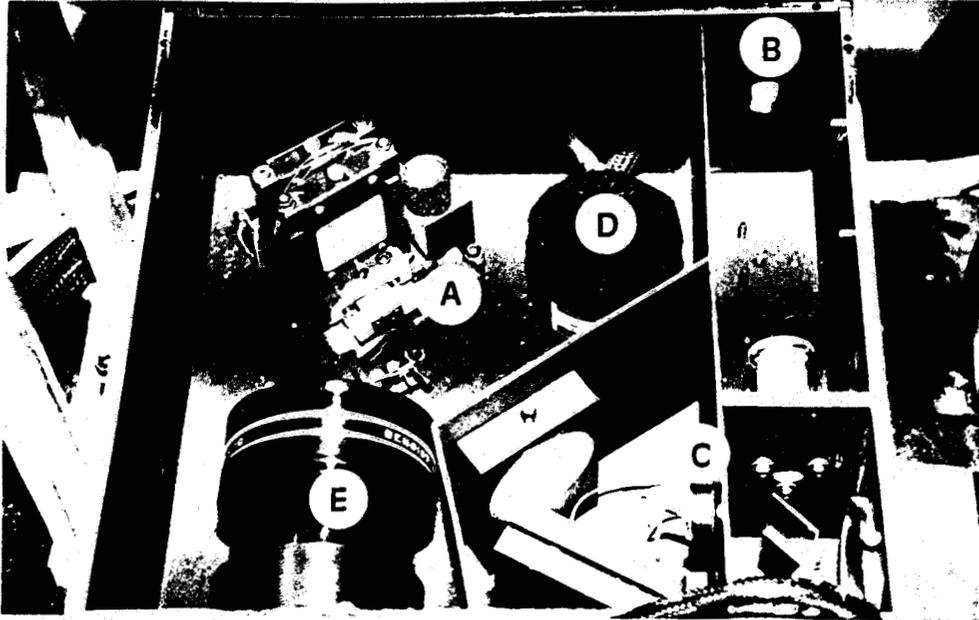


Photo I-3 : Vue interne du spectrographe

Ce spectrographe est équipé de deux réseaux holographiques plans montés dos à dos sur une tourelle mobile (A).

Cette géométrie présente l'intérêt de mettre à la disposition de l'utilisateur deux disperseurs dont le choix du nombre de traits (300 ou 1800 traits/mm) autorise des études, soit sur un large domaine spectral avec une faible dispersion (fluorescence à bandes larges) soit sur un domaine plus réduit avec une meilleure résolution (fluorescence à bandes fines et éventuellement diffusion Raman).

Le positionnement des réseaux se fait de manière automatique. Pour cela, un système optique basé sur le principe du retour inverse de la lumière, permet par utilisation d'une lampe blanche (B) intégrée au spectrographe, le repérage, sur un phototransistor (C), de la réflexion spéculaire pour chaque réseau (fig.16)

En fonction de l'information spectrale demandée par l'utilisateur (longueur d'onde au centre du champ du détecteur), le calculateur détermine l'angle de rotation des réseaux permettant de passer de la position correspondant à la réflexion spéculaire à celle demandée, puis contrôle le nombre de pas du moteur de commande (D) de la rotation des disperseurs nécessaire à leur mise en position.

Ce système de positionnement des réseaux présente l'avantage, outre d'éliminer toute mécanique de balayage fragile et complexe, d'être très fiable. La démultiplication ($\times 2,5$) entre le moteur pas à pas d'entraînement des réseaux (8000 pas par tour) et la tourelle supportant ceux-ci, permet de positionner les disperseurs de telle manière que l'erreur commise sur la longueur d'onde au centre du champ corresponde à la largeur d'un élément photosensible du détecteur ($25 \mu\text{m}$) soit environ $0,6 \text{ nm}$ pour le réseau à faible dispersion et $0,1 \text{ nm}$ pour le réseau à 1800 traits par millimètre.

- | | |
|-----------------------------|-------------------------|
| A) Tourelle mobile | B) Lampe blanche |
| C) Phototransistor | D) Moteur pas à pas |
| E) Objectif de focalisation | F) Détecteur multicanal |

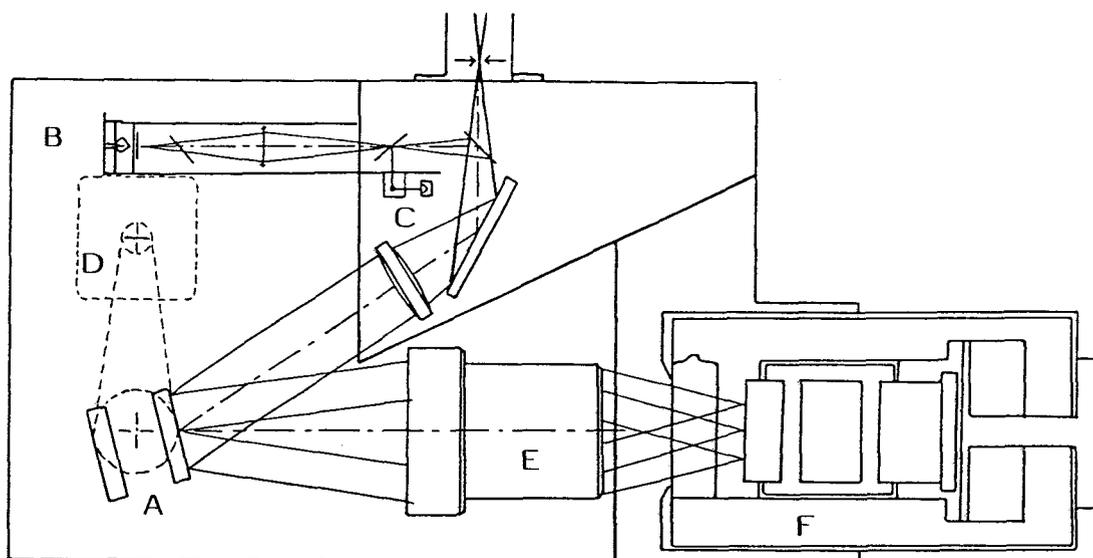


Figure I-6 : Schéma synoptique du spectrographe

Nous avons calculé, pour différentes positions des réseaux, les valeurs extrêmes du champ observé avec un détecteur composé de 512 éléments photosensibles.

Les figures I-7 et I-8 permettent de définir les divers paramètres qui apparaissent dans les équations I-1 et I-2 utilisées pour ce calcul.

Il est à noter que pour le réseau à faible dispersion (300 traits/mm) quelle que soit la longueur d'onde sélectionnée au centre du champ observé par le détecteur, les faisceaux incidents et diffractés se trouvent toujours de part et d'autre de la normale au réseau, alors que pour l'autre disperseur les deux faisceaux se trouvent toujours du même côté de celle-ci lorsque les disperseurs sont en position de travail.

Equations I-1 et I-2

Longueurs d'onde limite du champ observé (λ_1 et λ_3)
pour une longueur d'onde (λ_2) donnée au centre du détecteur

$$\lambda_1 = \frac{1}{n} [\sin(\gamma + \alpha) - \sin[(\alpha - \gamma) + \text{Arc Tg}(u_1)]]$$

$$\lambda_2 = \frac{1}{n} [\sin(\gamma + \alpha) - \sin[(\alpha - \gamma) - \text{Arc tg}(u_2)]]$$

- γ angle de rotation des réseaux par rapport à la normale dans l'ordre 0 pour amener λ_2 au centre du détecteur.

- α demi angle du spectrographe ($\alpha = 17^\circ 3'$)

- $U_1, U_2 = D/F$

- D représente la demi longueur de la barette de photodiodes (6,35 mm)

- F est la focale de l'objectif de sortie du spectrographe (130 mm).

Figure I-7
Dispersion par le
réseau 300 traits/mm

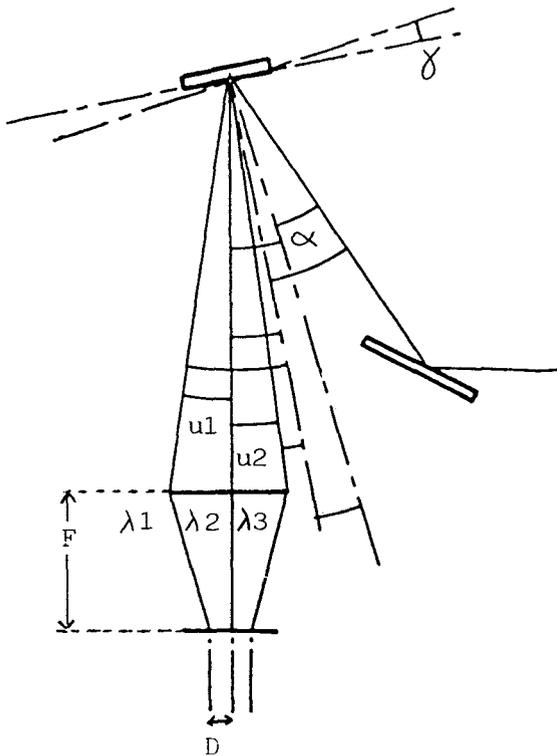
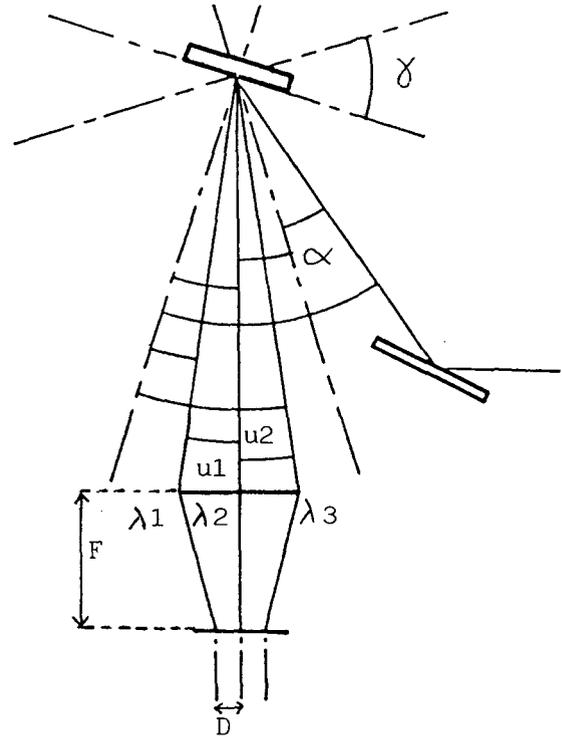


Figure I-8
Dispersion par le
réseau 1800 traits/mm

λ au centre du
champ : 600 nm



Le tableau (I-1) donne pour quelques longueurs d'onde au centre de la barette de photodiodes, les valeurs limite des champs observés et la résolution par élément photosensible qui en résulte.

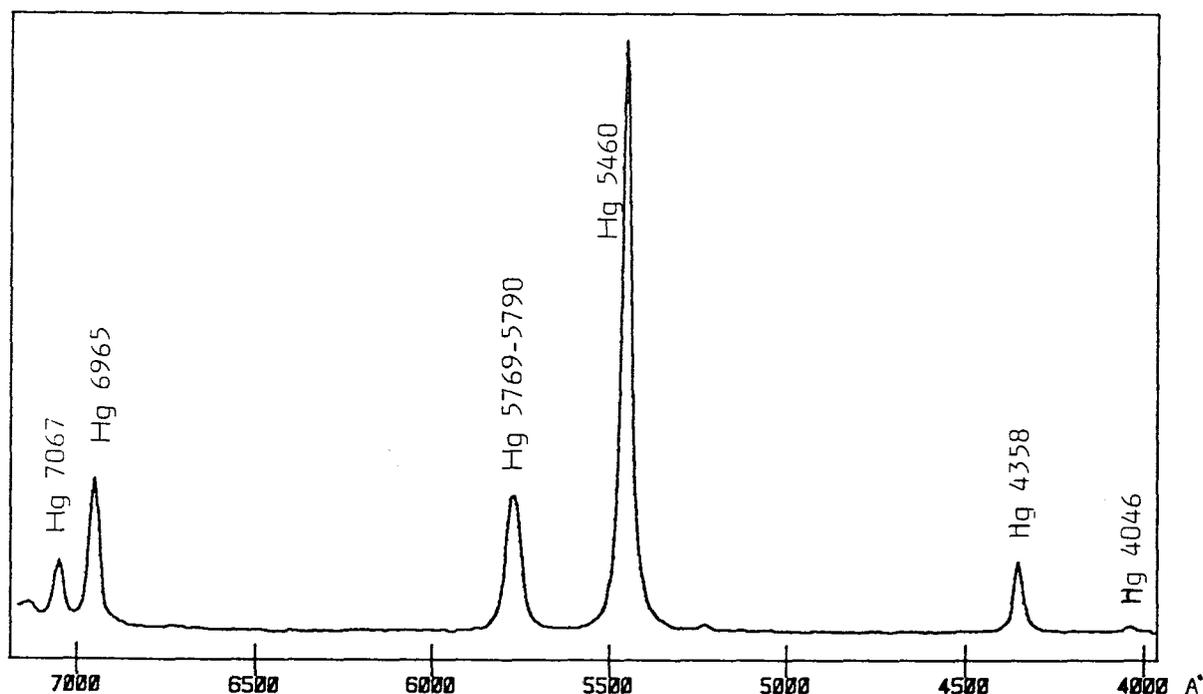
Système dispersif	λ au centre : du champ : nm	Valeurs extrêmes : du champ observé : nm	Champ total : observé : nm	Résolution en (nm) par diode
Réseau 300 traits/mm	500 : 600 : 700	342,3 à 659,5 : 441,4 à 759,6 : 541,1 à 860,4	317,2 : 318,2 : 319,3	0,62
Réseau 1800 Traits/mm	500 : 600 : 700	473,3 à 526,5 : 573,9 à 625,7 : 675 à 724,5	53,2 : 51,8 : 49,5	0,1

Tableau I-1 : Champ théorique au niveau du détecteur pour diverses longueurs d'onde centrales, résolution par diode.

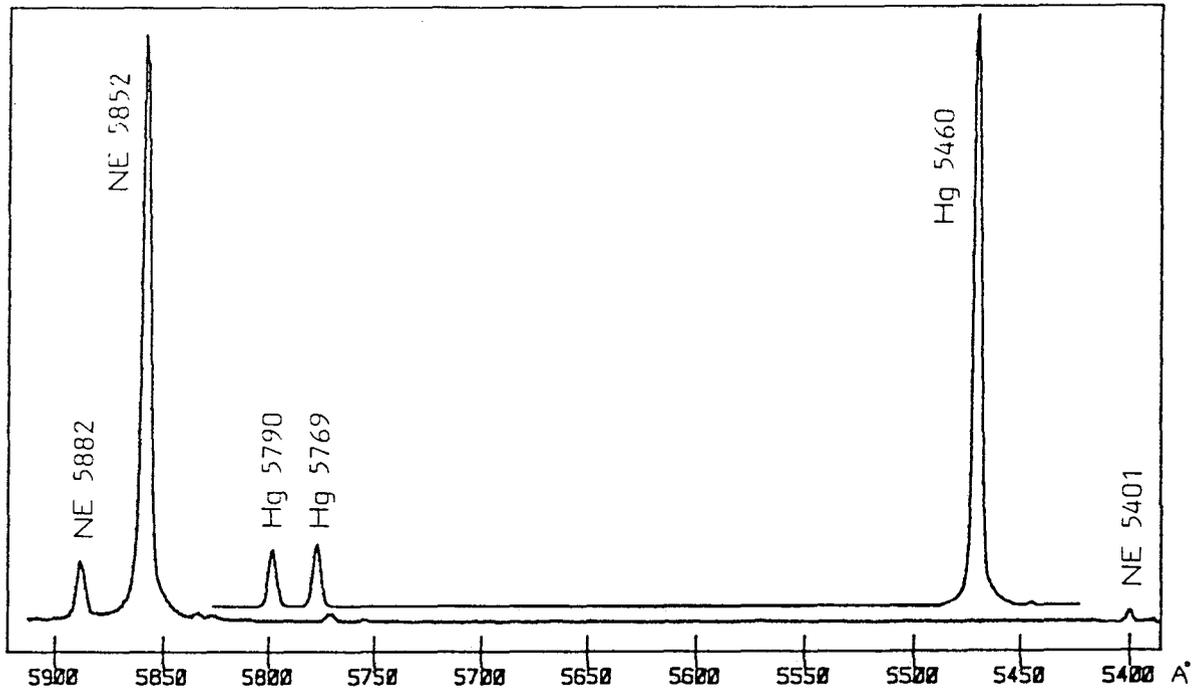
Nous présentons sur les figures I-9 (A et B) les spectres de raies émises par une lampe spectrale basse pression placée sous l'objectif du microscope. La lampe spectrale utilisée est soit une lampe à vapeur de mercure (Hg) soit une lampe Néon (Ne).

Le spectrographe ainsi réalisé, permet de couvrir un domaine spectral supérieur à 300 nm avec le réseau à faible dispersion et de 50 nm avec le réseau 1800 traits/mm. Le choix du positionnement des disperseurs étant laissé à l'utilisateur les bornes extrêmes des champs observables pourront être comprises entre 380 et 850 nm.

En dehors de cette plage, l'efficacité des réseaux, la réponse de la tête de détection utilisée et la transmission de l'optique de couplage deviennent des facteurs à prendre en considération. En effet, les matériaux composant l'optique ne permettent pas une excitation ou une analyse de la fluorescence dans le domaine du proche Ultra-Violet ; la réponse de la tête de détection (tube intensificateur) décroît rapidement au-delà de 850 nm. L'utilisation d'un laser à Argon ionisé pour l'excitation de l'émission de fluorescence ainsi que la coupure liée au système de filtrage de la lumière émise ou diffusée (filtres d'arrêt ou coupe bande) limitent le champ efficace d'observation de l'émission de fluorescence entre 460 et 850 nm.



A) Longueur d'onde au centre du champ : 555 nm



B) Longueur d'onde au centre du champ : 565 nm

Ne : Lampe Néon sous l'objectif

Hg : Lampe Mercure sous l'objectif

Figure I-9 : Champs observés au niveau du détecteur

A) Réseau 300 traits/mm B) Réseau 1800 traits/mm

- Le système de détection [27]

Le système de détection utilisé, doit répondre à deux caractéristiques essentielles :

- Sensibilité : pour permettre l'enregistrement de l'émission de fluorescence à très faibles niveaux lumineux.
- Rapidité d'enregistrement : pour protéger l'échantillon d'une exposition prolongée à la radiation excitatrice ou permettre l'étude temporelle de certains phénomènes.

Seule l'utilisation d'un détecteur multicanal à barette de photodiodes intensifiées permet de satisfaire ces exigences.

Comparée à la technique conventionnelle d'exploration du spectre (détection monocale), la détection multicanale permet une bien meilleure utilisation du temps dévolu à l'acquisition des données. Prenons par exemple un spectre comportant N éléments spectraux, un spectromètre muni d'un détecteur monocanal ne permet d'observer qu'un seul élément spectral durant le temps $t = T/N$ où T est le temps global d'enregistrement du spectre.

Les $(N-1)$ éléments spectraux pourtant présents au niveau de la fente de sortie du spectromètre ne sont pas pris en compte par le détecteur.

La détection multicanale permet par contre d'enregistrer simultanément ces N éléments spectraux durant le temps t , donc le nombre de données enregistrées par le détecteur multicanal, comparé au détecteur monocanal est, à durée d'analyse égale, multiplié par N . Le rapport signal/bruit se trouve ainsi amélioré d'un facteur proche de la racine carrée de N .

Le détecteur multicanal utilisé est constitué d'une barette de photodiodes, composée d'une rangée de 512 ou 1024 détecteurs et couplée par fibres optiques à un tube intensificateur d'images à galette de microcanaux à double focalisation de proximité (photocathode S20). L'adjonction d'un tel intensificateur d'images à une barette de photodiodes permet d'atteindre des performances comparables à celles d'un photomultiplicateur avec l'avantage pour la barette de détecter simultanément un très grand nombre d'éléments spectraux.

Nous ne reviendrons pas sur le principe de fonctionnement des détecteurs multicanaux qui a déjà été longuement décrit [28]. Rappelons simplement que :

- Le courant d'obscurité des diodes est éliminé par différence avec une seconde rangée de photodiodes rendues optiquement inactives.
- Le bruit thermique est minimisé en montant l'ensemble du système de détection dans un boîtier scellé (air sec) refroidi à -25°C par effet Peltier.

- Les signaux parasites sont éliminés grâce à un obturateur mécanique placé sur les trajets d'émission ou d'excitation.

Cet obturateur permet d'alterner l'éclairement de la barette, les signaux obtenus, pendant la phase d'éclairement puis la phase obscure, sont stockés dans deux blocs mémoires différents, les signaux parasites sont éliminés par différence.

Une grande majorité des analyses menées en microspectrofluorimétrie, ayant trait à l'étude de matériaux très fragiles (cellules, vacuoles) nous avons préféré placer l'obturateur sur le trajet du faisceau laser d'excitation de manière à éviter l'irradiation de l'échantillon durant l'enregistrement du "noir" et minimiser ainsi les phénomènes de décroissance de l'intensité de fluorescence.

Toutefois le fait de disposer l'obturateur sur le trajet du faisceau d'émission peut être intéressant dans certains cas notamment lors de l'étude de la diffusion Raman d'échantillons présentant une fluorescence importante. L'exposition prolongée de l'échantillon à la radiation excitatrice a pour effet d'atténuer l'intensité de l'émission de fluorescence (extinction). De plus cette géométrie permet d'éviter les fluctuations de l'émission de fluorescence éventuellement provoquées par l'éclairement alterné de l'échantillon.

Il est tout à fait envisageable de concevoir un système équipé de deux obturateurs, un sur le trajet d'excitation, l'autre sur le trajet d'émission ; la mise en service de l'un ou l'autre de ces obturateurs étant laissée au choix de l'utilisateur.

- L'informatique

Un calculateur Apple II E gère les programmes de positionnement des réseaux, de calibration spectrale, d'acquisition des données et de traitement de l'information issue du détecteur.

Cet ordinateur équipé de périphériques tels que écran vidéo, imprimante, lecteurs de disquettes, permet un premier traitement des spectres (normalisation, soustraction, intégration, déconvolution, lissage) avant leur présentation.

I-2 : Tests préliminaires de l'appareil

Dans cette partie, nous illustrons par quelques exemples d'applications en fluorescence, en diffusion Raman et en absorption, les différentes possibilités d'analyse de l'instrument. Ces applications nous amènent à faire une première approche de l'évaluation des performances de l'appareil et à souligner ces limitations.

a) Microfluorescence

- Test de sensibilité :

La grande sensibilité de l'instrument permet de détecter l'émission de fluorescence d'une solution 10^{-10} M de fluoresceine (milieu HEPES pH 7,2) avec une puissance relativement faible au niveau de la préparation (50 μ W) et une durée d'analyse acceptable (3'20") (Fig I-10).

Le faisceau laser (radiation à 488 nm) est focalisé à l'intérieur d'un tube capillaire de 300 μ m de diamètre, dans lequel circule la solution à étudier. Le volume à partir duquel est issue l'émission de fluorescence n'est que de quelques dizaines de micromètres cube, ce qui signifie qu'à la concentration de 10^{-10} M, seules quelques molécules de fluoresceine sont contenues dans ce volume. Les durées de vie de l'émission de fluorescence n'étant que de quelques nanosecondes, il est physiquement possible que ces quelques molécules, renouvelées par l'agitation thermique dans le volume irradié, subissent un très grand nombre ($> 10^7$ à 10^9) de cycles "excitation-émission" et émettent pendant le temps de mesure un très grand nombre de photons par fluorescence.

Si certains appareils peuvent prétendre détecter l'émission de fluorescence d'une solution de fluoresceine 10^{-14} M, le volume alors analysé est toutefois relativement important et la mesure s'effectue à partir d'un nombre considérable de molécules [29-30].

- Longueur d'onde d'excitation : 488 nm
- Puissance : 50 μ W
- Objectif : X50 ULWD
- Temps d'intégration : 10 Sec

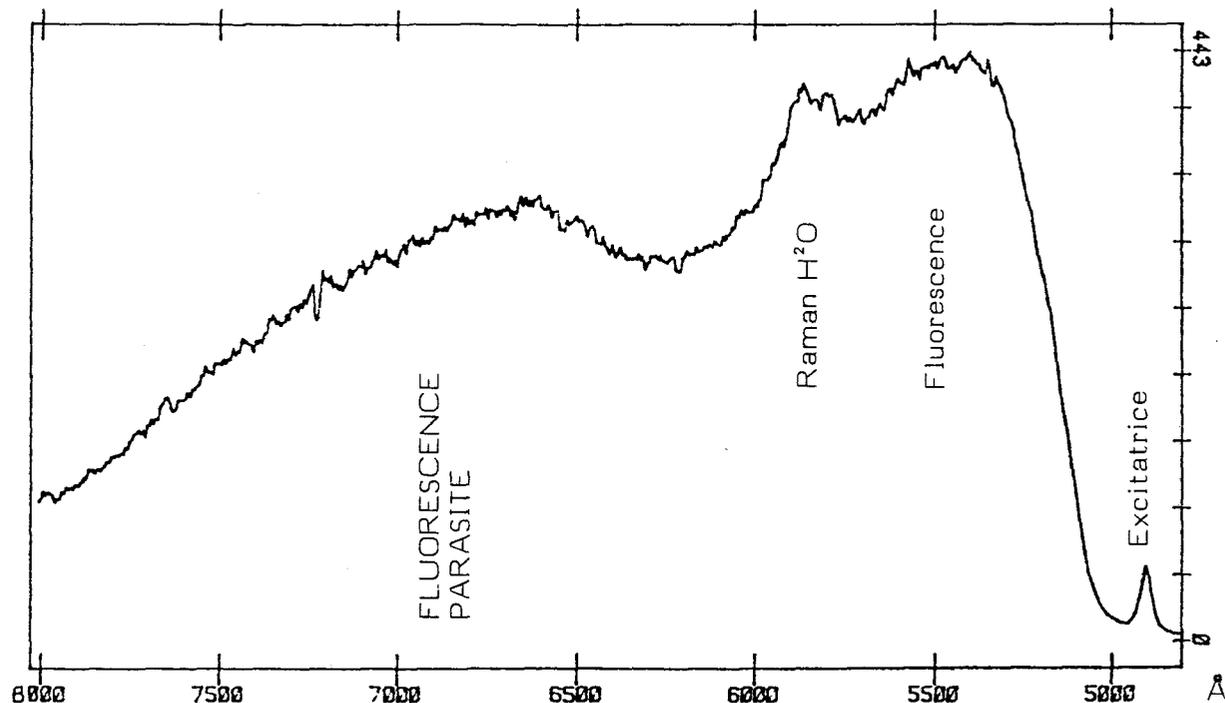


Figure I-10 : Spectre de fluorescence d'une solution 10^{-10} M de fluoresceine (pH 7,2)

A ce stade de dilution, le spectre Raman de l'eau apparaît avec une intensité équivalente à celui du spectre d'émission du fluorophore.

On pourrait penser améliorer ce seuil de détection en augmentant la puissance d'excitation. On constate toutefois que la fluorescence due au filtre d'arrêt (OG 515) ou au tube capillaire devient alors trop importante et masque totalement l'émission du fluorophore. De plus une augmentation trop importante de la puissance d'excitation est souvent préjudiciable à la stabilité de l'échantillon et risque d'engendrer des phénomènes d'extinction de l'émission de fluorescence.

- Résolution spatiale

De manière à mettre en évidence non seulement la sensibilité mais aussi la résolution spatiale de l'instrument, nous présentons sur la figure I-11, le spectre d'émission de la fluoresceine contenue dans une cellule de fibroblaste de hamster (BHK) après incubation de celle-ci par une solution saline d'acétate de fluoresceine (10^{-8} M). [31]

L'obtention de ce spectre n'a nécessité qu'une puissance d'excitation de $1 \mu\text{W}$ au niveau de la cellule et un temps d'intégration de 1 Sec.

De telles conditions opératoires permettent de conserver l'intégrité de la cellule et de suivre éventuellement l'évolution du phénomène d'émission de fluorescence lors de mesures de cinétique de pénétration d'une sonde fluorescente à l'intérieur du matériau cellulaire.

Le diamètre de la tache de focalisation est proche du micromètre. La résolution spatiale obtenue démontre qu'une étude des différents compartiments cellulaires est envisageable.

- Longueur d'onde d'excitation : 488 nm
- Puissance : $1 \mu\text{W}$
- Temps d'analyse : 1 Sec

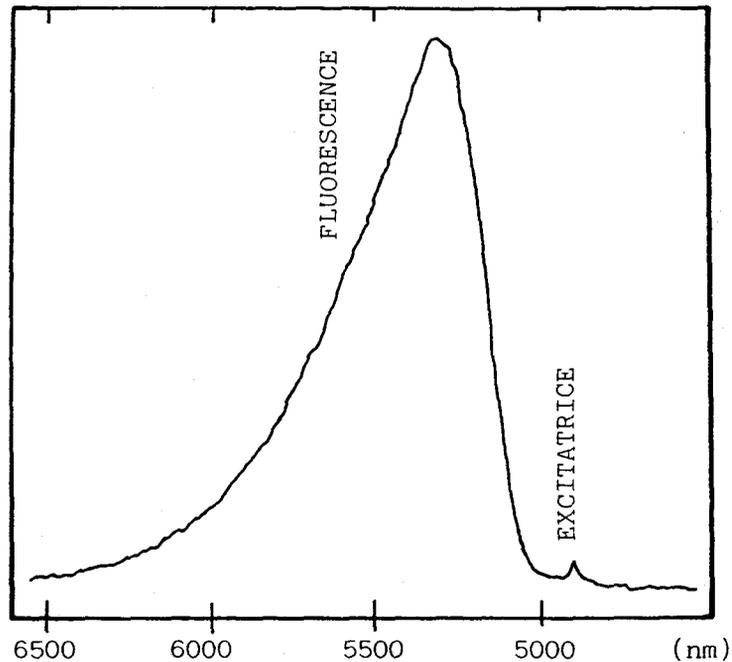


Figure I-11 : Spectre d'émission de la fluoresceine à l'intérieur d'une cellule de fibroblaste (BHK) incubée par l'acétate de fluoresceine (10^{-8}M)

- Autre exemple

Un tissu végétal est composé de différentes cellules. La feuille de "Zebrina pendula" plus couramment appelée feuille de "misère" se présente vue au microscope comme une juxtaposition de cellules, d'une centaine de microns de diamètre, dont la coloration de la vacuole varie du jaune au rouge suivant leur teneur en anthocyanes.

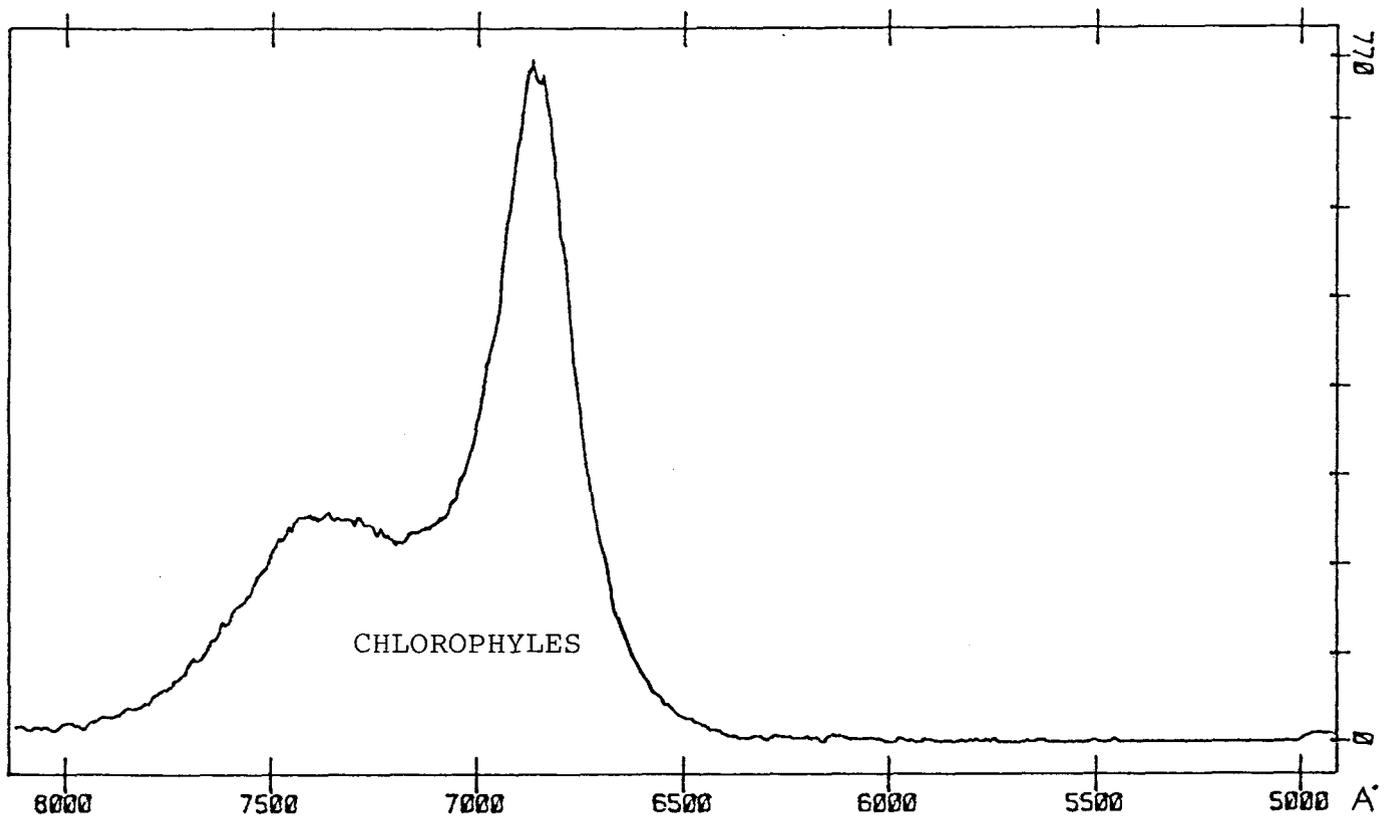
Il est possible d'enregistrer le spectre de fluorescence des différentes vacuoles : (fig I-12 A et B)

- La bande intense des chlorophyles présentes dans le système photosynthétique de la feuille apparaît dans tous les enregistrements.
- La fluorescence des anthocyanes apparaît par excitation d'une vacuole rouge uniquement.

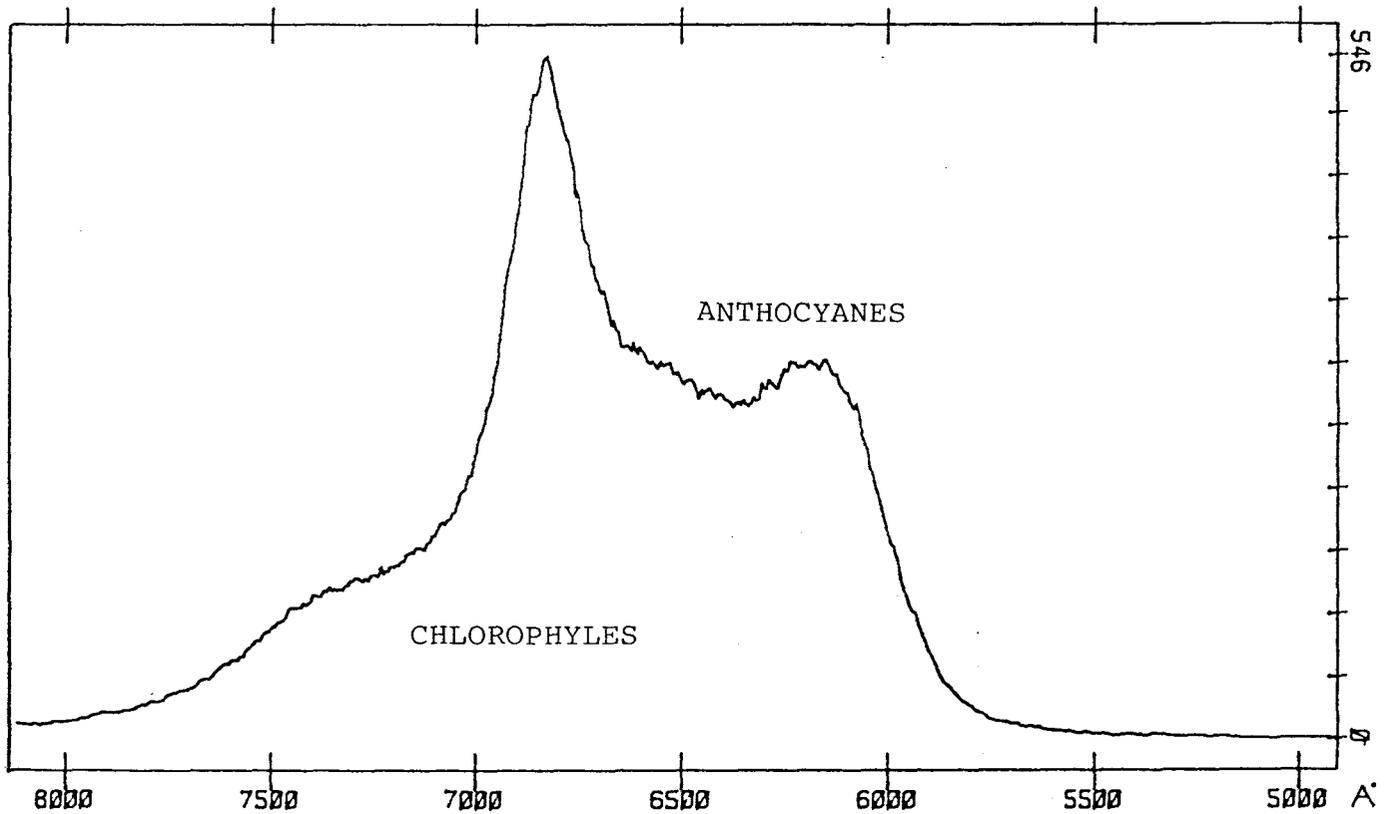
Figure I-12 : Spectres de fluorescence d'une feuille de "Zebrina pendula"

- Longueur d'onde d'excitation : 488 nm
- Puissance : 5 μ W
- Temps d'intégration : 1 Sec

- A) Vacuole jaune



- B) Vacuole rouge



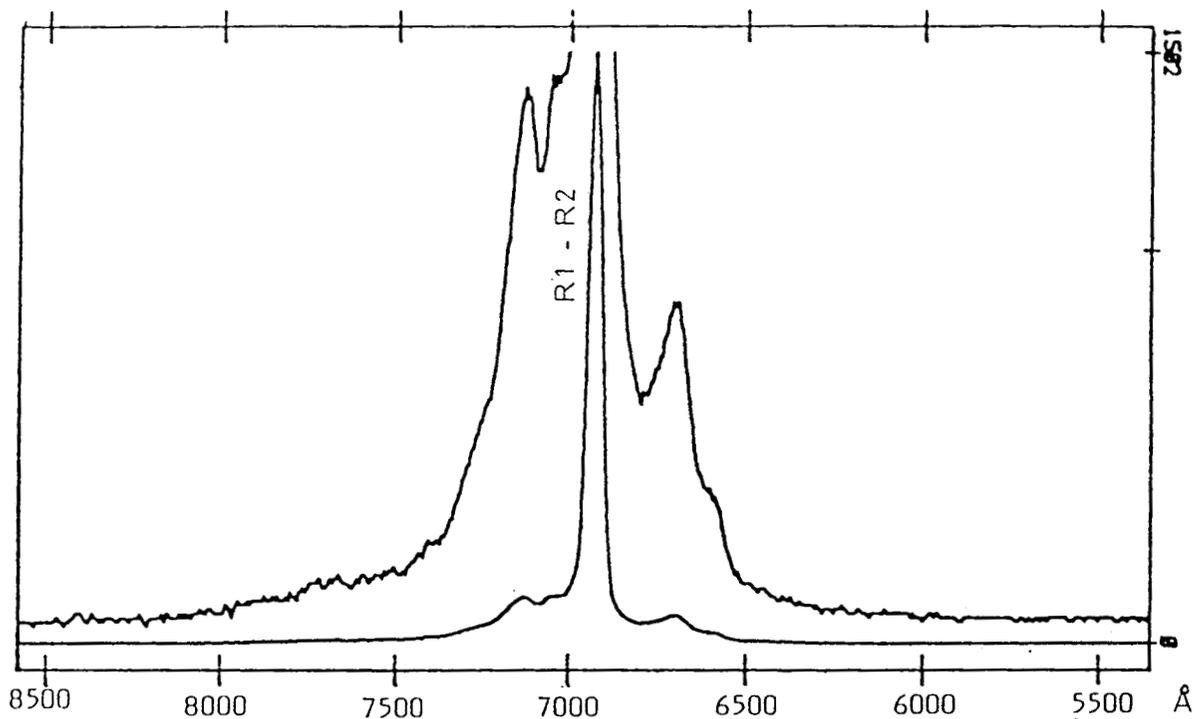
Ces spectres ont été enregistrés "in vivo" sans aucune préparation préalable de l'échantillon et sans endommager celui-ci. La très bonne résolution spatiale obtenue par la focalisation du faisceau laser autorise une analyse sélective des différentes vacuoles et permet une mise en évidence, sans équivoque, de la présence d'anthocyanes dans les vacuoles rouges.

- Résolution spectrale

Le fait de disposer d'un système de deux disperseurs dont notamment un réseau 1800 traits/mm, laisse présumer une utilisation de l'appareil pour des études spectroscopiques à structures plus fines que les bandes classiques d'émission de fluorescence. Aussi nous avons pensé dans un premier temps utiliser cet atout pour réaliser quelques études de fluorescences fines telles celles engendrées par les gemmes minéraux comme les rubis, alexandrites, spinelles etc...

Nous présentons, sur les figures (I-13.A et B) les spectres de fluorescence d'un rubis obtenus avec le réseau 300 traits/mm puis avec le réseau 1800 traits/mm respectivement.

A) Réseau 300 traits/mm



B) Réseau 1800 traits/mm

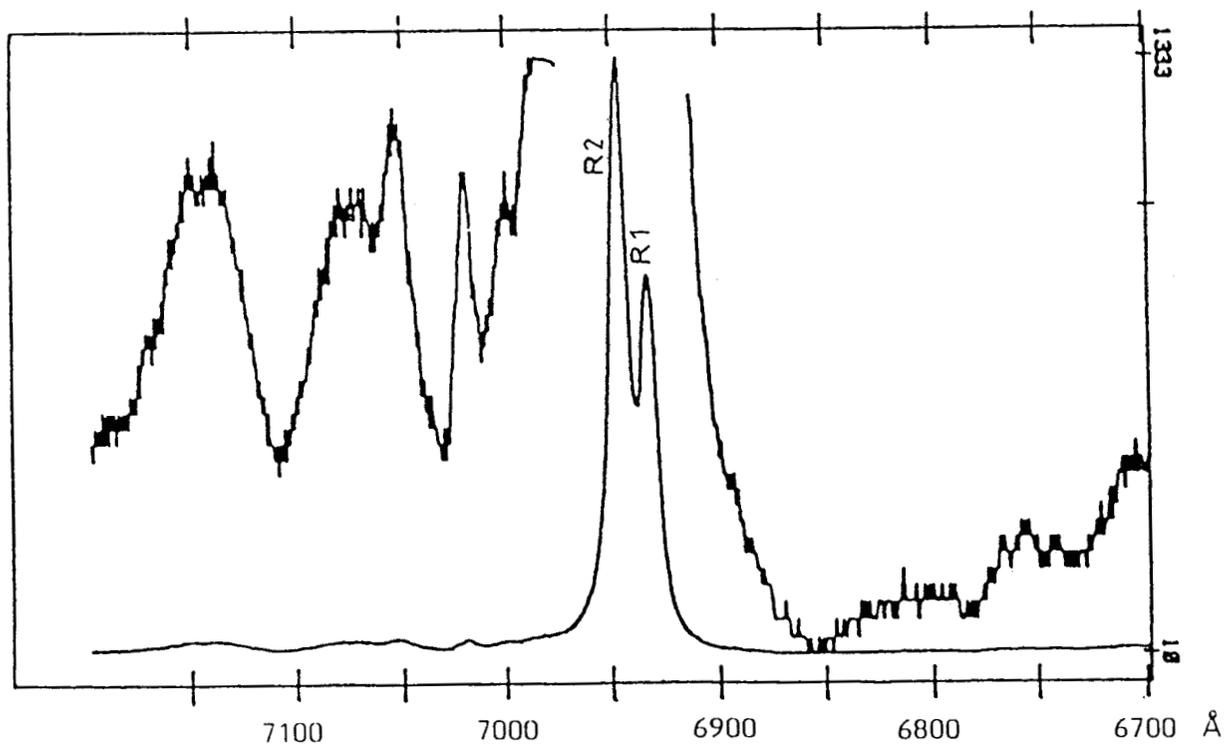


Figure I-13 : Spectres de fluorescence d'un rubis de synthèse (λ_{exc} 514,5 nm)

Si l'utilisation du réseau à faible dispersion permet de visualiser l'ensemble du spectre d'émission, la résolution est insuffisante pour résoudre l'ensemble des bandes caractérisant l'échantillon.

Avec le réseau 1800 traits/mm, les deux bandes d'émission (R_1 et R_2) du rubis sont résolues ainsi que les bandes de paires et de phonons qui les accompagnent [32].

b) Micro Raman

Nous pensons, que l'utilisation du réseau 1800 traits/mm, très intéressante pour l'étude de la fluorescence à bandes fines, aurait également permis d'utiliser l'appareil en tant que microspectromètre Raman Basse résolution.

Comme exemple d'application, nous présentons sur la figure (I-14) le spectre de diffusion Raman de l'aspirine.

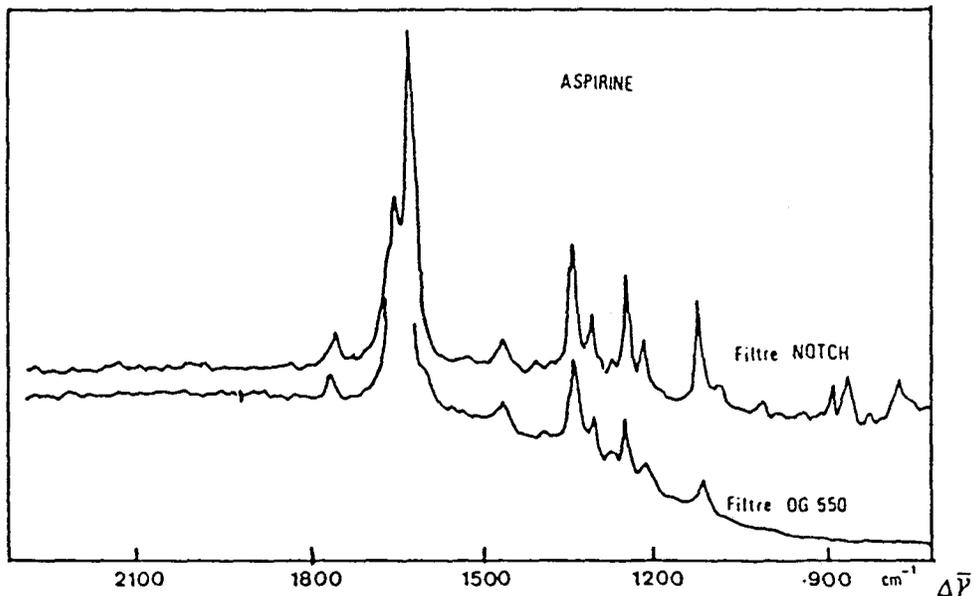


Figure I-14 : Spectre de diffusion Raman de l'aspirine

A) avec le filtre OG 550

B) avec le filtre NOTCH 514,4 nm

- Longueur d'onde d'excitation : 514,5 nm - Durée d'analyse : 4 Sec

- Puissance : 1,5 mW

Il apparait nettement que l'utilisation de filtres colorés (type OG) constitue une limite quant à l'étude de la diffusion Raman de basses et moyennes fréquences.

La bande passante de ces filtres n'est pas suffisamment sélective et ne permet pas d'étudier le spectre de vibration (diffusion Raman) en deçà de 1500 cm^{-1} de la radiation excitatrice.

L'utilisation du filtre NOTCH spécifique à la radiation à $514,5 \text{ nm}$ n'a pas amené les résultats escomptés et les études en diffusion Raman restent irréalisables en deçà de 800 cm^{-1} de la radiation excitatrice (Fig I-14).

c) Microabsorption

Comme nous l'avions énoncé précédemment (cf : I.1), la possibilité d'éclairer l'échantillon en lumière blanche par transmission, permet d'utiliser le microspectrofluorimètre en tant que microspectrotomètre d'absorption visible pour l'étude d'échantillons suffisamment transparents.

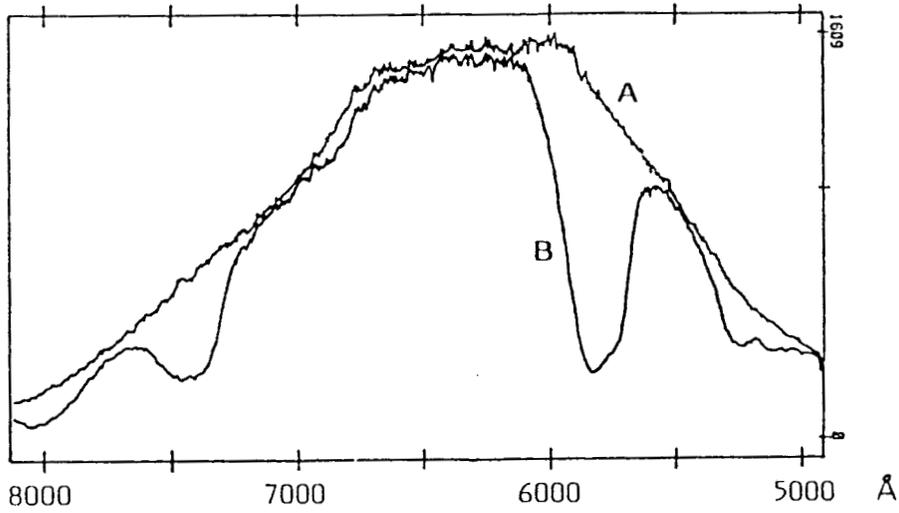
Le domaine spectral étudié, limité par le spectre d'émission de la lampe quartz-halogène et la transmission de l'appareil, s'étend de 400 à 800 nm .

Le spectre de transmittance d'une lame de verre au Néodyme a pu être enregistré. Nous présentons sur les figures (I-15-A,B,C) :

- Le spectre d'émission (A) de la source quartz-halogène obtenu après mise au point du microscope à la surface d'une lame de verre transparente.
- Le spectre de transmission (B) de la lame de verre au Néodyme après mise au point du microscope à la surface de celle-ci.
- Le spectre de transmittance de la lame de verre au Néodyme, obtenu en faisant le quotient des deux spectres précédents (B/A) après normalisation de ceux-ci.

Figure I-15 : Spectre de transmittance du verre au Néodyme
Spectrophotomètre classique

- A) Spectre d'émission de la lampe quartz-halogène
- B) Spectre de transmission de la lame de verre au Néodyme



C) Spectre de transmittance du verre au Néodyme
Microspectrotomètre (B/A)

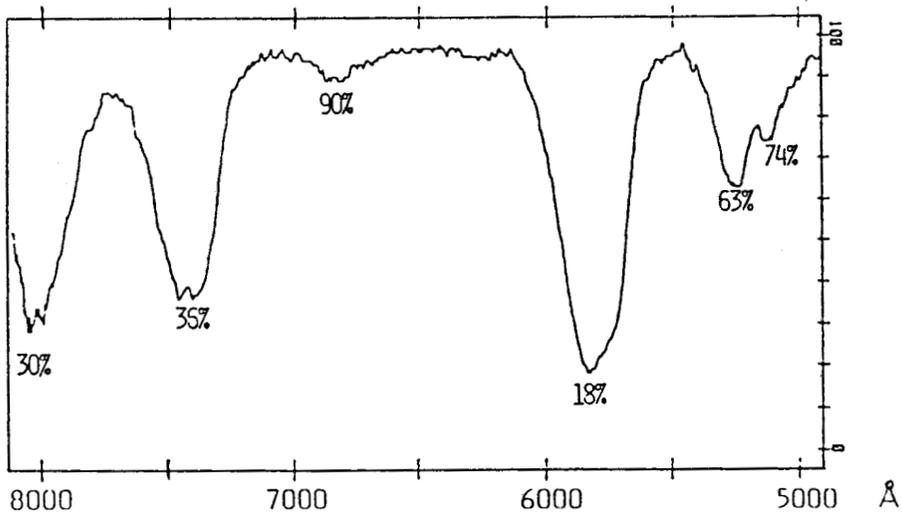
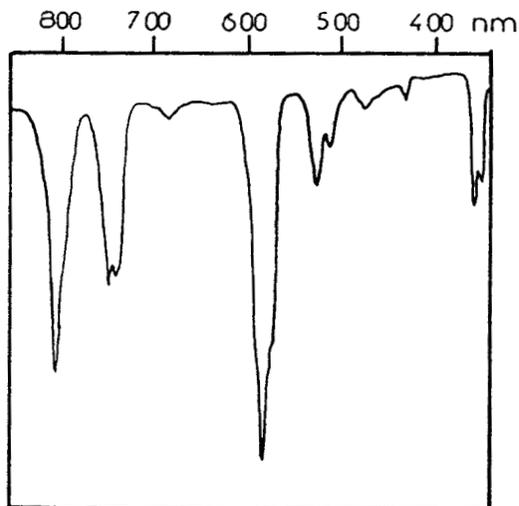


Figure I-16 : Spectre de transmittance du verre au Néodyme
Spectrophotomètre classique (Jobin YVON)



Pour cette application la totalité du champ microscopique est utilisée pour l'enregistrement. Nous pouvons remarquer que les taux de transmission et la résolution sont comparables à ceux obtenus en analyse conventionnelle. La figure I-16 représente le spectre de transmittance de la lame de verre au Néodyme étudiée, obtenu sur un spectrophotomètre UV-visible classique (Jobin Yvon).

Dans ce cas précis, où la géométrie du matériau est parfaitement définie, des mesures à la fois qualitatives et quantitatives peuvent être envisagées. Il n'en est pas de même lors de l'étude d'échantillons hétérogènes où la structure du matériau traversé nuit fortement aux mesures quantitatives.

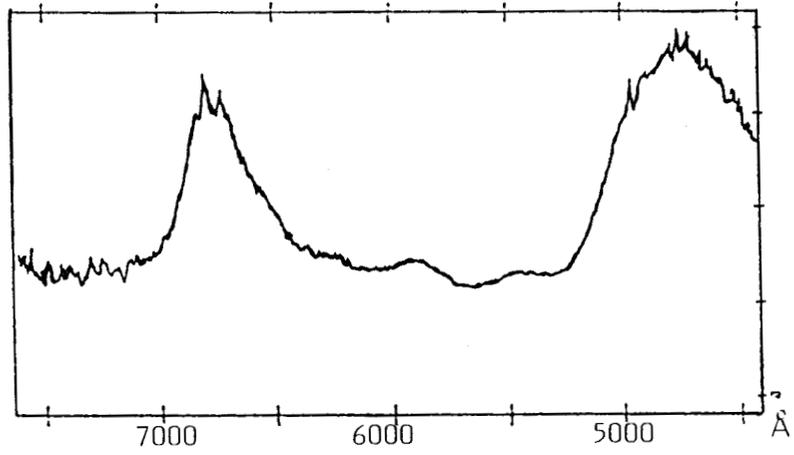
Toutefois, des mesures qualitatives restent tout à fait possibles dans un grand nombre de domaines et complètent efficacement les résultats obtenus par d'autres techniques d'analyse photonique, entre autres, la fluorescence.

Sur la figure (I-17), nous présentons les spectres d'absorption enregistrés à partir de différentes vacuoles d'une feuille de "Zébrina pendula" (cf fig. I-12.A et B).

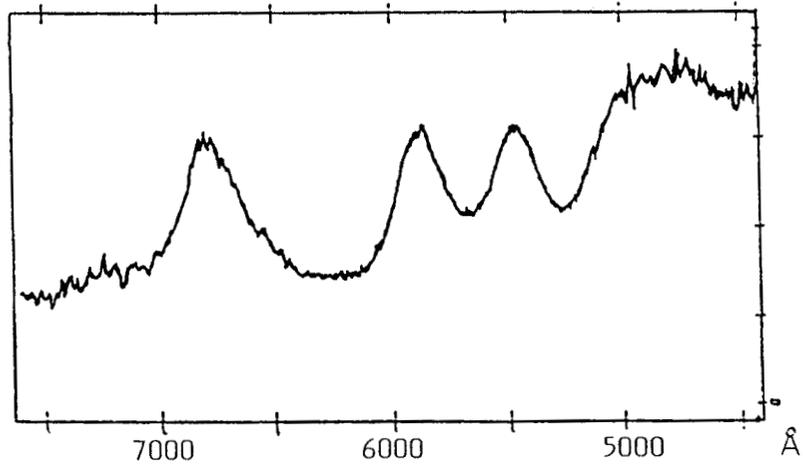
Nous remarquons que :

- Les bandes d'absorption des chlorophylles sont observées dans les spectres enregistrés au niveau des vacuoles jaunes et rouges au centre de la feuille.
- Le spectre obtenu au niveau d'une vacuole rouge située au centre de la feuille fait apparaître les bandes d'absorption dues aux anthocyanes.
- Dans les vacuoles rouges près du bord de la feuille, seules les bandes d'absorption des anthocyanes sont observées.

A) *Vacuole jaune au centre de la feuille*



B) *Vacuole rouge au centre de la feuille*



C) *Vacuole rouge au bord de la feuille*

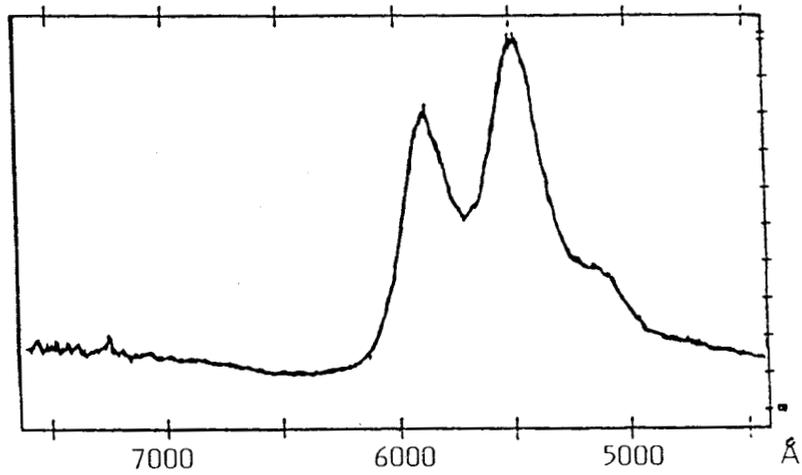


Figure I-17 : Absorption de "Zebrina Pendula"

Le diaphragme de champ, placé sur le trajet des faisceaux diffusés ou émis, trouve ici tout son intérêt, il permet en effet de délimiter la portion de l'échantillon effectivement observée par le détecteur. Toutefois, la résolution spatiale obtenue dans ces conditions est bien moindre que celle qu'il est permis d'atteindre avec une source Laser. On ne peut pas envisager de telles analyses sur des échantillons dont les dimensions sont inférieures à une vingtaine de microns. Ces dimensions sont imposées par la taille minimale de l'iris (800 μm) et le grandissement entre le plan objet et le plan image du microscope (objectif et optique de transfert).

Le spectre d'absorption, *in situ*, des anthocyanes contenus au bord de la feuille de "Zebrina pendula", correspond parfaitement à celui obtenu en solution, à pH neutre, après broyage des feuilles et extraction des anthocyanes (Fig. I.18).

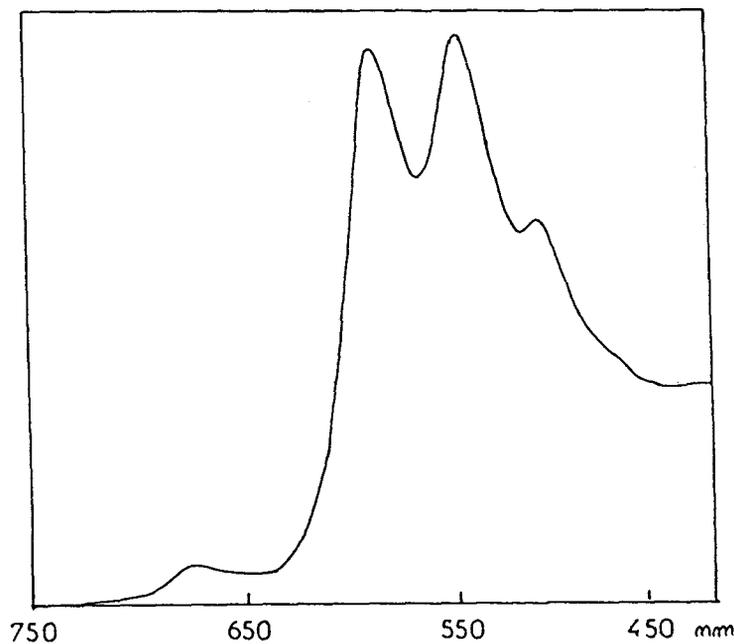


Figure I-18 : Spectre d'absorption des anthocyanes extraits d'une feuille de "Zebrina pendula" à pH 6 spectrophotomètre conventionnel (Jobin Yvon)

I-3 : Analyse critique des performances du premier prototype de microspectrofluorimètre

La plupart des performances du premier prototype de microspectrofluorimètre cadrent parfaitement avec nos exigences premières, à savoir :

- la possibilité d'enregistrer, à faible puissance d'excitation, avec des temps d'irradiation relativement courts des signaux lumineux de faible intensité issus de volumes micrométriques.

Toutefois, quelques problèmes dus essentiellement au filtrage de la radiation excitatrice, imposent une limite à certains domaines d'investigations.

- Fluorescence parasite :

Nous avons vu précédemment (fig. I-10) qu'une bande parasite apparaît dans le cas de l'étude de la fluorescence à très bas niveau. Plusieurs sources peuvent être mises en cause :

- fluorescence du tube capillaire ou du support,
- fluorescence du filtre d'arrêt de type OG,
- phénomènes de diffusion des pièces optiques,
- taux de lumière parasite lié à l'instrument.

Il apparaît que la fluorescence du filtre OG contribue de façon prépondérante à cette émission parasite. Nous avons représenté sur la figure (I-19) le spectre de fluorescence du filtre OG 515, disposé à la place de l'échantillon, sous l'objectif de microscope.

Le profil de cette bande est retrouvé lors de l'étude d'échantillons réfléchissants ou nécessitant des puissances d'excitation ou des temps d'intégration relativement élevés.

- Longueur d'onde d'excitation : 488 nm

- Durée d'analyse : 0,2 Sec

- Puissance : 10 μ W

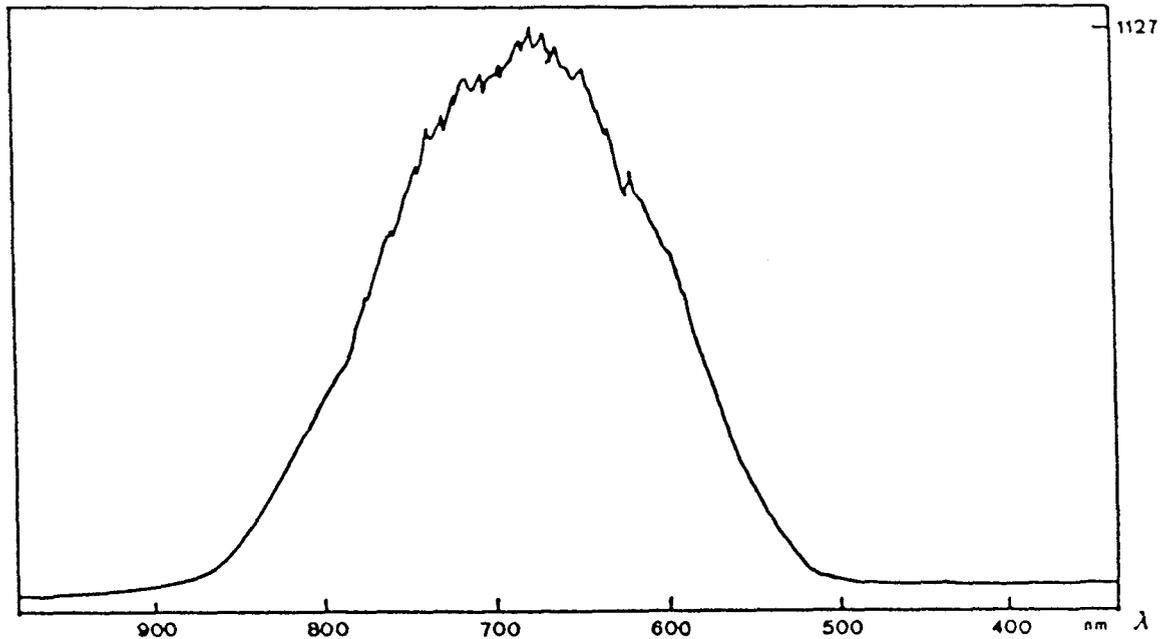


Figure I-19 : Spectre de fluorescence du filtre OG 515

- Sélectivité des filtres d'arrêt

Au problème de la fluorescence des filtres d'arrêt, s'ajoute celui du manque de sélectivité de ceux-ci. Ce second problème aura pour effet, outre d'interdire toutes études en spectroscopie Raman de basses et moyennes fréquences, de modifier la forme de la bande de fluorescence, en accentuant la dissymétrie du côté des courtes longueurs d'onde.

Les figures (I-20-A,B,C) représentent la bande d'émission d'une solution de fluoresceine excitée successivement par les radiations à 457,9-488-514,5 nm. Nous avons fait apparaître sur ces figures la bande passante du filtre d'arrêt relatif à la longueur d'onde d'excitation utilisée.

L'intensité de la radiation excitatrice a été considérablement amplifiée ($\times 10^6$) de manière à pouvoir, malgré son atténuation, être visualisée vis-à-vis du spectre de fluorescence.

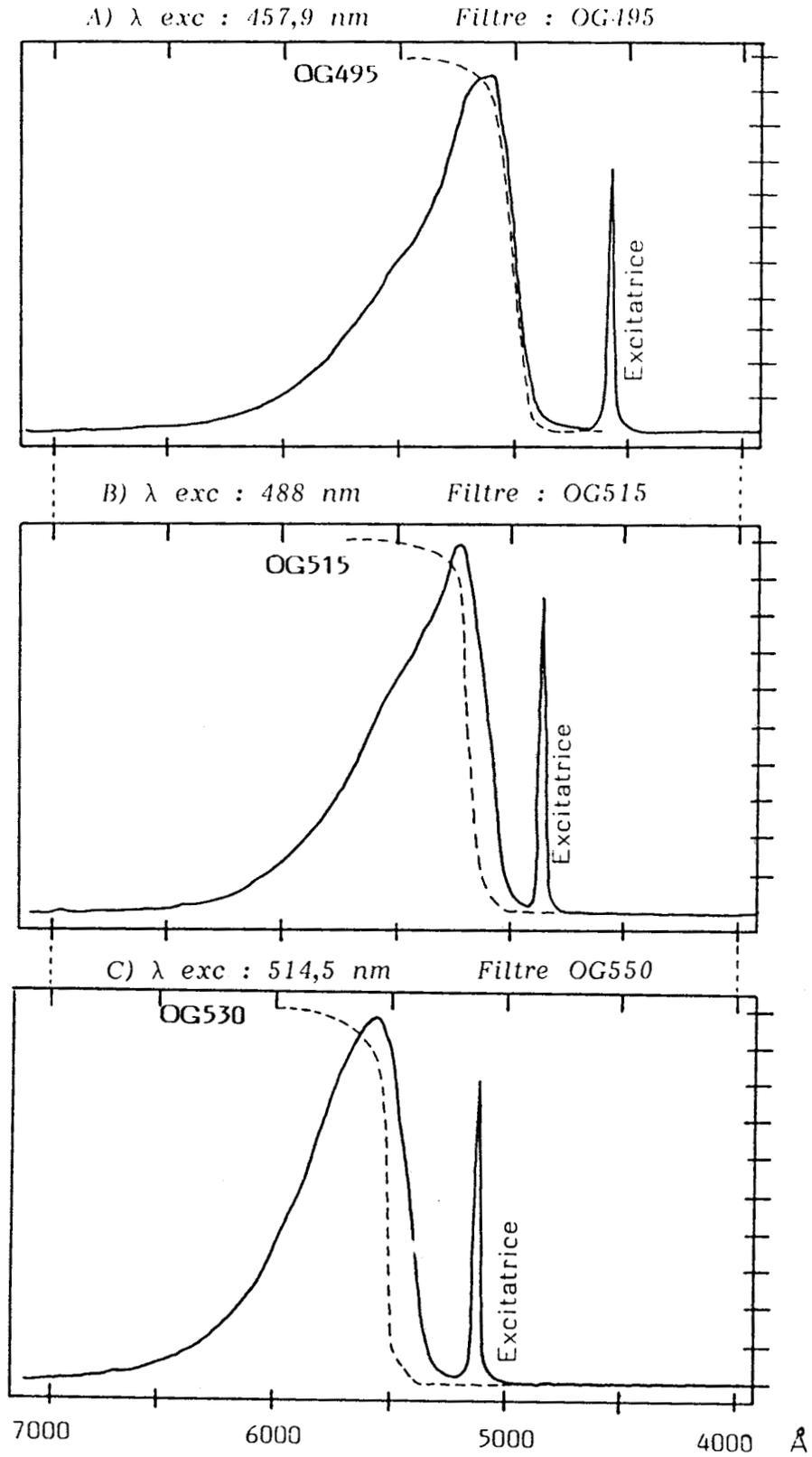


Figure I-20 : Influence des filtres d'arrêt sur la forme de la bande d'émission de la fluoresceine

Nous présentons, sur la figure (I-21) le spectre de fluorescence d'une solution de fluoresceine excitée à 488 nm, mais enregistré sur un appareil équipé de deux étages dispersifs (Microsonde Raman MOLE).

Au vu des résultats obtenus, il apparaît que le choix de la radiation excitatrice devra être établi selon deux critères essentiels :

- le premier est bien entendu que sa longueur d'onde corresponde à une bande d'absorption du fluorophore étudié,
- Le second est que le filtre d'arrêt relatif à cette longueur d'onde ait une bande passante adaptée au spectre d'émission du fluorophore.

En cas de non respect de ce second critère, le spectre d'émission de fluorescence sera fortement modifié et des erreurs pourront être commises quant à la détermination de la forme de la bande et du maximum d'émission.

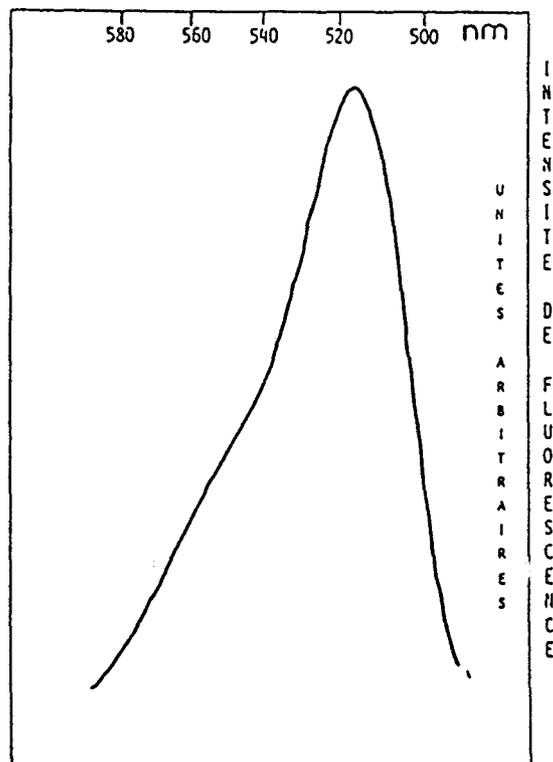


Figure I-21 : Spectre d'émission de la fluoresceine - Microsonde MOLE λ_{exc} : 488nm

C'est autant pour éviter les problèmes dus aux filtres d'arrêt que pour réduire le taux de lumière parasite lié à l'utilisation d'un simple monochromateur que le G.I.P. a envisagé en 1985 l'élaboration d'un second prototype capable :

- de conserver les performances du précédent en limitant les inconvénients mentionnés ci-dessus,*

- d'élargir le champ d'application au domaine du proche Ultra-Violet.*

CHAPITRE II - LE SECOND PROTOTYPE DE MICROSPECTROFLUORIMETRE

II-1 : Description de l'appareil

Nous nous contenterons dans le cadre de ce travail de présenter succinctement l'instrument, la description détaillée de celui-ci a fait l'objet de la thèse de J.P. Cornard. [21]

La photo I-4 donne une vue d'ensemble de l'appareil.

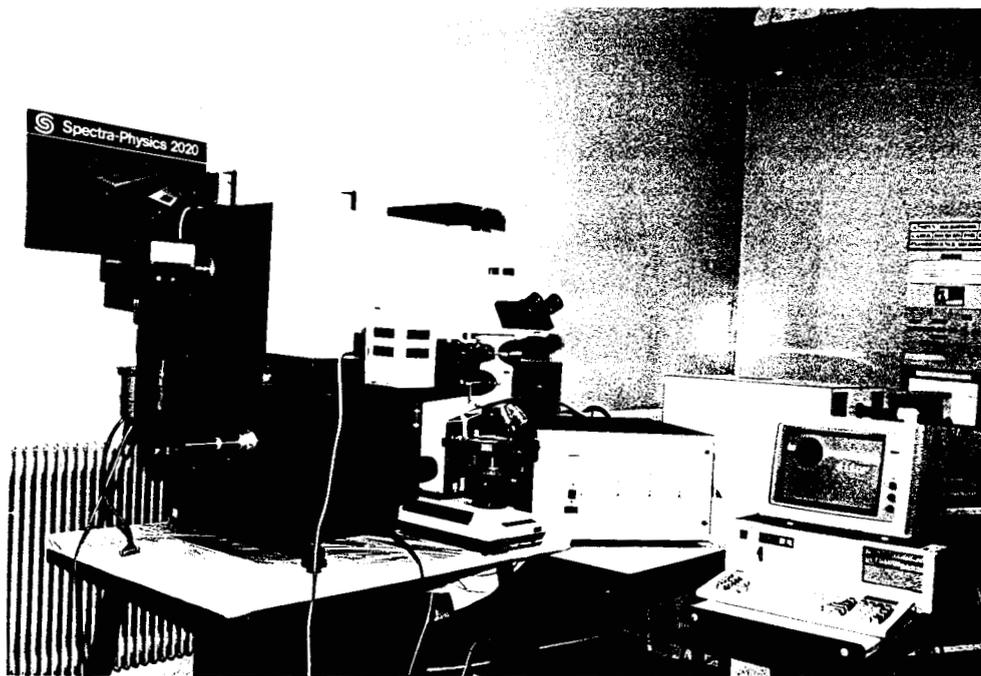


Photo I-4 : vue d'ensemble de l'appareil

La configuration de base de l'instrument comprend :

- une source d'excitation laser, constituée d'un laser argon ionisé dans le domaine du visible et d'un laser He-Cd dans le proche UV (λ_{exc} 325 nm).

- Un microscope de fluorescence (olympus BH2) équipé d'un épi illuminateur UV, d'objectifs UV et d'un éclairage en lumière blanche par transmission.

- Une optique à miroirs destinée au couplage entre le microscope et le spectrographe. Cette optique est inspirée de celle utilisée dans le premier prototype les lentilles étant remplacées par des miroirs concaves pour permettre d'étendre les possibilités d'excitation dans le proche UV.

- Un spectrographe composé d'un triple monochromateur comportant trois étages identiques de types Czerny-Turner [33]. Les deux premiers étages, servant de prémonochromateur à dispersion nulle (montage soustractif) remplacent avantageusement les filtres colorés du premier prototype.

- Un système de détection multicanale identique à celui du premier prototype mais équipé d'une fenêtre en saphir pour une utilisation dans le proche UV.

- Un système d'acquisition et de traitement de l'information spectrale issue du détecteur contrôlé par un microordinateur IBM PC AT.

Cet instrument a été conçu de manière à permettre l'enregistrement de spectres de fluorescence à basse dispersion et de diffusion Raman à moyenne résolution. Pour cela, deux types de disperseurs sont utilisés :

- un jeu de trois prismes (Flints extra denses Réf : SF55)
- un jeu de trois réseaux holographiques plans 1800 traits/mm.

L'originalité de l'appareil réside dans la conception de l'arbre supportant les disperseurs. En effet, cet arbre unique supporte les trois réseaux de diffraction et les trois prismes. Le changement de dispersion s'effectue par une translation de l'arbre parallèlement à son axe, alors que le positionnement des images spectrales au niveau du détecteur est obtenu par une rotation de l'arbre autour de son axe (Fig I-22).

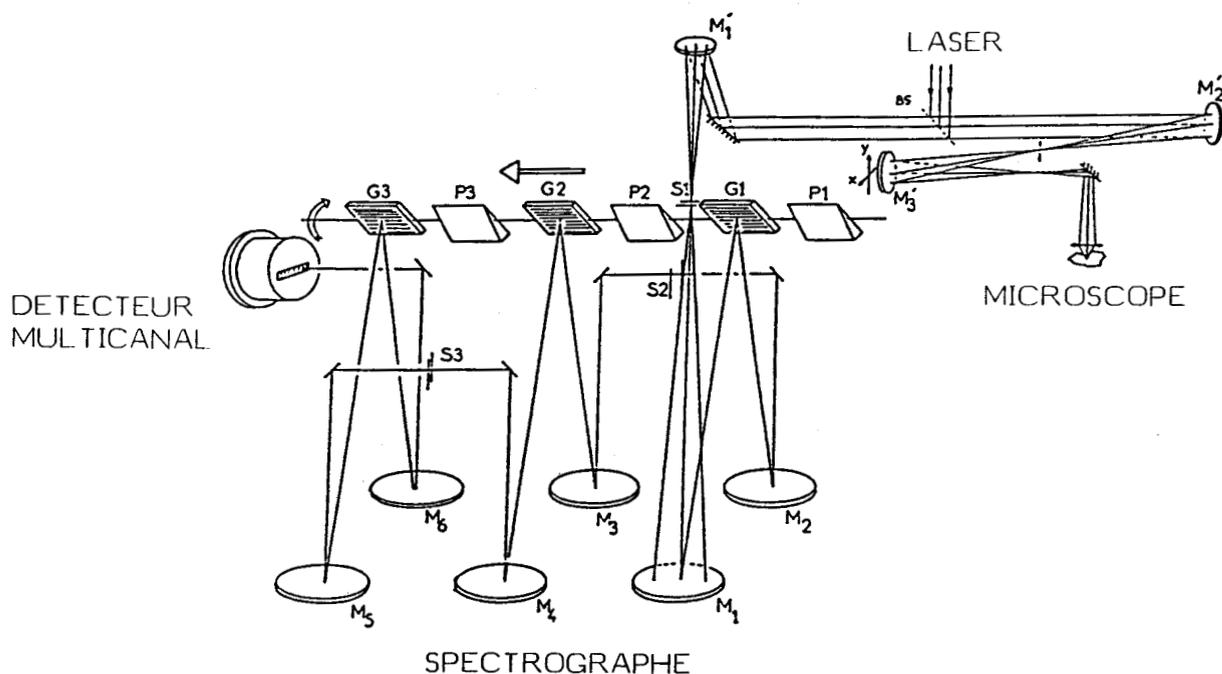


Figure I-22 : Schéma synoptique du spectrographe

Le tableau I-2 donne pour les deux systèmes dispersifs, le champ spectral observé au niveau du détecteur et la résolution obtenue en fonction de la longueur d'onde au centre de la barette de photodiodes.

Système dispersif	λ au centre du champ	Valeurs extrêmes du champ	Champ total	Résolution
Prismes	nm	nm	nm	nm/diodes
	500	420 à 690	270	0,5
	550	450 à 850	400	0,8
	600	480 à 1140	660	1,3
Réseaux	nm		cm^{-1}	$\text{cm}^{-1} / \text{mm}$
	500		520	42
	600		350	28
	700		250	20

Tableau I-2 : champ théorique au niveau du détecteur pour diverses longueurs d'onde centrales, résolution par diode.

II-2 : Tests préliminaires de l'appareil

Les résultats obtenus permettent de constater que les performances de ce prototype correspondent bien aux objectifs qui avaient été définis, à savoir, une grande sensibilité, une meilleure réjection de la lumière parasite et la possibilité d'excitation dans le proche UV.

a) Fluorescence

- Excitation dans le visible

La figure I-23 représente le spectre d'émission d'une solution de fluoresceine (10^{-11} M) excitée par la radiation à 488 nm du laser à argon ionisé.

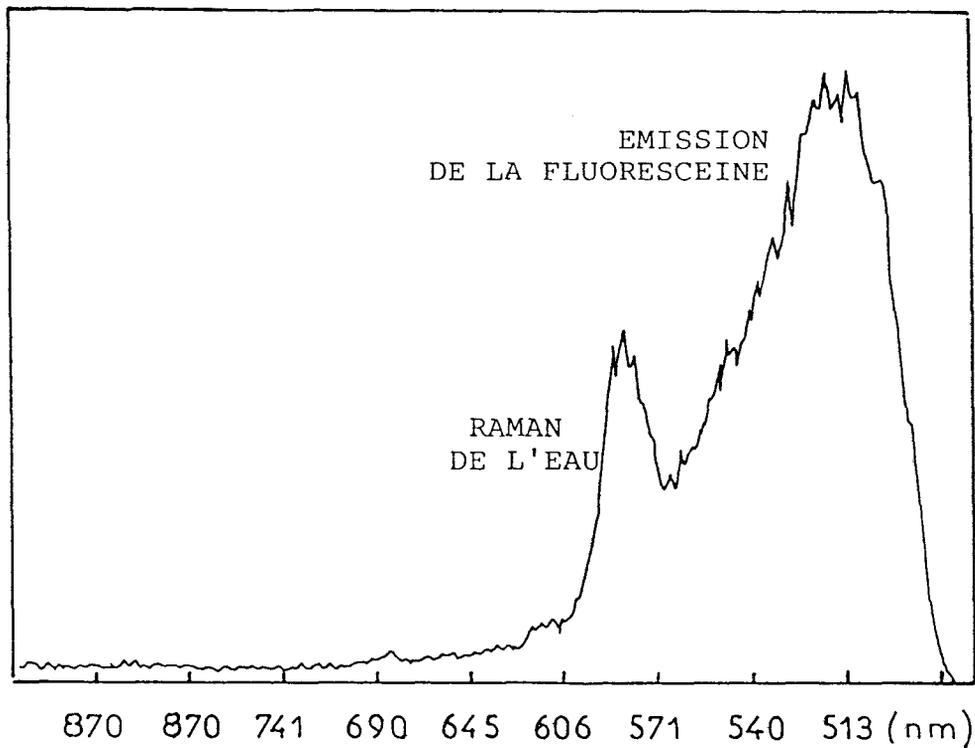


Figure I-23 : Spectre de fluorescence d'une solution
 10^{-11} M de fluoresceine (pH 7)

- λ exc : 488 nm - Puissance : 50 μ W - Durée : 10 Sec

On remarque que :

- la bande de fluorescence de la fluoresceine n'est pas déformée.

- Le spectre obtenu n'est pas perturbé par des émissions parasites (fluorescence des filtres d'arrêt, lumière parasite du spectrographe).

- le système de filtrage de la radiation excitatrice constitué par le prémonochromateur a permis d'abaisser le seuil de détection par rapport au premier prototype. Ce gain de sensibilité (X 10) est essentiellement dû à une diminution du taux de lumière parasite et au fait que la fluorescence du filtre d'arrêt est éliminée.

- Excitation dans l'UV

Le spectrographe est pourvu d'optique en verre ce qui interdit l'analyse de l'émission de fluorescence dans le domaine de l'ultra-violet au-delà de 350 nm.

La figure I-24 représente le spectre d'émission d'une solution 10^{-5} M de benzo(a)pyréne dans le méthanol. Cette solution, excitée à 325 nm émet dans le domaine du visible.

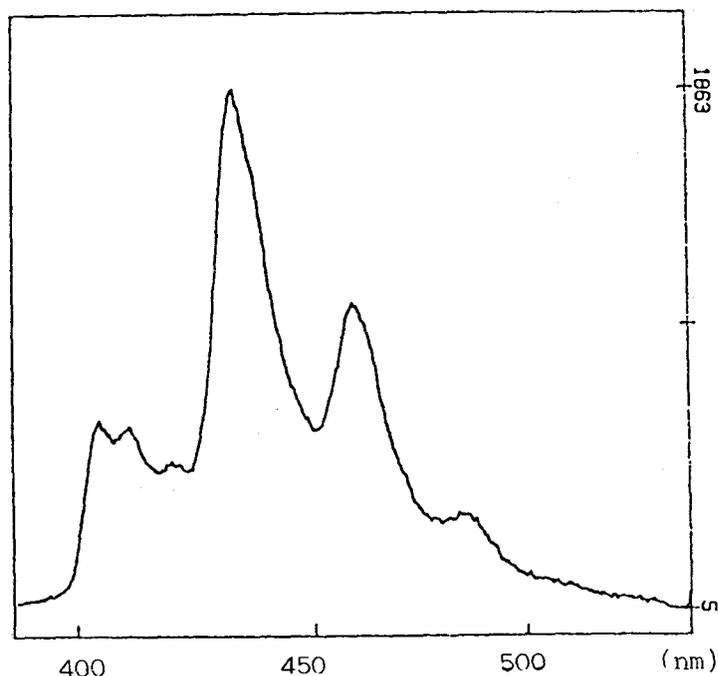


Figure I-24 : Spectre de fluorescence du benzo(a)pyréne (10^{-5} M), Exc à 325 nm
- Objectif : X40 - Puissance : $8\mu\text{w}$ - Spectre : 0,2 Sec - 40 accumulations

La grande sensibilité de l'instrument permet d'obtenir ce spectre avec une puissance d'excitation de quelques microwatts au niveau de l'échantillon et un temps d'intégration relativement court (0,2 Sec).

b) Diffusion Raman

Un des objectifs de ce second prototype est de pouvoir envisager l'enregistrement de spectres de diffusion Raman de basses fréquences.

Nous présentons sur la figure I-25 le spectre de diffusion Raman de l'aspirine entre 20 et 550 cm^{-1} excité par la radiation 488 nm du laser argon ionisé.

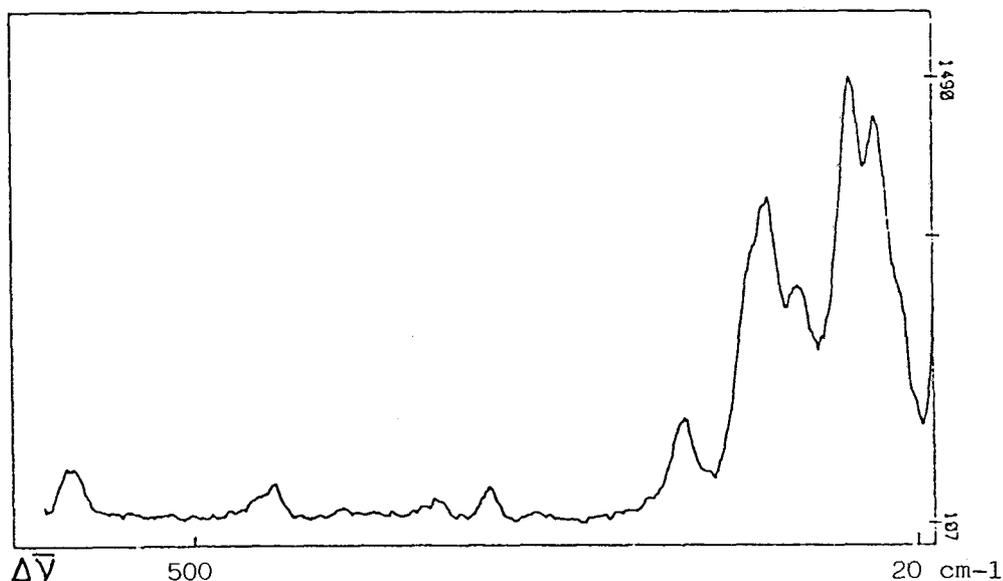


Figure I-25 : Spectre de diffusion Raman de l'aspirine

- Objectif : X20 - 0,7 mW à l'échantillon - Temps d'intégration : 2 Sec

Comme nous pouvons le constater le prémonochromateur double soustractif permet d'accéder aux basses fréquences du spectre de diffusion Raman de l'aspirine.

Les spectres enregistrés en diffusion Raman sont tout à fait comparables à ceux obtenus sur un microspectromètre Raman classique.

c) Absorption

L'appareil développé autorise l'enregistrement de spectres d'absorption par utilisation de la source quartz halogène, la gamme spectrale d'utilisation est identique à celle du premier prototype.

CHAPITRE III : MICROSPECTROMETRE MULTI-FONCTIONS

Tous les laboratoires qui, depuis 1928 ont essayé de faire du Raman ont eu l'occasion de se heurter à l'émission de fluorescence. Aussi, de nombreux chercheurs ont soumis l'hypothèse de disposer d'un appareil unique capable d'analyser à la fois la diffusion Raman et l'émission de fluorescence. Toutefois, alors qu'un spectre de fluorescence couvre en général plusieurs centaines de nanomètres, la partie Stokes d'un spectre Raman n'excède guère 3500 cm^{-1} (soit 88 nm pour une longueur d'onde de 500 nm). Cette différence dans les domaines spectraux à analyser nécessite donc un instrument équipé d'un système dispersif approprié à chacun des phénomènes à observer. En 1985, T. Hirschfeld signale qu'aucun instrument de ce type n'existe encore [34].

Les tests préliminaires, réalisés sur les deux premiers prototypes développés par le G.I.P. mettent en évidence la faisabilité d'un tel appareil.

Aujourd'hui, pour satisfaire le besoin de l'analyste de disposer d'un appareil unique permettant, au niveau microscopique, plusieurs types d'analyses complémentaires, la société Dilor en collaboration avec le G.I.P., a été amenée à concevoir une nouvelle génération de microspectrophotomètres, soit les microspectromètres multi-fonctions.

Un tel appareil a été développé par la société DILOR dans le cadre d'une convention entre le Ministère de l'Intérieur et le CNRS, afin de répondre aux besoins d'analyse locale non destructive de la Police Scientifique [35,36,37].

Ce prototype est un instrument très polyvalent, sa configuration modulaire permet d'effectuer sur un échantillon de taille microscopique plusieurs types d'analyses qui nécessitaient jusqu'à présent le recours à différents appareils. Il est envisageable d'enregistrer, dans le domaine du visible :

- Le spectre de diffusion Raman en moyenne et haute résolution.
- Le spectre d'émission de fluorescence.
- Le spectre d'absorption électronique.
- Les spectres de réflexion diffuse et spéculaire.

III-1 : Description du microspectromètre multi-fonctions

La configuration de base de l'instrument a été obtenue par l'association d'un spectromètre Raman laser multicanal de type XY développé par la Société Dilor et d'un monochromateur d'excitation de type MS également développé par Dilor. La photo I-5 représente une vue d'ensemble de l'appareil.

A) Microspectromètre XY B) Monochromateur d'excitation MS

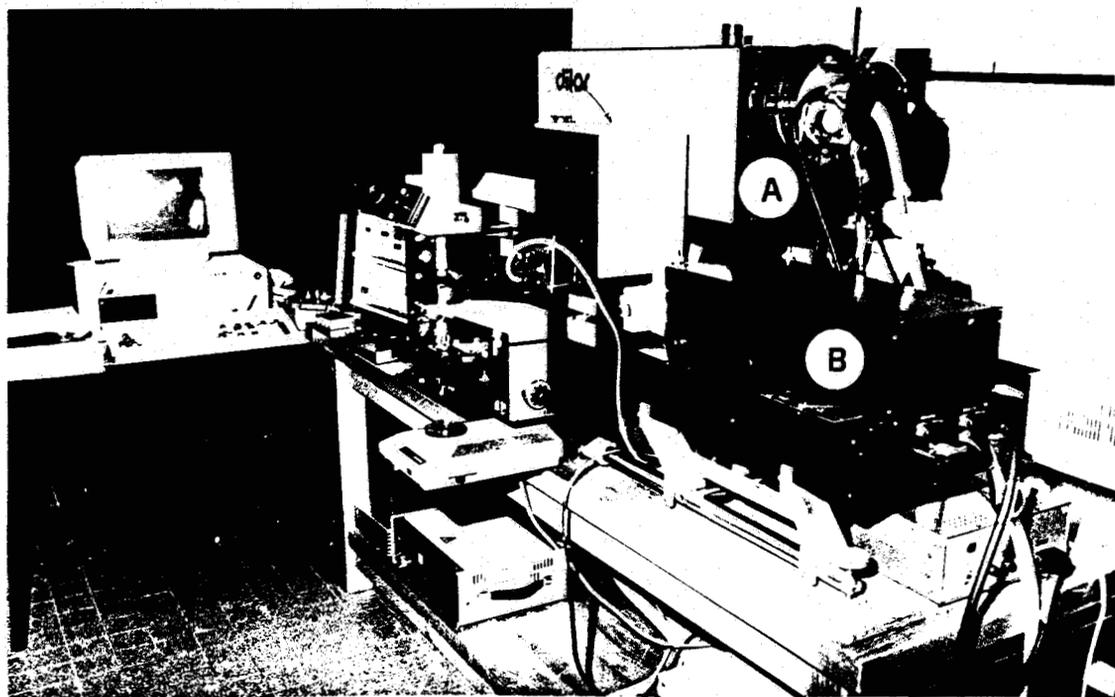


Photo I-5 : Vue d'ensemble de l'appareil

L'instrument, dont le schéma synoptique est représenté sur la figure I-26 comprend :

- un microscope optique (Olympus BH2) permettant de focaliser la radiation excitatrice et de collecter la lumière issue de la zone analysée.

- un spectromètre associant un prémonochromateur à double étage et un spectrographe équipés de réseaux holographiques de 1800 traits/mm. Le prémonochromateur est soustractif ou additif.

Dans le mode soustractif, il joue le rôle de filtre optique, ce qui permet d'améliorer la réjection de la lumière parasite et donc d'observer des raies de basses fréquences avec une résolution proche de $0,9 \text{ cm}^{-1}$ par élément photosensible, dans le mode multicanal. Le mode additif augmente la dispersion du spectromètre et autorise les études de diffusion Raman en haute résolution ($0,3 \text{ cm}^{-1}$ par diode).

- Un laser argon ionisé (Spectra Physics 162 AO7) émettant les radiations à 458, 488 et 514,5 nm.

- Un monochromateur d'excitation qui offre, dans le cas de la fluorescence et de la réflexion, plus de souplesse que le laser pour le choix de la radiation excitatrice. Ce monochromateur équipé de deux réseaux holographiques plans (300 et 1200 t/mm), interchangeable permet de sélectionner des bandes spectrales de largeur variable dans le spectre d'émission d'une lampe quartz halogène ou d'une lampe à arc mercure. Un système de fentes croisées réglables limite les dimensions du faisceau à la sortie du monochromateur et définit la largeur de la bande spectrale sélectionnée.

- Une tête de détection multicanale Dilor (réseau de 512 photodiodes intensifiées) dans le plan focal du spectrographe permet de couvrir simultanément un champ d'environ 450 cm^{-1} en analyse Raman moyenne résolution et de 150 cm^{-1} en haute résolution, pour une longueur d'onde centrale de 550 nm.

- Un premier photomultiplicateur placé en sortie du prémonochromateur est utilisé pour l'enregistrement de spectres d'émission de fluorescence.

- Un second photomultiplicateur, escamotable, disposé derrière la fente d'entrée du prémonochromateur est utilisé lors des études en microréflexion.

- Un système informatique (IBM AT) gère l'ensemble des fonctions de l'instrument telles que détections, positionnement des disperseurs, acquisitions et traitement des informations spectrales.

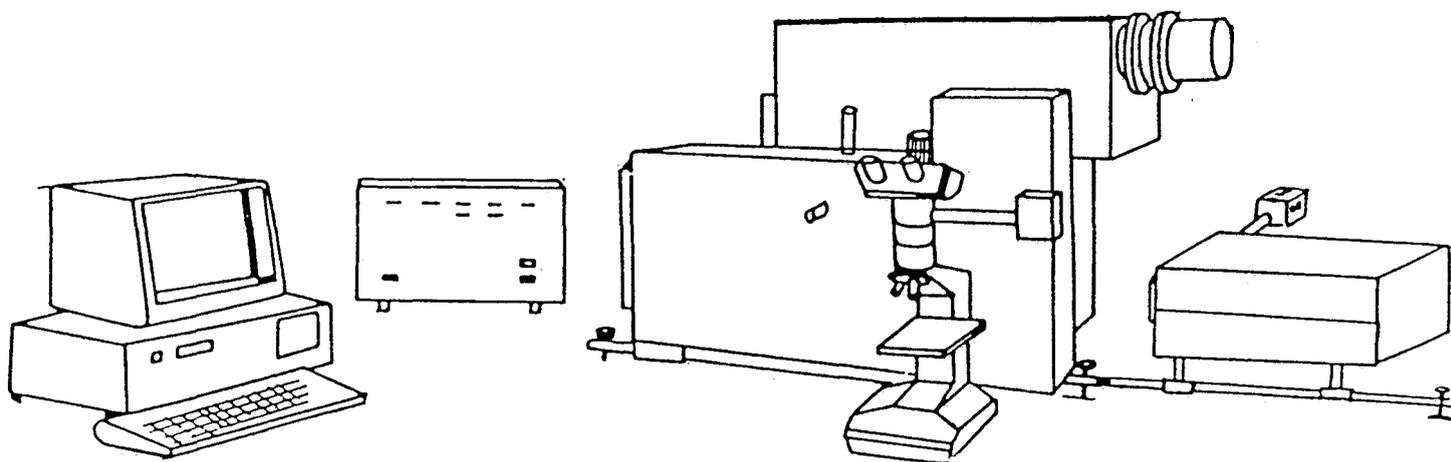


Figure I-26 : Schéma synoptique de l'instrument

III-2 : Mise en oeuvre du microspectromètre multi-fonctions [27,38]

Ce prototype de microspectromètre multi-fonctions a, avant sa livraison au laboratoire de Police Scientifique, fait l'objet de nombreux tests. Ces tests développés dans le cadre du G.I.P. ont permis à la fois de mettre en évidence les performances de l'appareil et d'améliorer ses caractéristiques en fonction du besoin des utilisateurs. Nous nous contentons au niveau de ce mémoire de donner quelques exemples d'applications qui situent l'instrument vis-à-vis des deux appareils déjà présentés et donnent un aperçu de ses capacités.

a) Diffusion Raman

Cet appareil dont la configuration principale est celle d'un spectromètre Raman, permet l'enregistrement de spectres de diffusion à moyenne et haute résolution ainsi qu'à très basse fréquence, avec un taux de lumière parasite extrêmement faible. Grâce aux exemples qui suivent, nous mettons en évidence les caractéristiques précédemment énoncées et présentons quelques particularités qui améliorent les performances de l'instrument.

Sur le schéma synoptique de la figure I-27 nous avons représenté la configuration de l'instrument qui permet l'enregistrement de spectres de diffusion Raman.

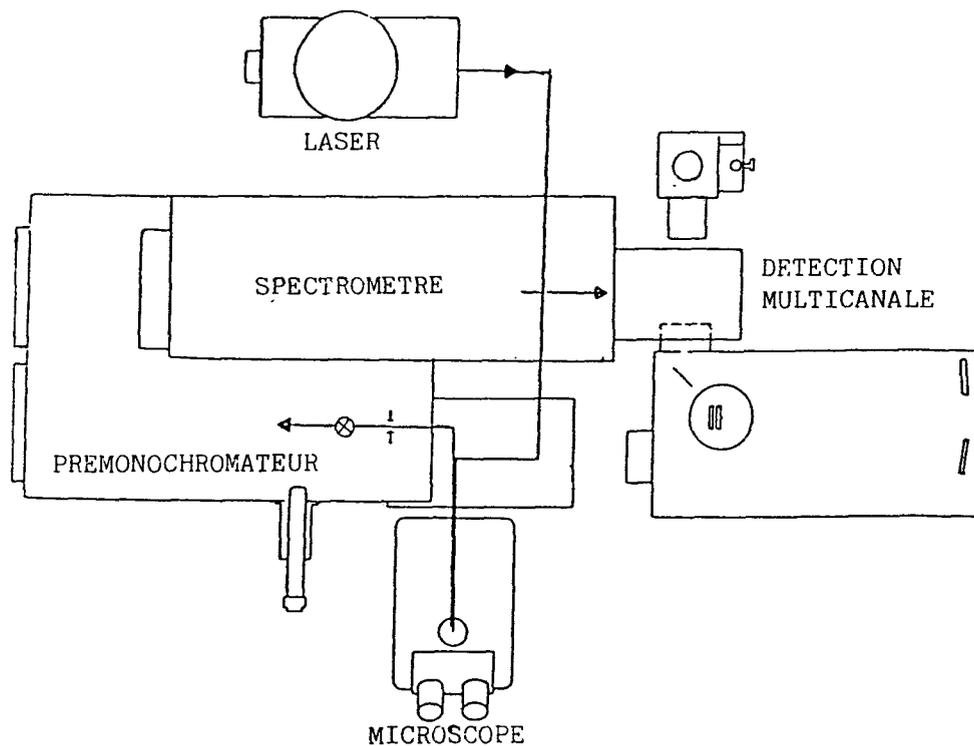


Figure I-27 : Diffusion Raman ; Schéma synoptique

- Elimination de la réflexion spéculaire

L'enregistrement de spectre de diffusion Raman de basses fréquences est souvent limité par une réflexion importante de la radiation excitatrice.

Ce phénomène est d'autant plus important sur les spectromètres à détection multicanale étant donné que ceux-ci ne sont pas pourvu de fente de sortie.

Pour pallier cet inconvénient nous avons eu recours à un système de caches escamotables (fig I-28) qui placé sur les trajets des faisceaux d'excitation et d'analyse permet d'éliminer quel que soit le mode de fonctionnement envisagé (Raman, fluorescence, réflexion, absorption), la réflexion spéculaire de la radiation excitatrice.

La figure I-29 montre l'efficacité du principe lors de l'enregistrement de la bande à 520 cm^{-1} du silicium ($\lambda \text{ exc } 514,5 \text{ nm}$). La raie concernée a été placée à une extrémité du champ observé par le détecteur de manière à pouvoir visualiser la remontée de la radiation excitatrice et les raies du plasma laser qui l'accompagnent.

x - Réflexion spéculaire

• - Réflexion diffuse

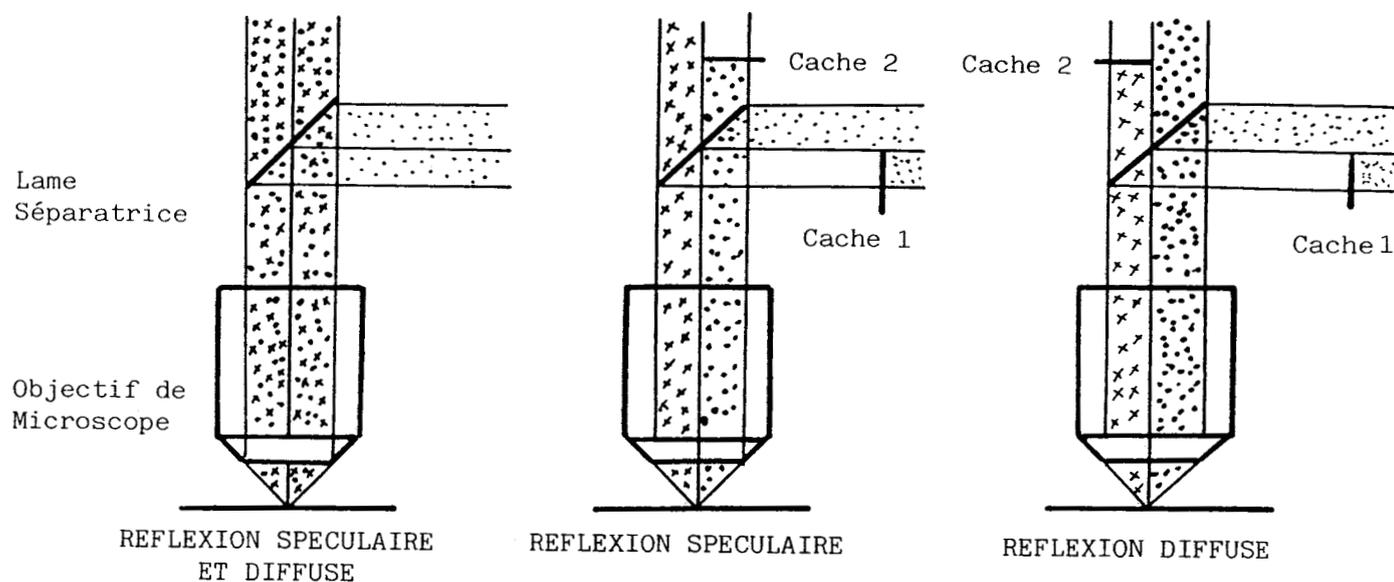
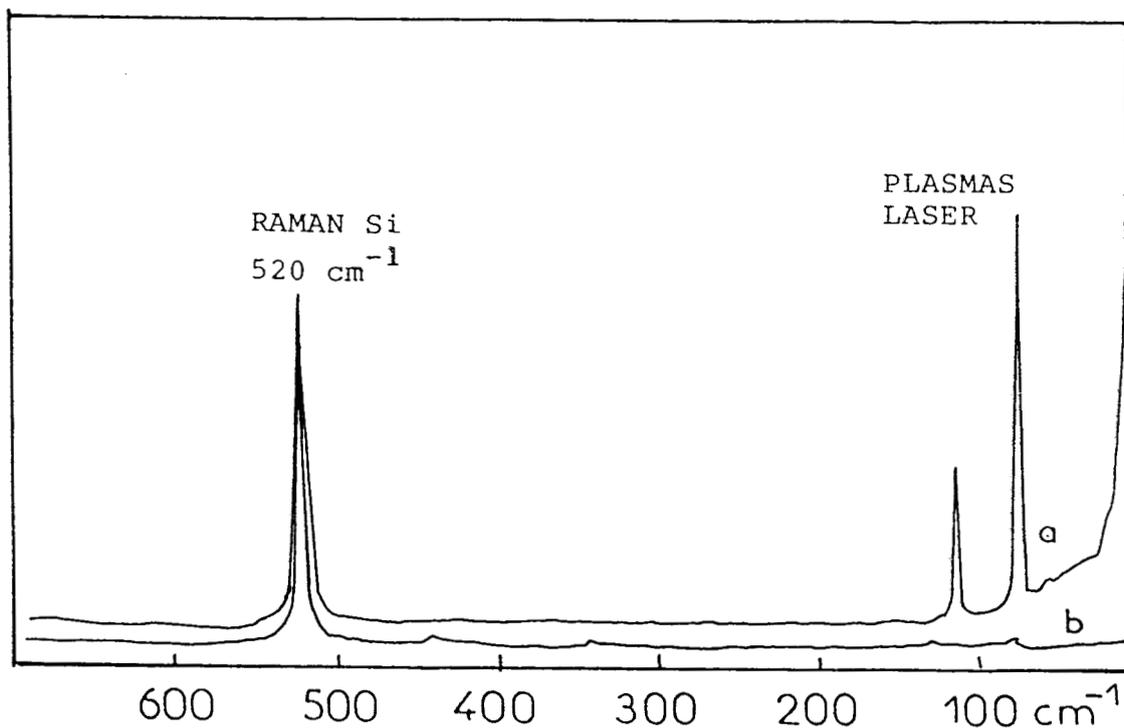


Figure I-28 : Système de caches permettant d'éliminer la réflexion spéculaire.

A) sans le système de caches

B) avec les caches



λ_{exc} : 514,5 nm Puissance : 10 mW Temps d'intégration : A) 1 Sec, B) 4 Sec

Figure I-29 : Spectre de diffusion Raman du Silicium (raie à 520 cm^{-1})

La présence des caches complémentaires sur les trajets d'excitation et de collection diminue le flux de lumière reçue par le détecteur d'un facteur proche de quatre, on peut toutefois compenser cette différence en augmentant ou le temps d'intégration ou la puissance d'excitation. On constate que le système éliminant la réflexion spéculaire permet l'enregistrement de spectres Raman à très basses fréquences, sans être gêné par la remontée de la radiation excitatrice ou par les raies parasites du plasma laser qui n'ont pas été supprimées par le filtre interférentiel.

- Modes moyenne résolution et haute résolution

Nous avons vu lors de la présentation de l'appareil que le prémonochromateur peut être utilisé selon deux géométries, soit le premier étage de celui-ci disperse la lumière issue de l'échantillon et le second la recombine sur la fente d'entrée du spectrographe, c'est le mode soustractif (moyenne résolution), soit les deux étages sont dispersifs et c'est le mode additif (haute résolution).

Un système optique (figure I-30) permet de passer facilement d'un mode à l'autre sans aucun réglage sauf l'adaptation de l'ouverture des fentes. Il est ainsi possible de tripler la dispersion du spectromètre en conservant pratiquement la même luminosité. Le fait qu'il soit nécessaire de travailler avec des fentes relativement larges dans le mode additif, limitera les études en basses fréquences, le taux de lumière parasite est alors trop important.

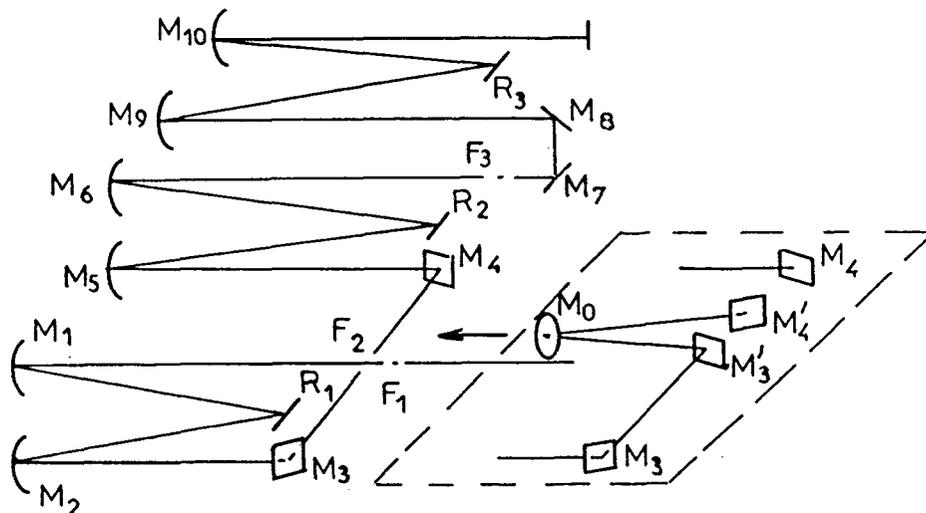
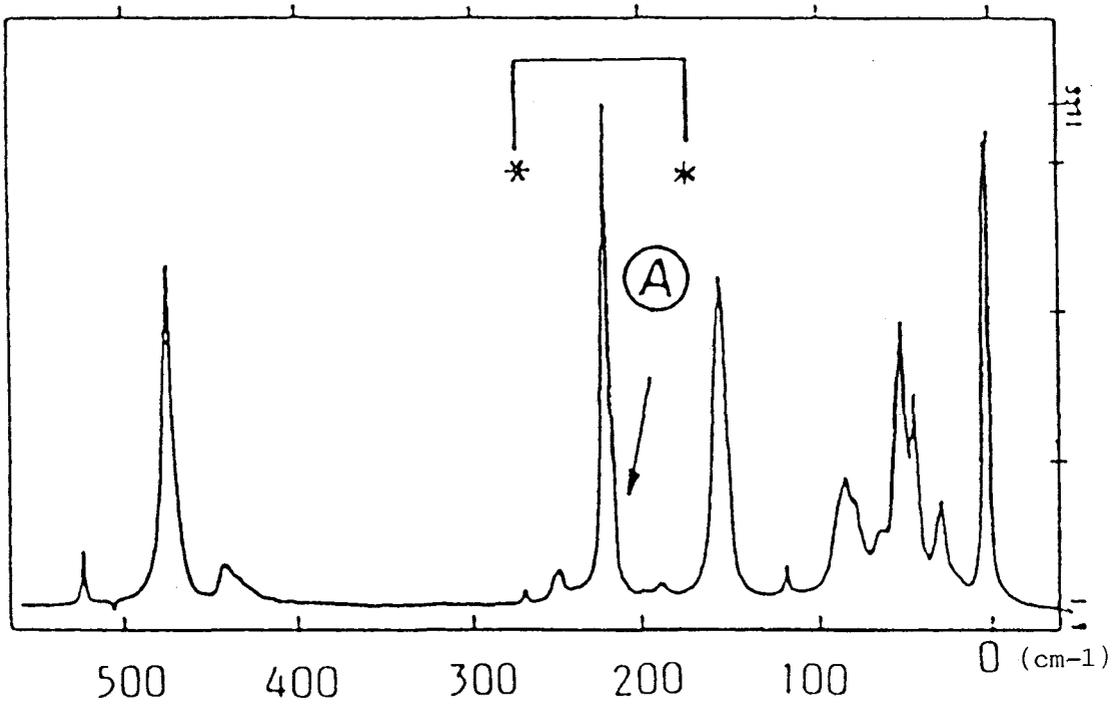


Figure I-30 : Passage Haute Dispersion

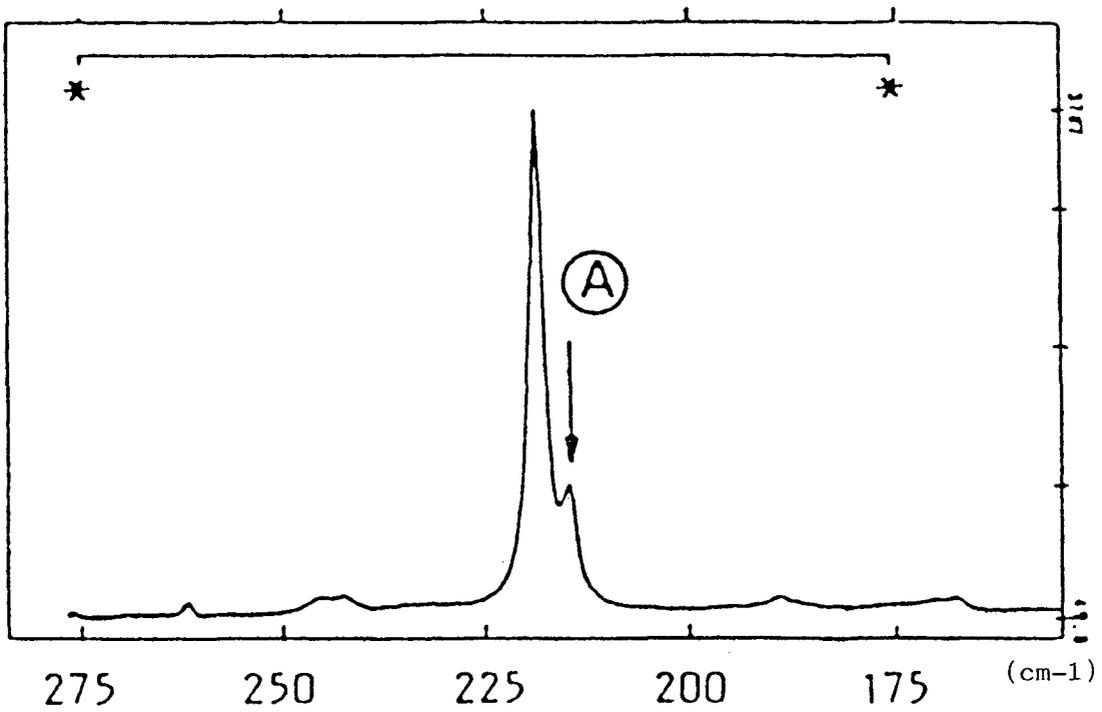
λ exc : 488 nm

Puissance : 13 mW

Temps d'intégration : 0,5 Sec



A) Mode soustractif (Résolution 0,9 cm⁻¹/diode)



A) Mode additif (Résolution 0,3 cm⁻¹/diode)

Figure I-31 : Spectre de diffusion Raman du soufre S8

Les figures (I-31 A et B) représentent le spectre de diffusion Raman d'un cristal de soufre enregistré selon les deux modes précédemment définis.

- Programme d'enregistrement automatique (MAR) et semi automatique (SAR) des spectres

Les qualités des détecteurs multicanaux sont bien connues des spectroscopistes, rapidité, sensibilité, reproductibilité. Toutefois, pour définir correctement un profil de bande, il est nécessaire de couvrir au minimum six éléments photosensibles du détecteur, ce qui signifie que pour de nombreuses applications, il n'est pas possible d'enregistrer l'ensemble du spectre de diffusion en une seule fois (un seul positionnement des disperseurs).

C'est pour pallier cet inconvénient que la Société Dilor a développé le programme MAR (Multichannel Automatic Recording). Deux programmes sont actuellement accessibles :

A) Mode automatique (MAR)

Ce programme permet un enregistrement automatique du spectre de diffusion Raman à partir de 100 cm^{-1} jusqu'à 4000 cm^{-1} de la radiation excitatrice. Les paramètres (temps d'intégration, nombre d'accumulations) sont fixés par l'utilisateur et l'unité spectromètre/calculateur enregistre le spectre, corrige l'échelle des intensités et coordonne les différentes gammes spectrales (positionnement successif des disperseurs).

Par mesure de sécurité, éblouissement du détecteur par la radiation excitatrice, la valeur minimale du nombre d'onde correspondant au premier positionnement des disperseurs a été fixée à 440 cm^{-1} au centre du champ observé.

B) Mode semi-automatique (S.A.R.)

Pour la même raison que précédemment, la borne inférieure du champ observé a été fixée à 100 cm^{-1} de la radiation excitatrice.

Toutefois, ce programme laisse la possibilité à l'utilisateur de sélectionner différentes gammes spectrales dans le domaine $100-4000\text{ cm}^{-1}$ sans avoir à enregistrer l'ensemble du spectre. Des paramètres différents (temps d'intégration, nombre d'accumulations) peuvent être pris pour chaque zone étudiée.

Le programme automatique, permettant une visualisation rapide de l'ensemble du spectre de diffusion est très pratique pour une étude préliminaire d'échantillons inconnus, il permettra la sélection des gammes spectrales intéressantes pour leurs caractérisations. Le programme semi-automatique complète cette première étude en mettant l'accent sur chaque zone sélectionnée.

Les figures I-32 et I-33 donnent un exemple d'utilisation de ces programmes.

λ exc : 514,5 nm Puissance : 10 mW
Enregistrement M.A.R.

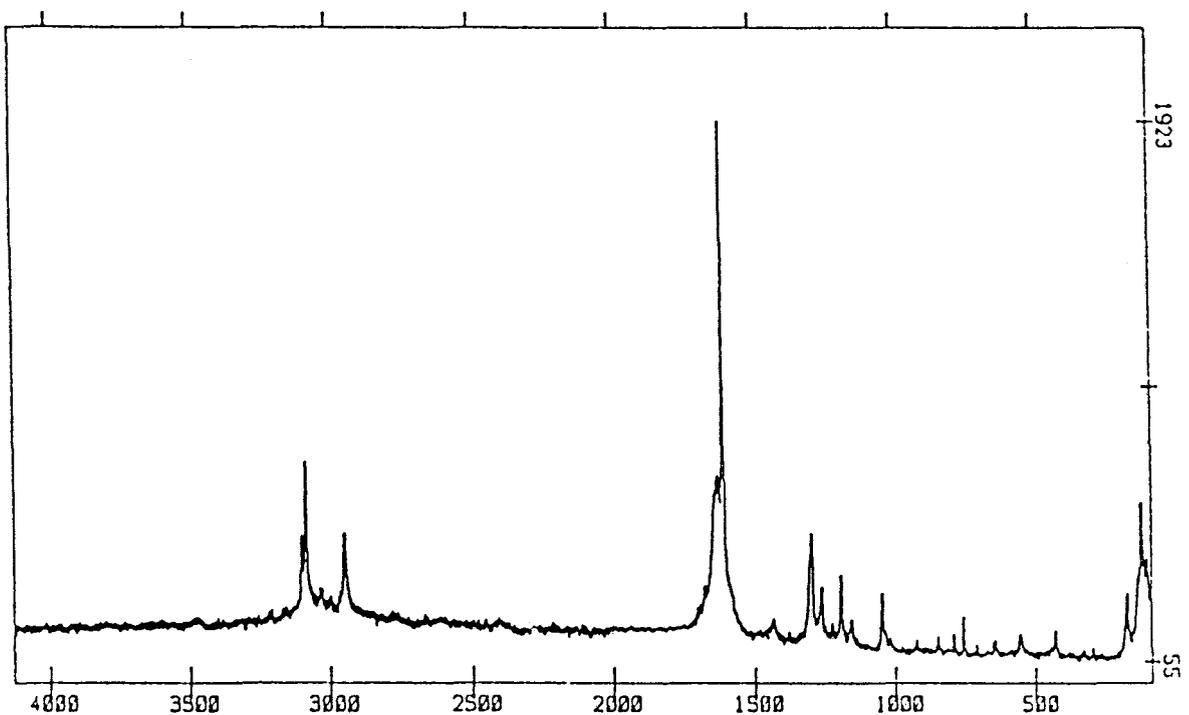


Figure I-32 : Spectre Raman de l'aspirine

λ exc : 514,5 nm Puissance : 10 mW
Enregistrement S.A.R.

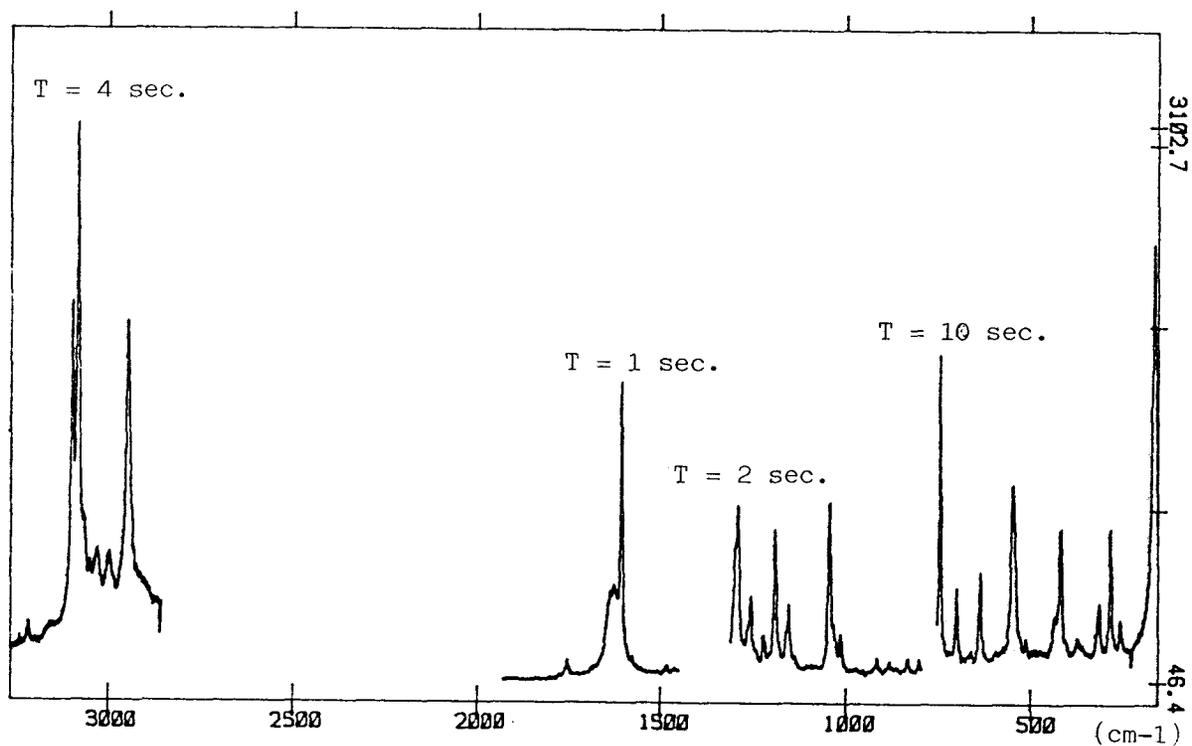


Figure I-33 : Spectre Raman de l'aspirine

Fluorescence

La configuration du microspectromètre multi-fonction, très bien adaptée à l'analyse de la diffusion Raman, n'autorise malheureusement plus l'utilisation d'un détecteur multicanal pour l'enregistrement de spectres de fluorescence.

Toutefois, l'analyse de l'émission de fluorescence reste envisageable grâce au photomultiplicateur placé en sortie du prémonochromateur.

La figure I-34 donne les diverses configurations permettant les études d'émission de fluorescence.

Le seuil de détection de l'instrument est du même ordre de grandeur que pour les deux appareils développés par le G.I.P. (solution 10^{-10} à 10^{-11} M pour la fluoresceine à pH 7), toutefois les performances d'analyse sont bien moindres que pour ces derniers. En effet, on perd ici, le bénéfice de la rapidité d'analyse, facteur d'intérêt pour l'enregistrement de spectres d'émission à partir d'échantillon photosensibles.

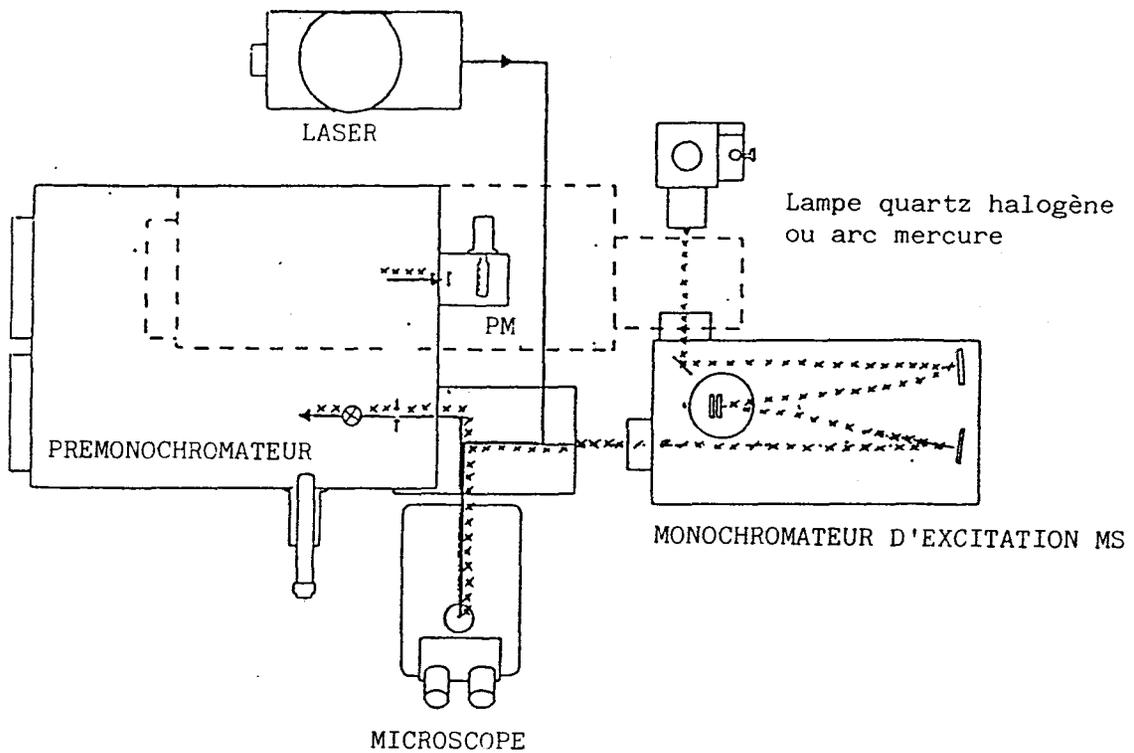


Figure I-34 : Fluorescence ; Schéma synoptique

Le fait de pouvoir sélectionner grâce au monochromateur d'excitation des bandes passantes issues d'une lampe à arc de mercure élargit de façon intéressante les possibilités quant au choix de la radiation excitatrice et permet ainsi d'envisager des études de profil d'excitation ou d'émission ou de fluorescence synchrone.

Nous donnons comme exemple d'application, une partie du spectre de fluorescence d'un microcristal d'oxyde d'Erbium excité par la radiation à 514,5 nm du Laser à argon ionisé (figure I-35). [35]

On montre ultérieurement qu'à partir de ce même microcristal d'oxyde d'Erbium, il est possible d'enregistrer le spectre d'absorption et le spectre de réflexion sans aucune modification de la mise au point sur la préparation (cf III-2.c et III-2.d).

De par les propriétés spectrales de cet échantillon, il est envisagé d'en faire un étalon pour la calibration de l'instrument.

λ exc : 514,5 nm Puissance : 0,5 mW à l'échantillon Durée d'analyse : 20'

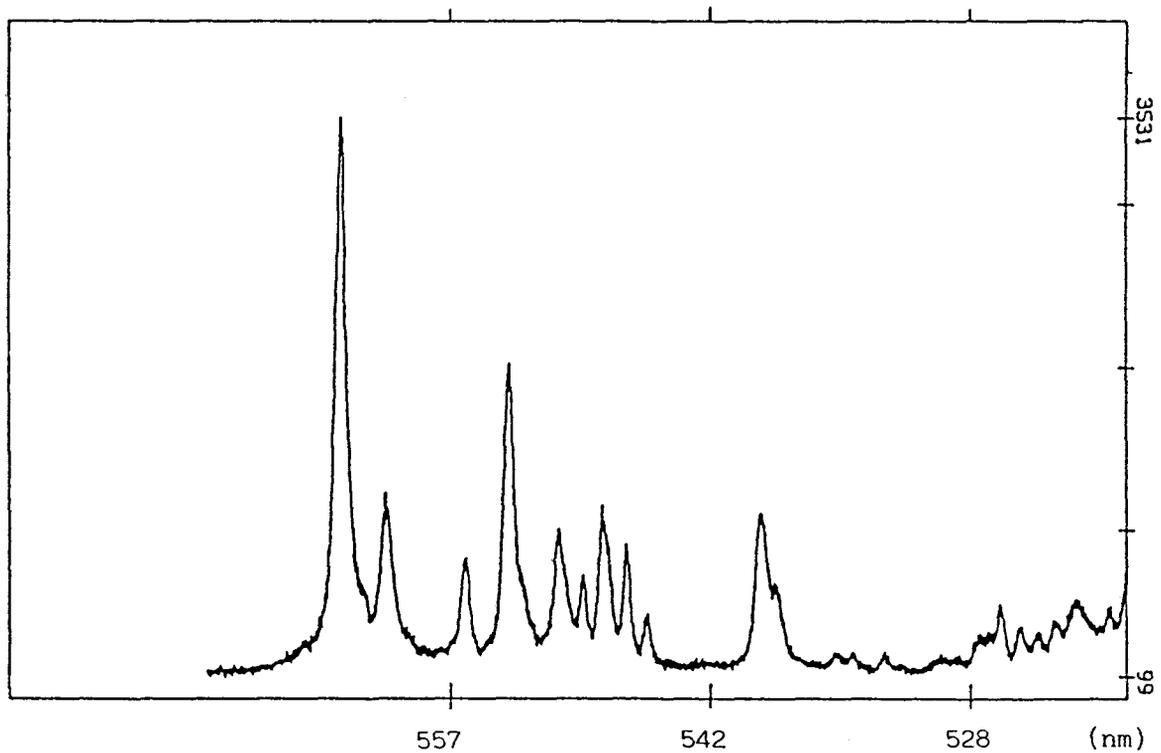


Figure I-35 Spectre de fluorescence d'un microcristal d'oxyde d'Erbium

c) Absorption

Un jeu de miroirs commutables, l'un sphérique et l'autre plan permet d'utiliser le monochromateur d'excitation pour des études d'absorption. On dispose ainsi de trois configurations possibles de l'appareil pour l'enregistrement de spectres de transmission ou d'absorption. Ces trois configurations sont basées sur le principe de la spectroscopie monocanale, un photomultiplicateur est utilisé pour la détection.

- Transmission simple passage :

Par utilisation de la lampe blanche par transmission du microscope. Cette façon de procéder devra être appliquée chaque fois que l'échantillon sera relativement épais et peu transparent. On excite l'échantillon en lumière polychromatique, on filtre la lumière transmise.

- Transmission double passage :

En utilisant le monochromateur d'excitation et un des miroirs réfléchissants. Dans ce mode d'utilisation, l'échantillon est excité en lumière monochromatique, la lumière transmise, captée sur le photomultiplicateur placé derrière la fente d'entrée du prémonochromateur, n'est pas filtrée.

Cette technique n'est applicable que lorsque les échantillons étudiés sont relativement transparents. Pour une meilleure efficacité du principe deux systèmes optiques permettant de par leur géométrie de doubler le taux d'absorption (l'échantillon est traversé deux fois) ont été retenus. Pour collecter et refocaliser le flux de lumière qui a traversé l'échantillon, le premier système associe le miroir plan au condenseur du microscope alors que le second utilise un miroir sphérique (\emptyset 40, F 40).

Les figures (I-36 A et B) schématisent les deux géométries adoptées.

Ces deux géométries sont complémentaires, en effet le système "miroir plan et condenseur" doit être utilisé chaque fois que l'objet à étudier est de petite taille et de très faible épaisseur, donc nécessite pour la mise au point, un objectif à grossissement relativement élevé (X50 ou X100).

- Miroir plan et condenseur

- Miroir sphérique

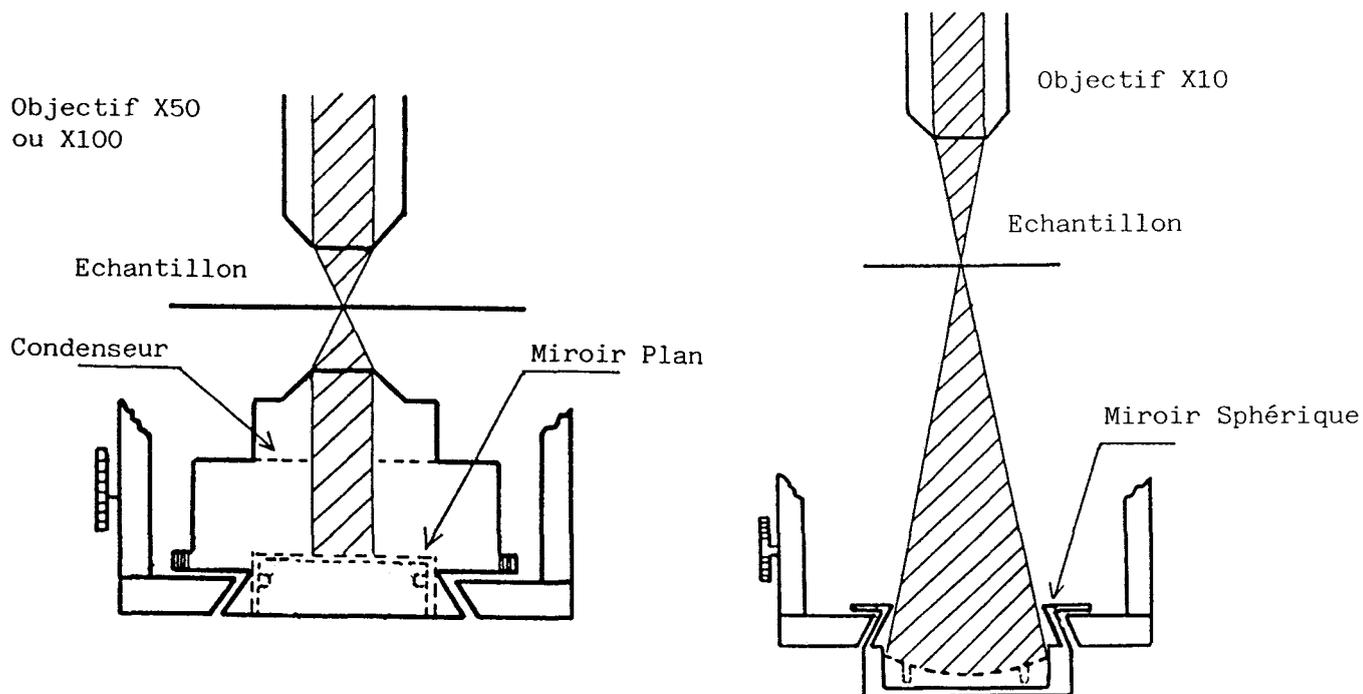


Figure I-36 : Systèmes permettant l'enregistrement de spectres d'absorption à partir du monochromateur d'excitation.

Par contre le système "miroir sphérique" se prête mieux à l'étude d'échantillons de taille et d'épaisseur moyenne nécessitant pour la mise au point un objectif de faible grossissement (X10).

Les limitations des deux techniques s'expliquent facilement si l'on considère les angles de collection des divers objectifs utilisés et ceux des deux systèmes optiques "condenseur et miroir plan" ou "miroir sphérique".

Le tableau I-3 permet de concrétiser ces limitations.

Objectif	O.N.	α en degrés
X100	0,95	143
X 50	0,75	97
X 10	0,25	29
Condenseur	1,25	140
Miroir sphérique	0 40,F 40	28

O.N. = Ouverture numérique

α = Angle total de collection

Tableau I-3 : Choix du système "miroir plan" ou "miroir sphérique" selon l'objectif de microscope en service.

La figure I-37 représente les diverses géométries de l'instrument permettant l'enregistrement de spectres d'absorption.

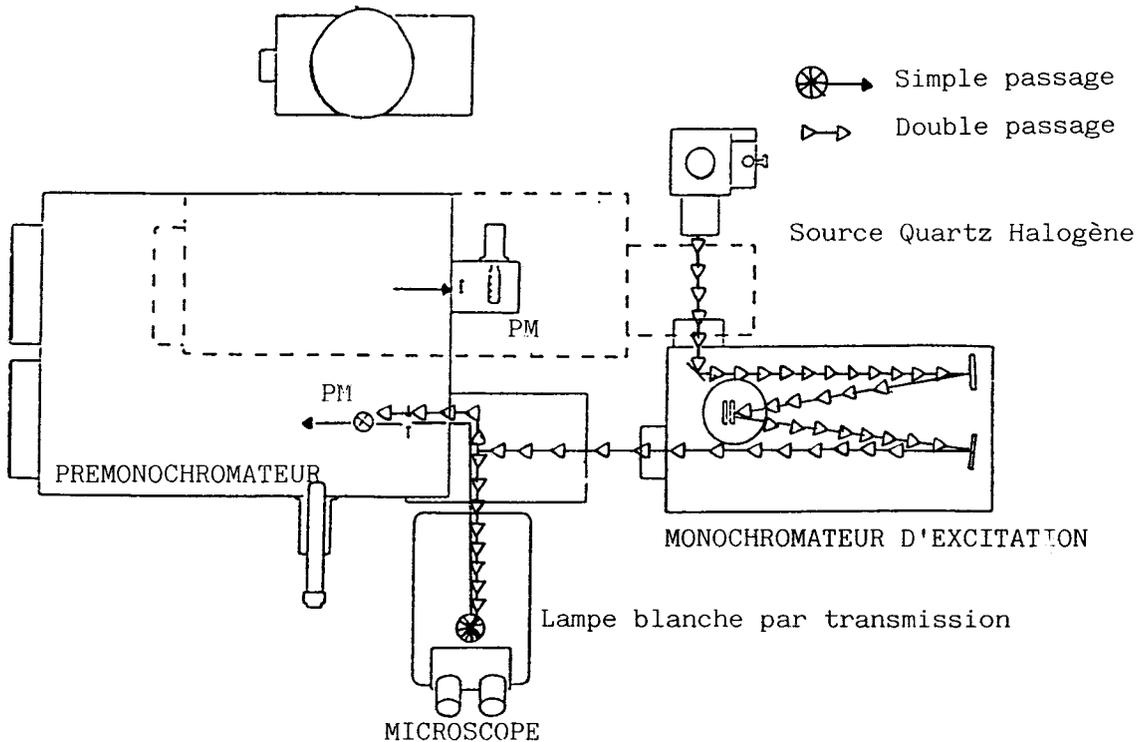


Figure I-37 : Absorption ; Schéma synoptique

Comme exemple d'application, nous présentons sur la figure I-38 le spectre d'absorption du microcristal d'oxyde d'Erbium.

Lampe par transmission du microscope
Durée d'analyse : 20' Objectif : X100

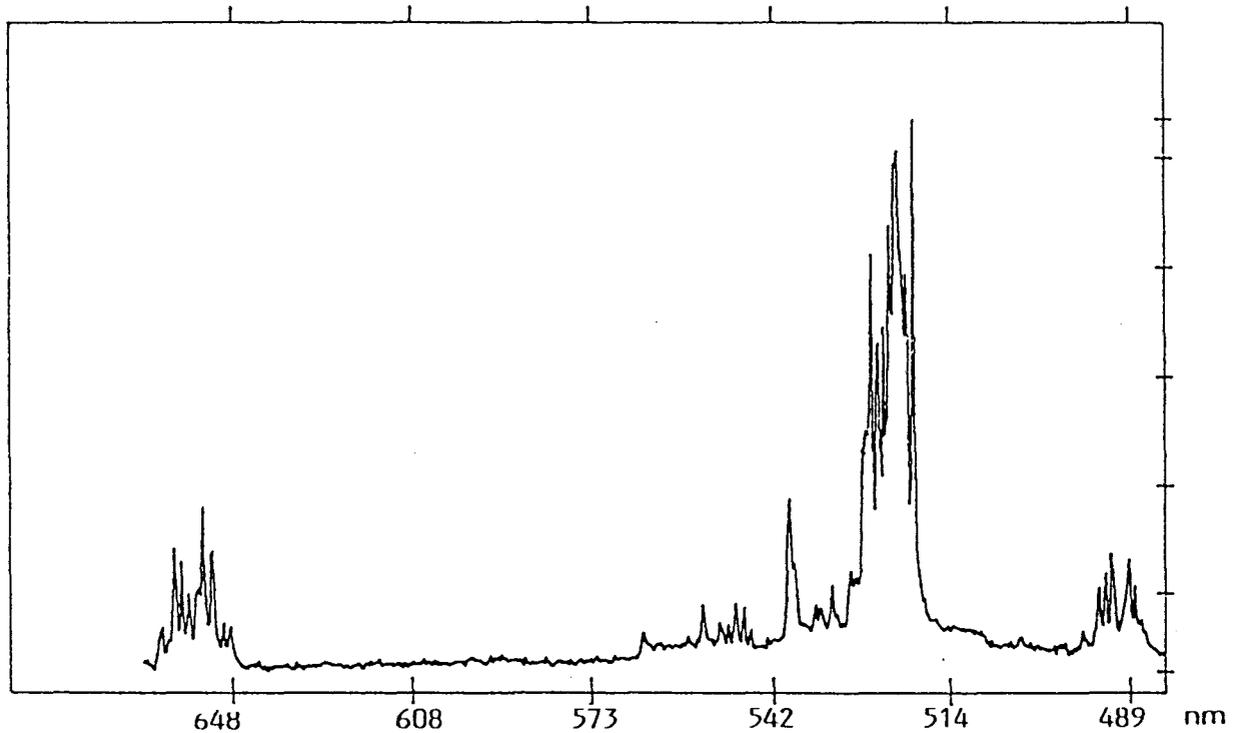


Figure I-38 : Spectre d'absorption d'un cristal d'oxyde d'Erbium
Simple passage.

d) Réflexion

La réflexion d'un faisceau lumineux à la surface d'un échantillon, met en compétition deux processus principaux :

- Soit le faisceau incident est réfléchi dans une direction privilégiée imposée par son orientation par rapport à la normale à la surface de l'échantillon : c'est la réflexion spéculaire, dont l'exemple type est celui de la réflexion sur un miroir.

- Soit la lumière est réfléchié dans toutes les directions de l'espace au dessus de la surface de l'échantillon : c'est la réflexion diffuse.

Lors de l'étude d'échantillons très réfléchissants, la réflexion spéculaire masque souvent le spectre de réflexion diffuse de l'échantillon et rend ainsi impossible toute caractérisation. Nous avons vu, lors des applications en Raman, que pour pallier cet inconvénient, un système de caches a été mis au point.

Nous mettons en évidence, grâce aux figures I-39 (A et B), l'efficacité de ce système pour discriminer la réflexion spéculaire de la réflexion diffuse.

Pour ce faire, nous avons enregistré le spectre d'émission de la source quartz-halogènes après mise au point du microscope à la surface d'un miroir.

De manière à tenir compte de la diminution d'intensité provoquée par la présence des caches sur les trajets d'excitation et de collection, nous avons utilisé pour l'enregistrement du spectre de la figure (I-39 B) un temps de comptage quatre fois supérieur à celui de la figure (I-39 A).

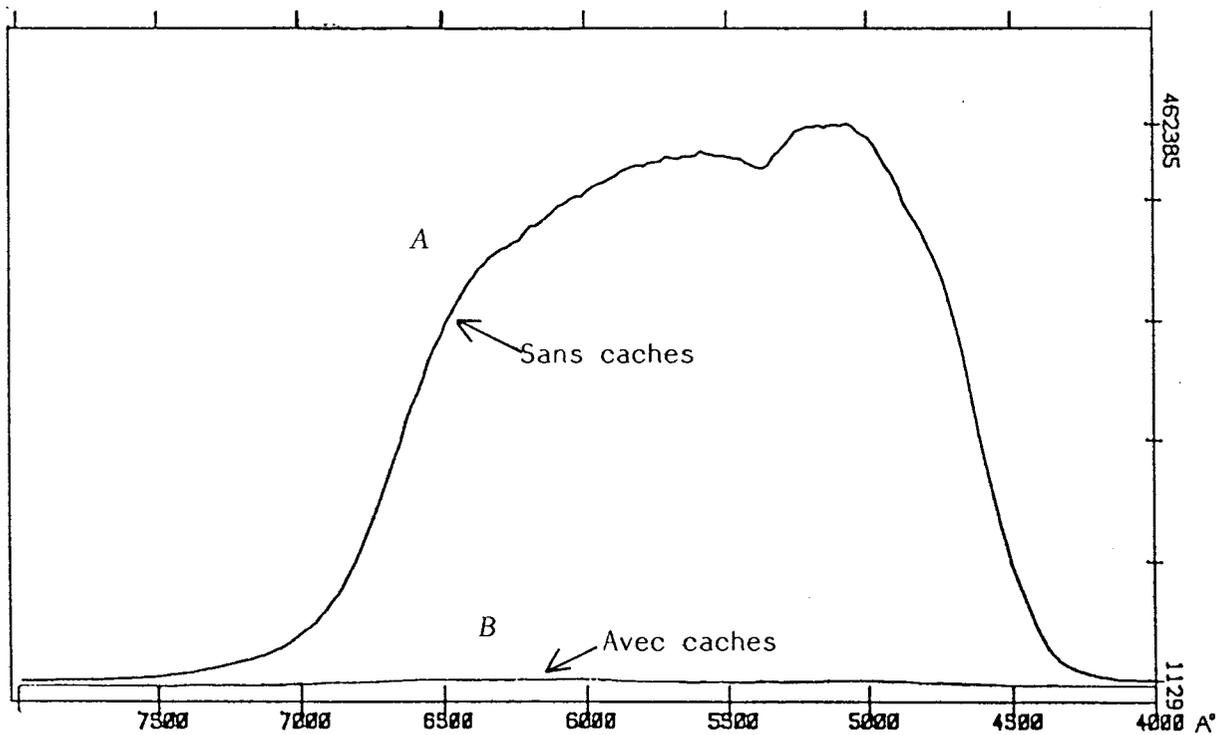


Figure I-39 : Discrimination réflexion spéculaire/réflexion diffuse
Efficacité du système d'élimination de la réflexion spéculaire.

Le spectre obtenu en l'absence des caches représente le spectre d'émission de la lampe quartz-halogène corrigé du facteur d'efficacité du réseau utilisé (dans le cas présent 300 traits/mm).

Le spectre obtenu en présence des caches montre que ceux-ci atténuent considérablement la réflexion spéculaire (X100).

On comprend l'intérêt de l'utilisation du système de caches pour l'identification d'échantillons très réfléchissants (ex : peintures vernissées, matières cristallisées, etc...). On présente sur la figure I-39 le spectre de réflexion diffuse du cristal d'oxyde d'Erbium obtenu en prenant du sulfate de baryum comme référence.

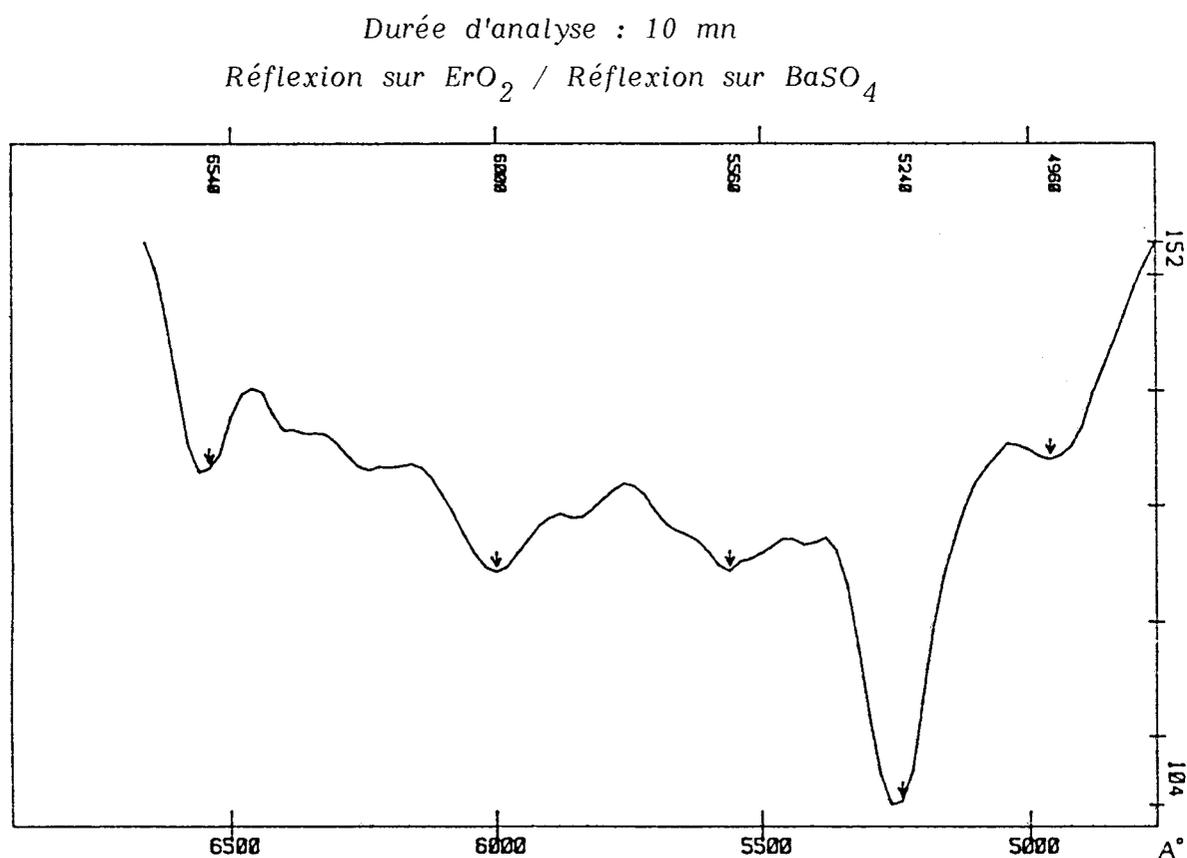


Figure I-39 : Réflexion diffuse d'un cristal d'oxyde d'Erbium
Source quartz-halogène couplée au monochromateur
d'excitation.

Nous nous devons de signaler qu'il faut faire preuve d'une grande prudence lors de l'exploitation des spectres d'absorption ou de réflexion au niveau microscopique, la géométrie de l'échantillon peut considérablement affecter les spectres obtenus.

- CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

Nous nous étions proposé dans un premier temps de réaliser un appareil permettant d'analyser l'émission de fluorescence, à très faible niveau, à partir d'échantillons de taille microscopique. Cet instrument de configuration de base extrêmement simple devait répondre aux critères suivants :

- Grande sensibilité
- Rapidité d'analyse
- Possibilité d'enregistrer des spectres d'émission de fluorescence sur un large domaine spectral
- Résolution spatiale et spectrale.

Le premier prototype de microspectrofluorimètre développé dans le cadre du G.I.P. a permis de répondre en grande majorité à ces exigences.

Comme les tests préliminaires l'ont montré, cet appareil équipé d'un détecteur multicanal intensifié permet l'enregistrement simultané de tous les éléments spectraux constituant une bande d'émission de fluorescence, ceci dans un domaine spectral compris entre 460 et 850 nm.

La grande sensibilité du système de détection, associée à l'utilisation du Laser en tant que source d'excitation est une excellente association pour la détection d'émission de fluorescence très peu intense à partir de volumes extrêmement faibles (quelques dizaines de micromètres cube). L'émission d'une solution 10^{-10} M de fluoresceine (pH 7.2) est détectée, à cette concentration seules quelques molécules sont présentes dans le volume irradié.

La focalisation du faisceau Laser en un spot de l'ordre du micromètre de diamètre confère à l'appareil une excellente résolution spatiale.

Les possibilités d'analyse offertes par l'instrument, à savoir, microfluorescence bandes larges (réseau 300 traits/mm), microfluorescence bandes fines (réseau 1800 traits/mm) et microabsorption visible en font un appareil de microanalyse relativement polyvalent.

Toutefois le taux de lumière parasite lié au monochromateur simple étage et surtout l'utilisation de filtres d'arrêt pour éliminer la radiation excitatrice du spectre d'émission, imposent une limite quant à la sensibilité de l'instrument. Nous avons montré que pour une puissance d'excitation élevée ou un temps d'intégration long, ces filtres induisent une fluorescence parasite qui peut masquer partiellement ou totalement l'émission du fluorophore étudié. De plus le manque de sélectivité de ces filtres peut non seulement engendrer des modifications dans l'allure du spectre d'émission d'un fluorophore, mais en interdire toutes études de diffusion Raman à basse et moyenne fréquences. Ceci impose une limite à la polyvalence de l'appareil.

Le second prototype de microspectrofluorimètre, équipé d'un prémonochromateur double soustractif permet tout en conservant les avantages, de pallier aux inconvénients inhérents à l'appareil précédent. Grâce à un système dispersif ingénieux, cet instrument permet d'enregistrer à partir d'un détecteur multicanal, aussi bien des spectres de diffusion Raman que des spectres d'émission de fluorescence. Une meilleure réjection de la lumière parasite augmente la sensibilité d'un facteur X10 environ. La possibilité d'exciter l'émission de fluorescence dans le proche UV élargit le domaine d'application de l'instrument.

Fort de l'expérience acquise lors du développement de ces deux appareils, nous avons contribué à la réalisation et au développement d'un microspectromètre multi-fonctions. Cet instrument dont la configuration de base associe un microspectromètre Raman à un monochromateur d'excitation permet l'enregistrement au niveau microscopique de spectres d'émission de fluorescence, de spectres d'absorption et de réflexion. Très bien adapté à l'analyse de la diffusion Raman cet instrument perd les avantages de la détection multicanale pour les autres modes d'analyses.

Ainsi en partant du développement d'un microspectrofluorimètre à excitation Laser et détection multicanale, nous sommes arrivés à la conception d'appareils de plus en plus sophistiqués permettant plusieurs types d'analyses complémentaires.

Si aucun de ces instruments ne correspond encore à l'appareil de micro-analyse universel, leur réalisation à toutefois permis de franchir un grand pas dans cette voie.

Notre principal objectif étant la réalisation d'un microspectrofluorimètre, c'est donc à l'étude du phénomène d'émission de fluorescence que nous attacherons le plus d'intérêt. Si les appareils développés paraissent à priori aptes à mesurer l'émission de fluorescence issue d'échantillons de taille microscopique, certains problèmes essentiellement liés à l'utilisation du Laser en tant que source d'excitation et à la géométrie "excitation-collection" adoptée, peuvent perturber les résultats obtenus. L'étude de l'influence de ces divers paramètres fait l'objet de la seconde partie de ce travail.

- SECONDE PARTIE -

APPLICABILITE DE LA MICROSPECTROFLUORIMETRIE

INDUITE PAR LASER

- <u>INTRODUCTION</u>	95
- <u>CHAPITRE I : INFLUENCE DE LA PUISSANCE D'IRRADIATION SUR L'EMISSION DE FLUORESCENCE</u>	99
I-1 : <u>Comparaison entre l'irradiation par arc et l'excitation Laser</u> ...	99
I-2 : <u>Evaluation du volume analysé en microfluorimétrie Laser microfluorimétrie par arc, fluorimétrie conventionnelle</u>	101
A) <u>Microfluorimétrie induite par Laser</u>	101
a) <u>Focalisation d'un faisceau Laser</u>	101
b) <u>Evaluation de la profondeur de champ</u>	104
c) <u>Evaluation du volume analysé</u>	109
B) <u>Microfluorimétrie à excitation par arc</u>	117
C) <u>Spectrofluorimétrie conventionnelle</u>	117
I-3 : <u>Comparaison entre microfluorimétrie Laser microfluorimétrie par arc et fluorimétrie conventionnelle</u>	117
I-4 : <u>Décroissance de l'intensité d'émission de fluorescence</u>	120
A) <u>Causes</u>	120
B) <u>Mise en évidence du phénomène</u>	122
- <u>CHAPITRE II - APTITUDES DE LA MICROSPECTROFLUORIMETRIE INDUITE PAR LASER QUANT A LA MESURE DES PARAMETRES REGISSANT L'EMISSION DE FLUORESCENCE</u>	129
II-1 : <u>Relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration en molécules de fluorophore</u>	130
II-2 : <u>Influence du pH sur l'intensité d'émission</u>	135
II-3 : <u>Extinction du type collisionnel par l'iodure de potassium</u>	137

<i>II-4 : Polarisation de fluorescence.....</i>	<i>141</i>
<i>A) Mesure de la polarisation de fluorescence par des appareils conventionnels.....</i>	<i>142</i>
<i>B) Remarques sur la qualité des mesures de polarisation de fluorescence.....</i>	<i>145</i>
<i>C) Mesure de la polarisation par des microspectromètres.....</i>	<i>146</i>
1 - <i>Perturbations dues à la lame semi réfléchissante et au système dispersif.....</i>	<i>146</i>
2 - <i>Perturbations dues à l'objectif de microscope.....</i>	<i>149</i>
<i>D) Vérification de la loi de Perrin.....</i>	<i>150</i>
<i>- <u>CONCLUSION DE LA SECONDE PARTIE</u>.....</i>	<i>153</i>

- INTRODUCTION

Les lois fondamentales de l'émission de fluorescence, ont pour la plupart été établies lors d'études réalisées au niveau macroscopique à partir de techniques de spectroscopies conventionnelles utilisant une lampe à arc au mercure ou au xénon en tant que source d'excitation.

Plus récemment, le développement de microspectrofluorimètres a permis d'établir le transfert de ces lois au niveau microscopique. Toutefois, dans la majorité des cas, la source d'excitation utilisée reste une lampe à arc au mercure ou au xénon. La source éclaire l'ensemble du champ microscopique (selon la géométrie axiale) et un diaphragme de champ, placé sur le trajet du faisceau d'émission permet de sélectionner la zone analysée.

Nous nous proposons ici de vérifier l'applicabilité de ces lois à la microspectrofluorimétrie induite par Laser, divers paramètres susceptibles de nuire au respect de ces lois sont analysés :

- La différence essentielle entre l'excitation par arc et l'excitation Laser réside dans le fait qu'en microfluorimétrie induite par Laser, le faisceau d'excitation, focalisé au niveau de la préparation en une tâche de l'ordre du micromètre de diamètre, engendre une irradiance très élevée de l'échantillon. Cette forte irradiance peut occasionner une modification très profonde de la zone analysée. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous nous sommes attachés de définir l'influence de la puissance d'irradiation sur le phénomène d'émission de fluorescence.

- Si la géométrie "frontale" semble satisfaisante pour l'excitation et la collection, elle nécessite néanmoins l'introduction dans le trajet optique d'une lame semi-réfléchissante pour séparer le faisceau d'excitation du faisceau d'émission. La proportion de lumière transmise ou réfléchi par cette lame est fonction des caractéristiques du flux lumineux qu'elle reçoit (direction de propagation, longueur d'onde et polarisation) aussi un tel élément placé sur le trajet des faisceaux ne peut être optiquement neutre.

- Pour focaliser la radiation excitatrice à la surface de l'échantillon et collecter la lumière émise ou diffusée nous utilisons un objectif de microscope à grande ouverture numérique. Les faisceaux de lumière excitatrice et émise ne peuvent donc plus être considérés comme parallèles, ce qui risque de modifier les résultats obtenus notamment en polarisation de fluorescence.

De manière à s'assurer que les lois essentielles régissant le phénomène d'émission de fluorescence sont conservées, nous avons choisi la fluoresceine comme molécule test. Cette molécule, qui représente autant que faire se peut l'ensemble des propriétés des molécules de fluorophore, peut être excitée à son maximum d'absorption par la raie bleue d'un Laser à argon ionisé (488 nm).

Nous présentons sur la figure II-1 les spectres d'absorption et d'émission de la molécule de fluoresceine. La figure II-2 donne la variation du rendement énergétique du fluorophore en fonction de la longueur d'onde d'excitation. [41]

Structure moléculaire

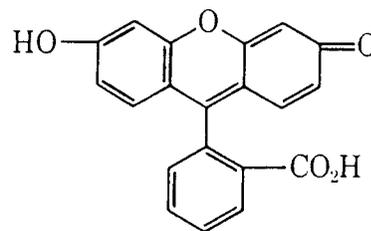
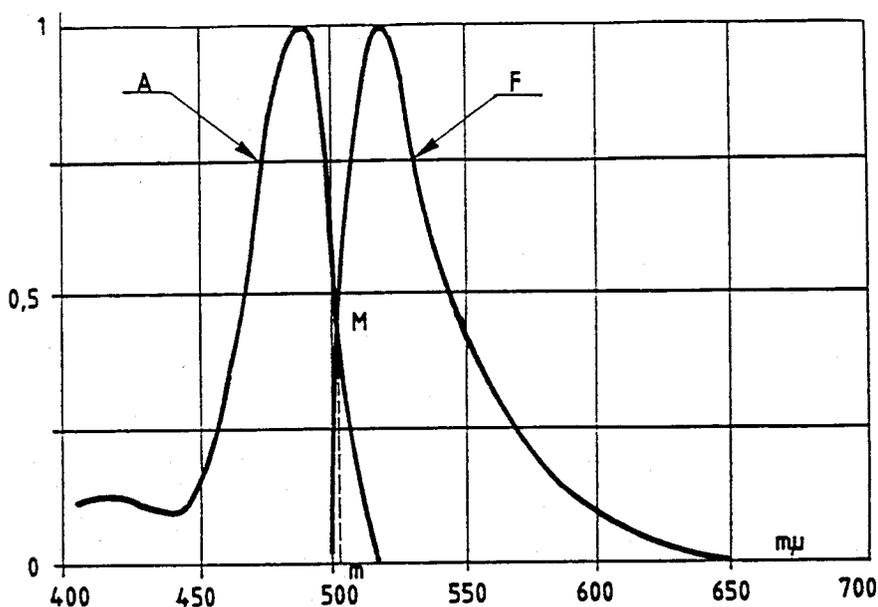


Figure II-1 : Spectres d'absorption (A) et d'émission (B) de la molécule de fluoresceine (EGA chimie F 245.6)

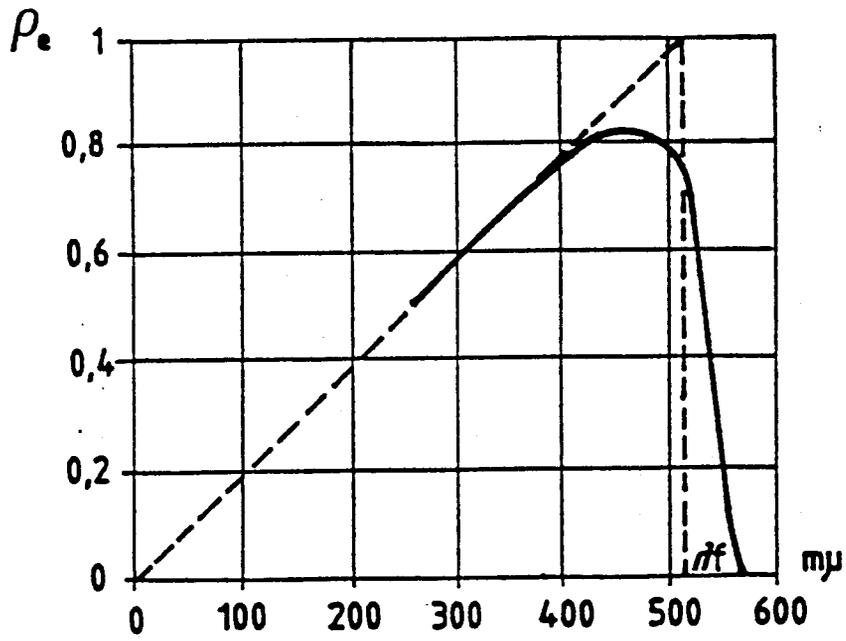


Figure II-2 : Rendement énergétique d'émission de fluorescence de la fluoresceine en fonction de la longueur d'onde d'excitation.



- CHAPITRE I - INFLUENCE DE LA PUISSANCE D'IRRADIATION
SUR L'EMISSION DE FLUORESCENCE

I-1 : Comparaison entre l'irradiation par arc et l'excitation Laser

En 1971 Kaufman et Al ont effectué quelques mesures de densité de puissance au niveau de la zone analysée pour diverses sources d'excitation. Pour un éclairage global du champ microscopique, les résultats de leurs mesures, ainsi que les grandeurs pour une source focalisée sont présentés dans le tableau (II-1), [42].

	Source	Puissance Lumineuse mW	Largeur Spectrale nm	Densité de puissance à l'échantillon W/cm ²
Non focalisée	ARC XENON		1	2,4
	LASER ARGON	200	$5 \cdot 10^{-3}$	500
	LASER HE-CD	32	$5 \cdot 10^{-3}$	80
Focalisée	ARC XENON		1	14
En un spot de 1 μm de \varnothing	LASER ARGON	1	$5 \cdot 10^{-3}$	10^7

Tableau II-1 : Densité de puissance mesurée pour différentes sources d'excitation focalisées ou non.

Pour exprimer la densité de puissance résultant de la focalisation d'un arc au xénon ou au mercure, nous avons considéré le cas où l'image du cratère de l'arc serait focalisée en un spot de l'ordre du micromètre de diamètre au niveau de la préparation.

L'irradiance obtenue à l'échantillon, en considérant une largeur spectrale de 1 nm et en négligeant les pertes de luminosité dues au monochromateur d'excitation, est alors dans le meilleur des cas de 14 W/cm². Si l'on considère une

largeur spectrale d'émission équivalente à celle d'un Laser ($5 \cdot 10^{-3}$ nm) l'irradiance n'est plus que de $7 \cdot 10^{-2}$ W/cm². Cette valeur est tout à fait dérisoire comparée à celle de l'émission laser, à savoir quelques méga Watt par cm².

Il apparaît évident que l'utilisation de sources cohérentes intenses, tels que les lasers, pour l'étude de la fluorescence de microéchantillons présente beaucoup d'intérêt, tant au niveau de la résolution spatiale que sur le plan de l'intensité d'excitation. Cependant, cette technique d'investigation peut présenter certains inconvénients qu'il convient de bien maîtriser [43,45].

En effet, la forte densité photonique obtenue au niveau de l'échantillon est souvent la cause d'une décroissance rapide de l'intensité de fluorescence. Ce phénomène connu des biologistes sous le terme de "photoblanchiment" est considéré comme une conséquence inévitable de l'exposition de l'échantillon à la radiation excitatrice.

De nombreux auteurs tels que Goldman (1960), Jongsma (1971), Kaufman (1971) et Herzog (1973) ont montré que la cinétique de décroissance de l'intensité de fluorescence était fonction de l'intensité de l'excitation [46,48] [42].

Enerback et Johansson (1973) [49] ont étudié l'influence du grandissement de l'objectif de microscope utilisé sur le photoblanchiment. Ils ont observé une augmentation de la vitesse de décroissance pour les objectifs de grossissement et d'ouverture numérique élevés. Ces observations ont été confirmées par Johnson et A1 en 1982 qui étudièrent en détail le "photoblanchiment" de l'isothianate de fluoresceine (fluorophore couramment employé en immunofluorimétrie) [50].

Ces phénomènes ne sont déjà pas négligeables lors d'une excitation par arc, il est évident que l'utilisation du laser en tant que source d'excitation ne pourra que les accentuer de façon considérable.

Avant d'essayer d'apporter quelques suggestions permettant d'explicitier le phénomène de "photoblanchiment" et d'établir les conditions expérimentales nécessaires pour l'atténuer, il est intéressant de comparer les techniques de :

- microfluorimétrie induite par Laser
- microfluorimétrie à excitation par arc
- spectrofluorimétrie conventionnelle à excitation par arc.

Dans chacun des cas, nous avons, pour une solution de fluorophore donnée, évalué le nombre de photons absorbés par molécule et par seconde dans la zone analysée.

Pour cette estimation, nous avons été amené à définir le volume effectif analysé ayant contribué à l'absorption des photons incidents et à partir duquel aura lieu l'émission de fluorescence.

Le peu d'informations données par la littérature au sujet des volumes d'échantillons analysés, de la densité de puissance disponible au niveau de la préparation, de la durée de l'irradiation etc..., rend difficile une comparaison absolue des différentes techniques d'analyses de l'émission de fluorescence.

Aussi, nous nous sommes attachés dans le cas de la microspectrofluorimétrie Laser à définir pour chaque application, les paramètres essentiels pouvant interférer sur les résultats obtenus.

II-2 : Evaluation du volume analysé en microfluorimétrie Laser microfluorimétrie par arc, fluorimétrie conventionnelle.

A : Microfluorimétrie induite par laser Résolution spatiale, résolution axiale

a) Focalisation d'un faisceau laser

De nombreux travaux concernant la focalisation d'un faisceau laser ont permis d'évaluer le diamètre minimum $D\emptyset$ de la tache de focalisation [51,52].

Ainsi dans le cas où l'on considère une distribution gaussienne de l'intensité du faisceau laser (mode TEM₀₀) le diamètre minimum du faisceau focalisé peut s'exprimer par la relation II-1.

Relation II-1 : Expression du diamètre minimum ($D\emptyset$)
d'un faisceau laser focalisé.

$$\frac{1}{(D\emptyset)^2} = \frac{1}{Dw^2} \left(1 - \frac{Z1}{f} \right)^2 + \frac{1}{4f^2} \left(\frac{\pi Dw}{2 \lambda} \right)^2$$

La figure II-3 permet de définir les paramètres de l'équation II-1.

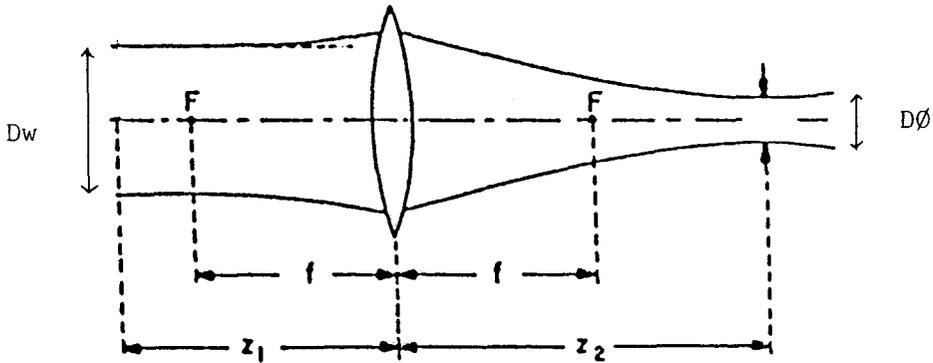


Figure II-3 : Focalisation d'un faisceau laser

- (f) représente la distance focale de l'objectif (Dw) le diamètre minimum (couramment appelé waist) du faisceau laser non focalisé et $Z1$ la distance du waist à l'objectif.

Si la pupille de l'objectif du microscope est totalement couverte par le faisceau laser incident, on peut utiliser une formule approchée permettant de connaître rapidement les dimensions de la tache de focalisation [53] :

$$D\emptyset = 4 \lambda / ON \pi$$

- (ON) représente l'ouverture numérique de l'objectif utilisé.

Le tableau II-2 donne le diamètre théorique de la tache de focalisation pour la radiation à 488 nm d'un laser argon ionisé et pour quelques objectifs classiques.

	:	:	:	:
Grandissement	:	X10	: X50 ULWD	: X50 : X100
Ouverture numérique	:	0,25	: 0,55	: 0,75 : 0,95
Diamètre théorique de la tache de focalisation (μm):	:	2,5	: 1,13	: 0,83 : 0,65

Tableau II-2 : diamètre de la tache de focalisation pour la radiation à 488 nm d'un laser à argon ionisé et pour quelques objectifs classiques.

Il faut noter qu'en dehors du plan focal de l'objectif, la section du faisceau Laser augmente très rapidement. L'expression II-2 permet d'évaluer le diamètre du faisceau Laser à une distance (Δn) de part et d'autre du point de focalisation.

Expression II-2 : Variation du diamètre de la tache de focalisation hors du plan focal de l'objectif du microscope.

$$D\Delta = D\emptyset \left[1 + \left(\frac{\lambda \Delta n}{\pi r_0^2} \right)^2 \right]^{1/2}$$

- (Δn) représente la distance de l'objectif par rapport au plan focal.
- ($D\emptyset$) représente le diamètre minimum du spot (waist)
- ($D\Delta$) donne le diamètre du spot à la distance (Δn) du plan focal.

Dans le cas où un objectif de grandissement 100X est utilisé pour la focalisation du faisceau Laser, le diamètre du faisceau est pratiquement doublé pour un déplacement axial de un micromètre de part et d'autre du plan focal de l'objectif.

L'augmentation du diamètre de la tache de focalisation en dehors du plan focal de l'objectif implique une diminution rapide de la densité photonique au niveau de l'échantillon, ce qui confère aux instruments une profondeur de champ extrêmement faible.

b) Evaluation de la profondeur de champ

La profondeur de champ peut être définie comme l'épaisseur de matériaux effectivement observée par le spectrographe. Sa valeur dépend entre autres, de l'objectif de microscope utilisé et de la taille du diaphragme de champ placé au niveau d'un plan image du microscope sur le trajet du faisceau diffusé.

La figure II-4 met en évidence l'intérêt du diaphragme de champ pour limiter la profondeur de champ.

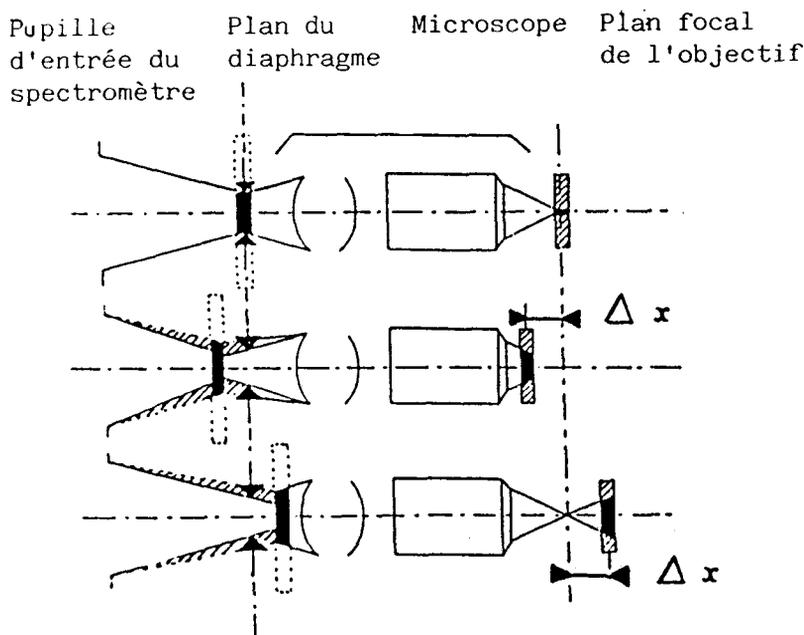


Figure II-4 : Rôle du diaphragme de champ

On constate que l'ensemble des signaux issus du plan de netteté de l'objectif passe par le diaphragme de champ et est observé par le spectrographe, alors que seule une faible partie des signaux issus de zones situées hors du plan focal de l'objectif peut être collectée.

Pour estimer la profondeur de champ d'un microspectromètre, une méthode consiste à étudier l'évolution d'une raie de diffusion caractéristique d'un échantillon donné, en fonction de la position de cet échantillon par rapport au plan focal de l'objectif utilisé pour la mise au point.

Le Silicium, qui présente les avantages d'être suffisamment réfléchissant pour éviter la pénétration du faisceau Laser à l'intérieur du matériau et de posséder une raie de diffusion Raman à 520 cm^{-1} , répond parfaitement aux caractéristiques de l'échantillon type pour de telles investigations.

Une étude de l'évolution de la profondeur de champ en fonction de l'objectif de microscope utilisé (grandissement, ouverture numérique) est présentée sur la figure II-5. Les spectres ont été enregistrés à partir du microspectromètre multi-fonctions, ils montrent l'évolution de l'intensité de la raie Raman du Silicium (520 cm^{-1}) pour une excitation à 488 nm et diverses positions de la lame de Silicium par rapport au plan de netteté de l'objectif.

Nous mettons en évidence l'intérêt du diaphragme de champ, ici un trou calibré de $400\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre, pour limiter la profondeur de champ de l'instrument.

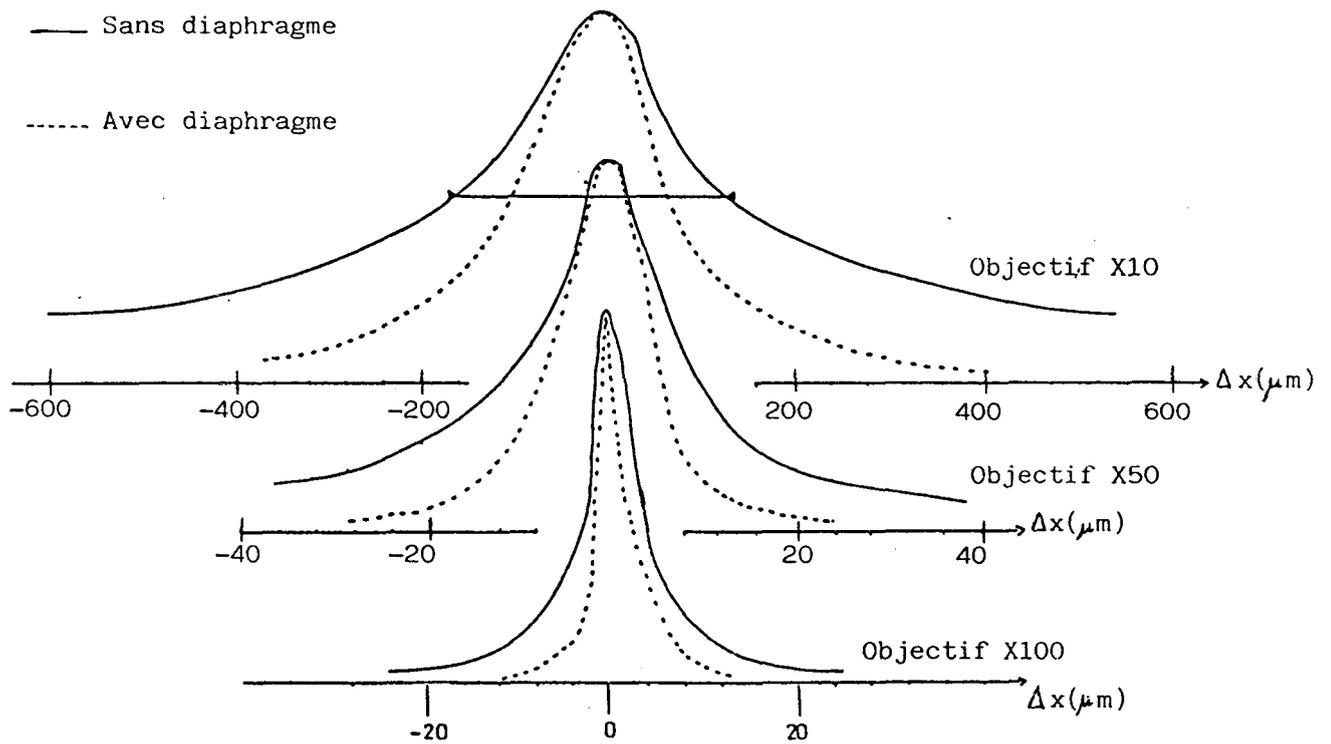


Figure II-5 : Variation de la profondeur de champ en fonction de l'objectif du microscope utilisé. Rôle du diaphragme

Toutefois, dans le cas du premier prototype de microspectrofluorimètre, les limites imposées par le système de filtrage de la radiation excitatrice (filtres d'arrêt) ne nous permettent pas l'analyse de la bande à 520 cm^{-1} du Silicium.

Aussi pour l'évaluation de la profondeur de champ de cet instrument le faisceau Laser (radiation 488 nm) a été focalisé sur la surface d'un miroir.

Nous avons porté sur la figure II-6 l'évolution de l'intensité de la radiation excitatrice réfléchiée en fonction de la position du miroir de part et d'autre du point de focalisation ainsi que le diamètre du faisceau correspondant à ces positions.

Les signaux ont été enregistrés avec l'iris en position fermée (diamètre proche de $800 \mu\text{m}$) et avec l'objectif de grandissement X50 grande frontale (X50 ULWD).

On peut noter (tableau II-3) que les deux méthodes d'évaluation de la profondeur de champ précédemment définies donnent des résultats similaires.

On constate que le flux de lumière collecté par le détecteur, varie très rapidement avec la défocalisation du faisceau Laser.

En déplaçant l'échantillon, que ce soit le miroir ou la lame de Silicium, de part et d'autre du plan de netteté de l'objectif, on matérialise la contribution de différentes couches perpendiculaires à la direction de propagation du faisceau d'excitation à l'intérieur d'un matériau transparent hypothétique.

Nous avons représenté sur la figure II-7 la contribution de ces différentes épaisseurs au flux total collecté par le détecteur, pour le premier prototype de microspectrofluorimètre.

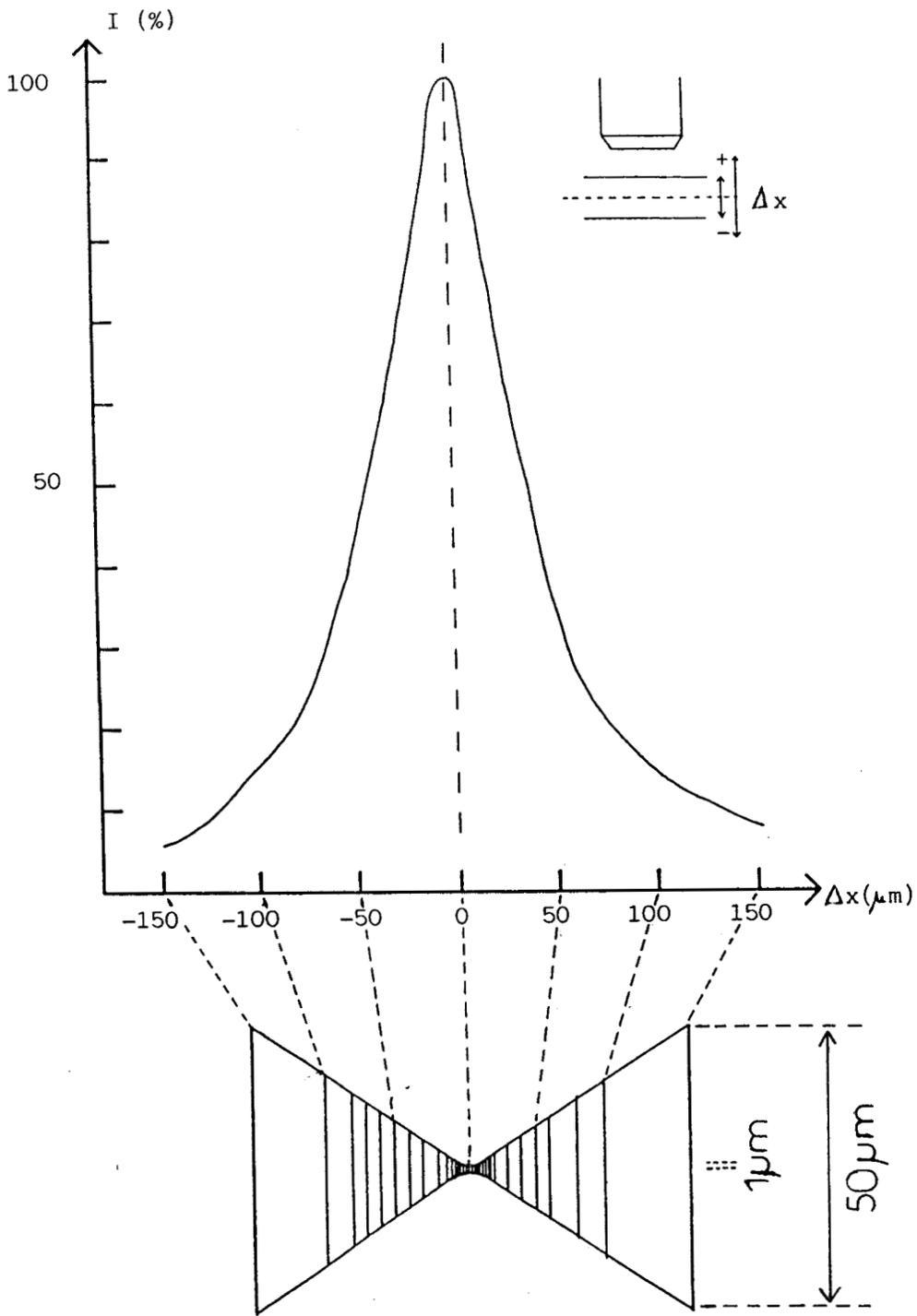


Figure II-6 : Intensité relative de la radiation excitatrice (488 nm) de part et d'autre du plan de netteté de l'objectif Evolution du diamètre du faisceau Laser

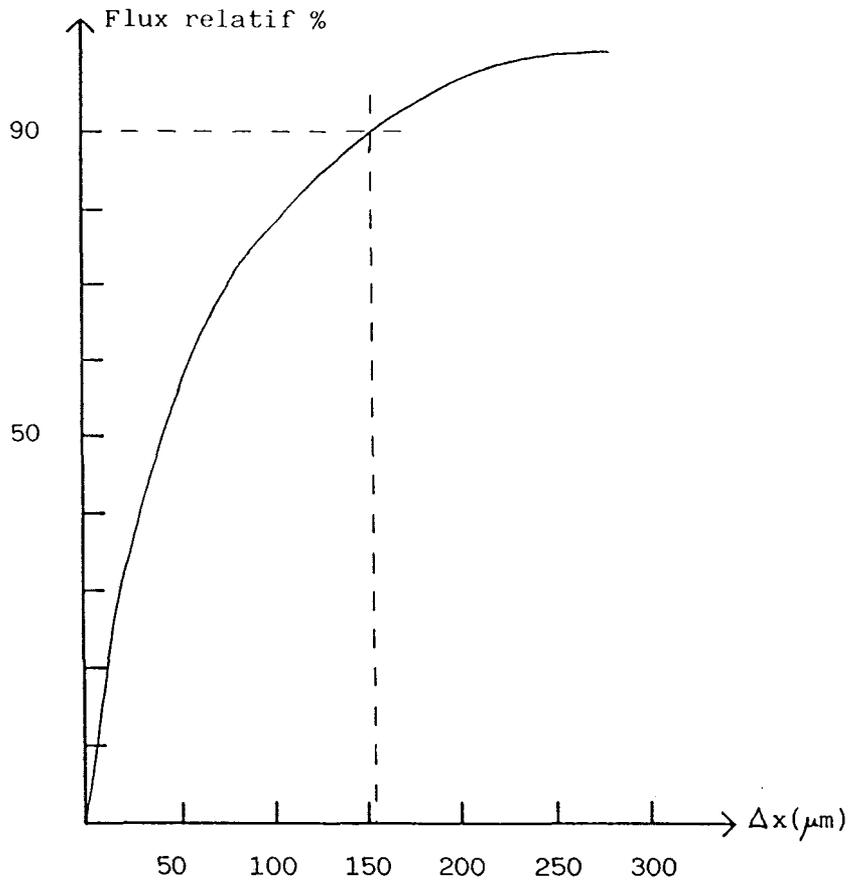


Figure II-7 : Contribution des différentes épaisseurs de matériau analysé au flux total collecté

La contribution de ces différentes épaisseurs, a été déterminée par intégration de la courbe de la figure II-6 entre deux bornes symétriques de part et d'autre du plan focal de l'objectif.

Si on considère que la profondeur de champ de l'appareil est donnée par l'épaisseur du matériau qui contribue à 90% au flux total collecté par le détecteur, on obtient, d'après la courbe de la figure II-7, une valeur proche de 150 μm.

Nous présentons, sur le tableau II-3, pour les différents prototypes développés, quelques estimations de la profondeur de champ en fonction de l'objectif utilisé et en présence ou non du diaphragme de champ.

OBJECTIFS	:	X10	X20	X50	ULWD	X50	X100	X160
PROFONDEUR DE	:							
CHAMP (μm)	:							
- avec diaphragme	:	<u>600</u>	<u>32</u>	<u>150</u>	<u>130</u>	<u>40</u>	<u>20</u>	<u>12</u>
- sans diaphragme	:	<u>1000</u>	<u>360</u>		<u>250</u>	<u>60</u>	<u>40</u>	

- Premier prototype de microfluorimètre (diaphragme 800 μm)
- ~~~~ Second prototype de microfluorimètre (trou calibré 200 μm)
- _____ Microspectrophotomètre multi-fonctions (trou calibré 400 μm)

Tableau II-3 : Estimation de la profondeur de champ des appareils développés, en fonction de l'objectif utilisé avec ou sans le diaphragme de champ.

On comprend tout l'intérêt du diaphragme de champ pour étudier de petites particules dans un échantillon hétérogène, celui-ci par son rôle de filtre spatial permet de minimiser la contribution de la lumière parasite issue de la matrice.

Toutefois il faut noter que son utilisation pour l'étude de matériaux transparents homogènes n'est pas souhaitable car il diminue considérablement le flux de lumière collecté et dégrade la détectivité de l'instrument.

c) Evaluation du volume analysé

Il ressort de ce qui précède que le volume analysé par un microspectromètre à excitation Laser, pourrait en première approximation être assimilé à un diabolos dont la hauteur serait donnée par la profondeur de champ de l'instrument et dont le diamètre minimum serait celui de la tache de focalisation au niveau du waist, soit respectivement 150 μm et 1 μm pour le premier prototype de microspectrofluorimètre dans les conditions d'utilisation précédemment définies (objectif X50 ULWD).

En tenant compte de la variation du diamètre de la tache de focalisation de part et d'autre du plan de focalisation de l'objectif de microscope, il est possible de déterminer le volume de ce diabol.

Cette estimation représente toutefois un cas idéal, dans la plupart des applications, le faisceau Laser est focalisé dans un milieu anisotrope et la forme du volume analysé est modifiée.

Nous présentons sur la figure II-8 la perturbation provoquée par la traversée d'une interface air-verre lors de la focalisation du faisceau Laser (indice du verre 1,54).

Cette aberration est constituée par l'erreur existant dans l'image d'un point situé sur l'axe du système. Le rayon principal qui sert d'axe au faisceau, coïncide avec l'axe du système élémentaire. Le point O' représente un point de rebroussement pour les foyers formés par les rayons éloignés de l'axe ; ces derniers se recouvrent réciproquement en formant une caustique symétrique par rapport au point O'. On rend ainsi compte de l'aberration sphérique longitudinale dont l'importance dépend en première ligne du diamètre d'ouverture.

La modification de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope au niveau du dioptré air-verre provoque un allongement de la hauteur du diabol précédemment défini. De par cet allongement, la forme du volume analysé tend vers une géométrie cylindrique.

L'utilisation d'objectifs à immersion (eau ou huile) permet de minimiser ce phénomène, toutefois lors de l'étude de milieux hétérogènes en solution, cellules dans un liquide physiologique, il faudra également s'attendre à une modification de la géométrie du volume analysé.

De manière à essayer de définir expérimentalement la géométrie du volume analysé, nous avons enregistré les spectres d'émission issus d'une solution de fluoresceine (10^{-8} M) en fonction de la position du point de focalisation (waist) par rapport à la surface de la solution.

A) sans changement d'indice

B) avec changement d'indice

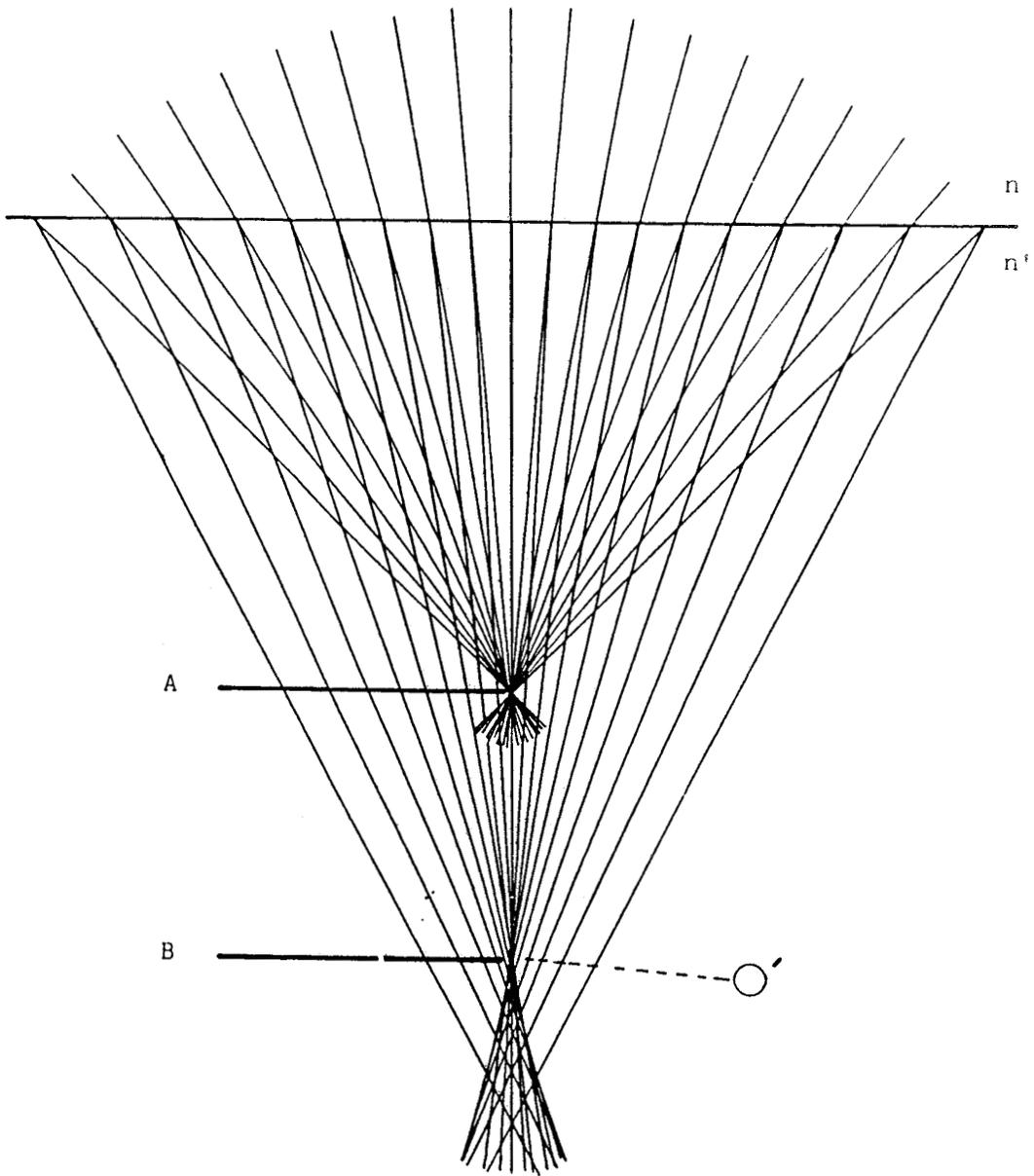


Figure II-8 : Aberration sphérique longitudinale
Effet d'indice sur la forme du faisceau Laser focalisé

Pour procéder à l'enregistrement des spectres :

- La mise au point du microscope est faite à la surface du liquide puis la platine porte échantillon est remontée de 300 μm par rapport à cette position. On enregistre les spectres d'émission tous les 20 μm en se rapprochant de la surface du liquide.

La figure II-9 A, représente l'évolution de l'intensité de l'émission de fluorescence en fonction de la position du plan focal de l'objectif (X50 ULWD) par rapport à la mise au point sur la surface de la solution.

D'après les résultats obtenus on remarque que :

- lorsque le faisceau Laser est focalisé relativement loin de la solution, l'émission de fluorescence collectée par le détecteur est très faible et reste stationnaire. Ceci se traduit par un palier sur la courbe de la figure II-9.

- En s'approchant de la solution, l'émission de fluorescence croît rapidement et linéairement avec le déplacement de la platine porte échantillon.

- Pour un certain déplacement, l'émission de fluorescence redevient stationnaire et on obtient alors un second palier.

On peut expliquer ces résultats de la manière suivante :

Au début de la manipulation, la totalité du volume analysé par le spectrographe se trouve de par la profondeur de champ de l'appareil, à l'extérieur de la solution de fluoresceine, seule une émission extrêmement faible est alors observée.

Au fur et à mesure du déplacement de la platine porte échantillon, le volume "d'analyse" pénètre dans la solution et l'émission de fluorescence croît. Lorsque tout le volume analysé par le spectrographe est contenu dans la solution, l'émission de fluorescence issue de ce volume est constante et on obtient le second palier.

Le fait que l'intensité d'émission de fluorescence croît de façon linéaire lorsque le volume "d'analyse" pénètre à l'intérieur de la solution de fluoresceine, est en faveur de l'hypothèse précédemment émise, à savoir , assimiler ce volume à

un cylindre et non à un diabololo. En effet l'intensité d'émission étant proportionnelle au nombre de molécules du fluorophore présentes dans le volume irradié, seule la géométrie cylindre permet d'expliquer les résultats obtenus.

Nous avons représenté sur les figures II-9 (B et C) l'évolution de l'émission de fluorescence en fonction du volume analysé dans le cas d'une géométrie cylindrique et dans le cas du diabololo. Pour la détermination du volume total analysé, nous avons estimé d'après la figure II-8.A que la profondeur de champ se limite à la plage où l'intensité d'émission évolue de façon quasi linéaire avec le déplacement de la platine porte échantillon, soit environ 200 μm . L'augmentation de la profondeur de champ comparée à la valeur précédemment définie (tableau II-3) peut être attribuée à la variation d'indice au niveau de l'interface air-eau ou à une pénétration plus importante du faisceau Laser à l'intérieur du matériau.

Toutes les courbes de la figure II-9 ont été normalisées à partir du volume total analysé pour chacun des cas. Le volume du diabololo a été calculé par intégration de la relation II-2 selon la hauteur h ($h = 2 \Delta r$).

Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un objectif à immersion à eau. Le fait que dans ce cas le volume analysé puisse encore être assimilé à un cylindre, suggère que ce volume est défini par la configuration de l'instrument. C'est pourquoi, nous avons trouvé préférable de substituer au terme de "volume d'analyse" celui de "zone de détectibilité".

Ce terme nous a paru mieux approprié pour exprimer que le volume déterminé par les techniques précédemment énoncées ne correspond pas au volume réel analysé de l'échantillon, mais à la portion de ce volume qui est prise en compte au niveau du détecteur.

La "zone de détectibilité" est donc définie suivant trois critères principaux :

- La forme gaussienne de répartition de l'énergie du faisceau Laser,
- La nature du matériau analysé (variation d'indice),
- La géométrie du spectrographe, configuration du système de détection.

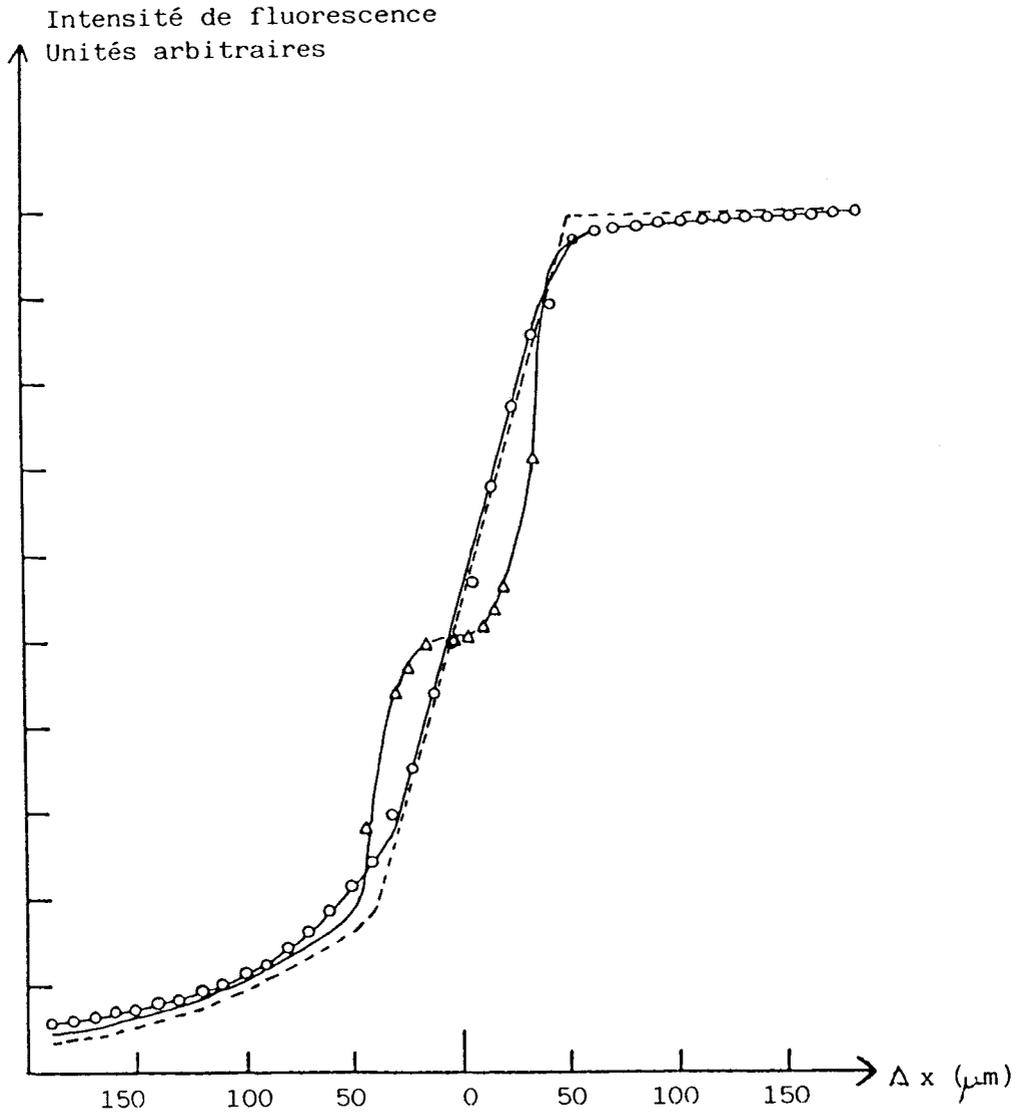


Figure II-9 :

- A) Evolution de l'intensité de l'émission de fluorescence d'une solution 10^{-8} M de fluoresceine en fonction du déplacement de la platine porte échantillon de part et d'autre de la mise au point à la surface du liquide (\circ) (mesurée)
- B) Relation entre l'intensité de fluorescence et le volume analysé pour une géométrie cylindrique (calculée) (----)
- C) Relation entre l'intensité de fluorescence et le volume analysé pour un diabolo (calculée) (Δ).

Ainsi, comme le suggère les résultats précédents, la forme cylindrique de la "zone de détectabilité" est imposée par des facteurs instrumentaux et tout particulièrement par la présence du diaphragme de champ dans le plan image de l'objectif de microscope.

En effet, de même que ce diaphragme limite l'épaisseur de matériau vu par le détecteur, il limite également pour chaque tranche d'échantillons perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau laser, la surface de cette tranche effectivement vue par le détecteur (figure III-10-A).

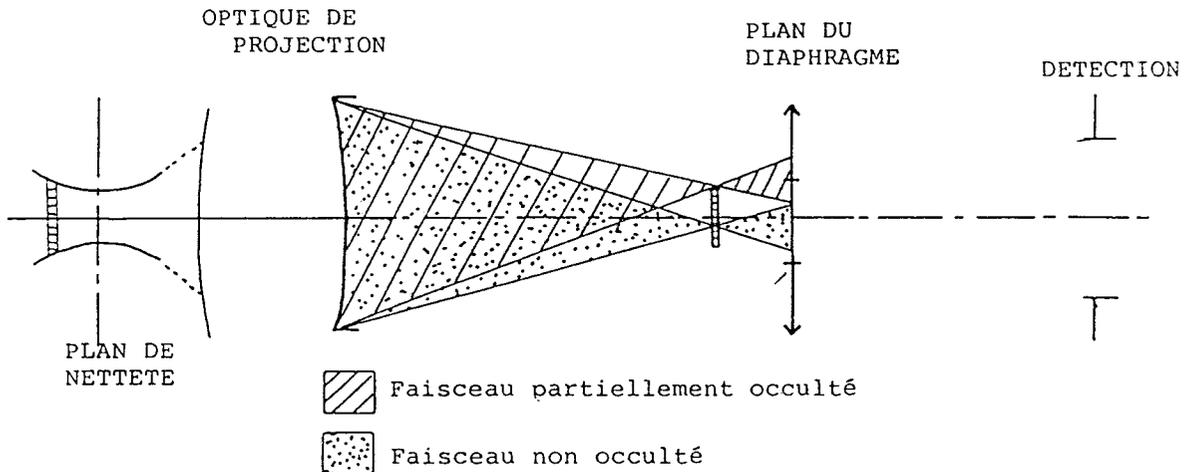


Figure II-10-A : Contribution des différentes tranches de l'échantillon au flux collecté.

Comme le montre le schéma de la figure II-10-A, on constate que tous les faisceaux issus d'une tranche de matériau dans l'espace objet, ne pourront pas atteindre le détecteur, certains seront occultés par le diaphragme de champ. Pour une tranche donnée, plus on s'éloigne de l'axe optique du système, plus cette occultation augmente. On peut donc comme nous l'avons fait pour la profondeur de champ, définir un champ latéral correspondant à une portion circulaire de diamètre

dx et qui contribue pour 90 % au flux total collecté par le détecteur à partir de cette tranche.

Pour évaluer les dimensions de ce champ latéral, une approche mathématique consiste à décomposer chaque tranche de matériau en une somme d'anneau concentrique élémentaire d'épaisseur dr . On évalue ensuite pour chacun de ces anneaux, le flux élémentaire qui passe au travers du diaphragme de champ et qui atteint le détecteur. Le calcul de l'aire sous la courbe représentant la variation de ce flux élémentaire en fonction du diamètre de l'anneau, permet d'estimer le diamètre de la zone qui contribue à 90 % au flux collecté pour la tranche concernée.

Ces considérations, conjuguées à la répartition gaussienne de l'énergie du faisceau laser, confirment l'hypothèse d'une "zone de détectibilité" cylindrique dont la base peut être assimilée au waist du faisceau laser et la hauteur à la profondeur de champ (figure III-10-B).

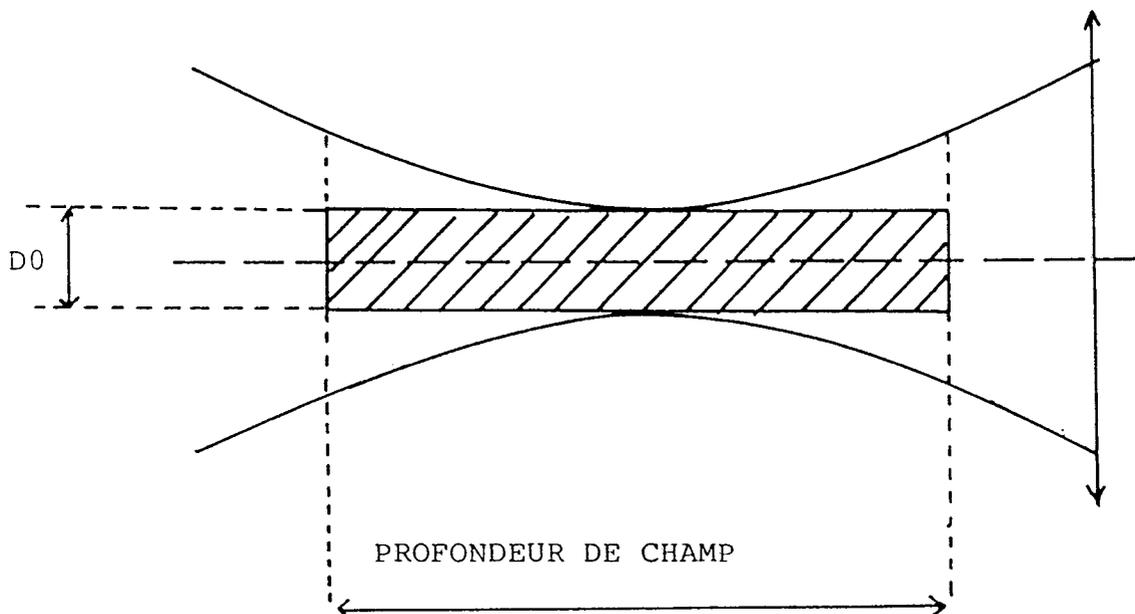


Figure III-10-B : Forme de la "zone de détectibilité".

B) Evaluation du volume analysé en microspectrofluorimétrie à excitation par arc.

Bien que les propriétés de focalisation d'un arc au mercure ou au xénon soient très différentes de celles d'un faisceau Laser, nous avons considéré que la zone de détectibilité précédemment définie, est identique pour les deux techniques d'analyse. Seule la différence de densité photonique obtenue au niveau de l'échantillon sera ici considérée.

C) Evaluation du volume analysé en spectrofluorimétrie conventionnelle

Le volume analysé est arbitrairement assimilé à un parallélépipède rectangle à base carrée de 0,5 cm de côté et 1 cm de longueur.

II-3 : Comparaison entre microfluorimétrie à excitation Laser
Microfluorimétrie par arc et fluorimétrie conventionnelle.

L'objectif de cette comparaison est de mettre en évidence, par le biais du calcul du nombre de photons absorbés par molécule et par seconde, les différences existant entre les trois méthodes d'analyse.

La connaissance du volume analysé, de la concentration et du coefficient d'extinction molaire du fluorophore considéré, de la puissance disponible au point de focalisation à la longueur d'onde sélectionnée, permet de résoudre le problème posé.

Si on pose N_0 = Nombre de photons incidents

N = Nombre de photons transmis

n = Nombre de molécules présentes dans la zone analysée.

On peut écrire par une loi dérivée de celle de Beer-Lambert

$$I/I_0 = 10^{-\epsilon LC} = N/N_0$$

et donc exprimer le nombre de photons absorbés par molécule et par seconde par la relation :

$$\frac{N_0 - N}{n} = N_0 (1 - 10^{-\epsilon LC}) / \mathcal{N} \pi R^2 LC$$

avec : R = rayon du volume analysé L = longueur du volume analysé
 \mathcal{N} = nombre d'Avogadro C = concentration de la solution

Le tableau II-4 résume l'ensemble des paramètres utilisés pour ce calcul et donne une estimation du nombre de photons absorbés par molécule et par seconde dans la zone analysée pour les trois méthodes d'investigations considérées.

	FLUORIMETRIE		MICROFLUORIMETRIE	
Sources	Xénon	Xénon	Laser	
Densité de puissance à l'échantillon W/cm^2	2,4	14	10^7	
Volume analysé μm^3	$25 \cdot 10^{14}$	100	100	
Nb de molécules présentes dans le volume irradié $C = 2 \cdot 10^{-8} M$	$\approx 3 \cdot 10^{12}$	$\approx 10^3$	$\approx 10^3$	
Nb photons incidents par molécule et par seconde	10^6	$2,5 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^{14}$	
Nb photons absorbés par molécule et par seconde	$3 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^9$	

Tableau II-4 : Comparaison microfluorimétrie Laser microfluorimétrie par arc et fluorimétrie conventionnelle

Pour l'estimation du nombre de photons absorbés par molécule et par seconde, nous avons jusqu'à présent considéré les molécules comme statiques. Toutefois dans une solution, les molécules ne sont pas immobiles et peuvent par diffusion ou s'il y a un échauffement local, par courant de convection, entrer et sortir du volume analysé.

En première approximation, le temps de transit d'une molécule à l'intérieur du volume analysé par le faisceau Laser peut être exprimé par la relation établie par Broersma [54] :

$$t = \frac{6 \pi \eta d R \phi^2}{K T}$$

ou η est la viscosité du solvant, d : le rayon moléculaire du fluorophore considéré, K : la constante de Boltzman T : la température absolue et $R\phi$ le rayon du faisceau laser focalisé.

Cette relation n'a de signification que dans le cas limite où les molécules se déplacent uniquement dans une direction perpendiculaire au sens de propagation du faisceau d'excitation (figure II-11)

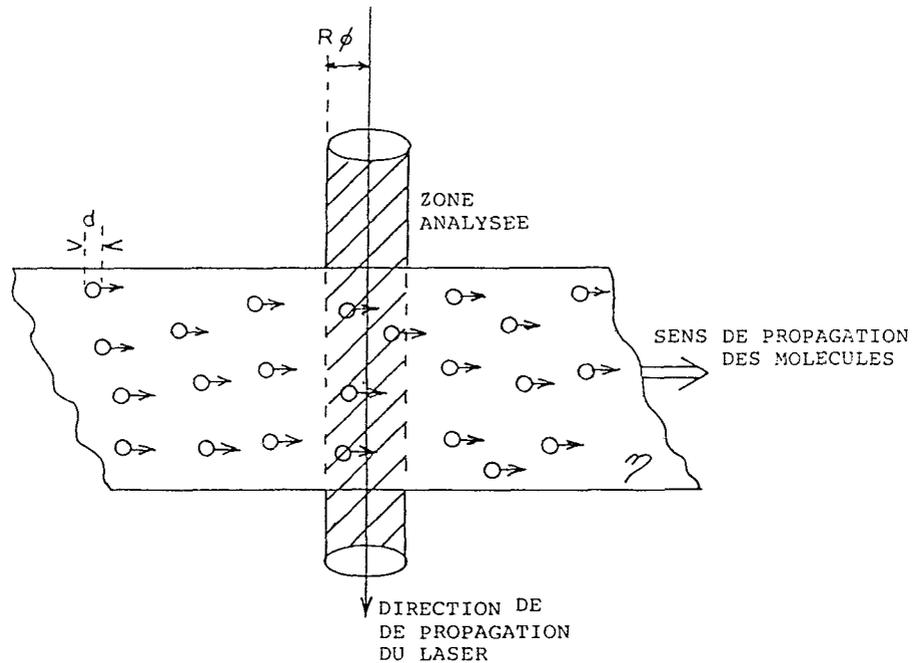


Figure II-11 : Propagation des molécules
Estimation du temps de transit.

Ainsi dans le cas d'une solution de fluoresceine ou $\eta = 10^{-2} P$, $d = 5,5 \text{ A}^\circ$, $r\emptyset =$, $T = 293 \text{ }^\circ\text{K}$, le temps de transit d'une molécule à travers le faisceau Laser est de l'ordre de la milliseconde.

A partir du nombre de photons absorbés par molécule et par seconde exprimé au tableau II-4, on peut estimer qu'une molécule absorbe donc au minimum $6 \cdot 10^6$ photons pendant son passage dans la zone analysée, ce qui est loin d'être négligeable comparé aux techniques d'excitation par arc.

I-4 : Décroissance de l'intensité d'émission de fluorescence

A) Causes

D'après les résultats précédents, il apparaît nettement qu'en microspectrofluorimétrie induite par Laser, le nombre important de photons absorbés par molécule et par seconde risque de nuire à la viabilité de l'échantillon et d'accentuer de façon considérable les phénomènes de décroissance de l'émission de fluorescence. En effet :

- Si l'on se souvient que la durée de vie de l'état singulet excité à partir duquel à lieu l'émission de fluorescence est de l'ordre de la nanoseconde, on peut admettre que la probabilité pour qu'un second photon soit absorbé par une molécule déjà excitée est de 1 %, cette réabsorption peut alors engendrer des processus de désactivation autres que la fluorescence.

- Si notre molécule fluorescente est instable et risque de se photodécomposer, une forte irradiation a pour effet d'activer le phénomène. Les produits de la photodécomposition étant dans la majorité des cas non fluorescents, ceci se traduit par une diminution de l'intensité d'émission.

Kaufman a mis en évidence la photodégradation de l'isothyanate de fluoresceine, il a montré que même après une période de non illumination pouvant aller jusqu'à 48 heures, l'intensité de fluorescence émise par une molécule qui a été trop fortement irradiée, est inférieure à l'intensité initiale (avant photoblanchiment).[42]

- La forte absorption de photons peut entraîner une augmentation non négligeable de la température. Généralement, à une augmentation de la température correspond une diminution du rendement quantique de fluorescence, ceci dans un rapport de 1 à 1,2 par degrés centigrade. Plus la température augmente, plus la viscosité diminue ce qui contribue à accroître les collisions entre les molécules présentes dans le milieu analysé et donc à augmenter la cinétique de l'extinction de type collisionnelle (cf annexe).

Une estimation de la température au point de focalisation du faisceau Laser a été réalisée à partir de la mesure du rapport intensité anti-Stokes sur intensité Stokes du spectre Raman d'une solution de tétrachlorure de carbone dans laquelle a été dissout de l'iode (10^{-2} M).

Pour évaluer la température, nous avons utilisé la relation :

$$I_{as} / I_s = A \cdot e^{-hc\bar{\nu}/KT}$$

I_s et I_{as} sont respectivement les intensités mesurées des raies Stokes et Antistokes de nombre d'onde $\bar{\nu}$ à la température absolue T . Le terme A , fait intervenir la loi de diffusion en ν^4 ainsi que les corrections dues à l'absorption de l'échantillon et à la réponse spectrale du spectrographe utilisé.

Nous considérons que les échanges énergétiques sont suffisamment rapides pour que l'énergie calorifique induite par absorption des photons par la molécule d'iode se transmette immédiatement aux molécules de tétrachlorure de carbone.

En comparant les paramètres caractérisant le milieu iode-tétrachlorure de carbone ainsi que les conditions opératoires utilisées pour l'estimation de la température par le rapport I_{as}/I_s aux paramètres et aux conditions propres à une analyse classique d'émission de fluorescence (solution de fluoresceine 10^{-8} M), on peut estimer que l'élévation de température dans ce second cas est négligeable. Dans le tableau II-5 figurent les paramètres caractérisant les deux milieux et l'estimation de la température au point de focalisation du faisceau Laser.

Iode dans CCl_4	:	:	Fluoresceine dans l'eau
	:	:	
	:	:	
10 mW	:	:	$< 0.5 \text{ mW}$
800	:	:	$1,6 \cdot 10^5$
	:	:	molaire
0.204	:	:	1
$2.47 \cdot 10^{-4}$:	:	$1.54 \cdot 10^{-3}$
$+40^\circ\text{C}$:	:	négligeable
	:	:	

Tableau II-5 : Evaluation de la température au point de focalisation du faisceau Laser

A priori, il semble donc qu'en solutions fluides, sous des conditions normales d'excitation, l'élévation de température n'est pas à l'origine du photoblanchiment.

B) Mise en évidence du phénomène de photoblanchiment.

Ce phénomène qui provoque une décroissance de l'intensité d'émission est généralement nuisible à la validité des mesures de fluorescence, aussi doit-il être limité le plus possible. Nous montrons ici l'importance de maîtriser correctement la densité de puissance au niveau de l'échantillon et établissons les paramètres d'analyse qui permettent de rendre négligeable le photoblanchiment.

Pour ce faire, nous avons étudié l'évolution de l'intensité d'émission d'une solution de fluoresceine ($2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$), contenue à l'intérieur d'un tube capillaire de $300 \mu\text{m}$ de diamètre, en fonction de la puissance et de la durée de l'irradiation (radiation à 488 nm du laser argon ionisé).

Les résultats de ces mesures sont rassemblés sur la figure II-12 où nous avons porté l'intensité de fluorescence en fonction de la durée d'irradiation pour diverses densités de puissance à l'échantillon.

On montre que pour des puissances relativement élevées, la cinétique de décroissance suit approximativement une loi logarithmique, d'abord très rapide elle atteint ensuite un palier que l'on peut expliquer par l'obtention d'un équilibre photostationnaire. On constate que dans les conditions précitées, la décroissance de l'intensité de l'émission de fluorescence peut être considérée comme négligeable pour des puissances d'excitation, au niveau de l'échantillon inférieure à une centaine de microwatts.

De manière à mettre en évidence l'influence du temps de transit sur le photoblanchiment, nous avons étudié (figure II-13) l'évolution de l'intensité d'émission de la fluoresceine ($2 \cdot 10^{-8} M$) dans des solutions de viscosités variables (mélange eau-glycérol).

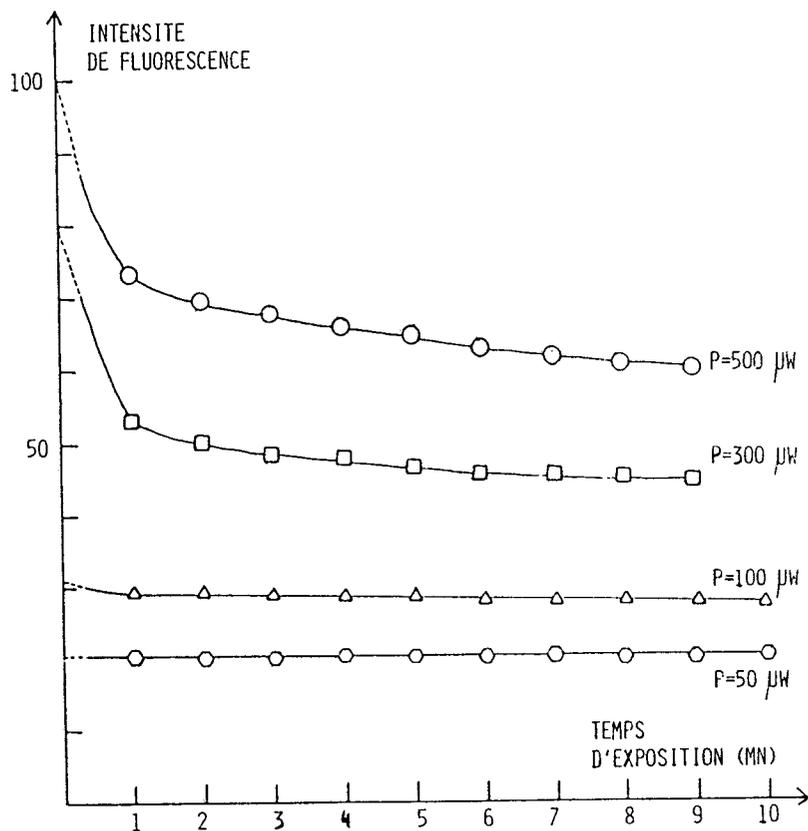


Figure II-12 : Décroissance de l'intensité de fluorescence
 $\lambda_{exc} : 488 \text{ nm}$ Solution de fluoresceine $2 \cdot 10^{-8} M$

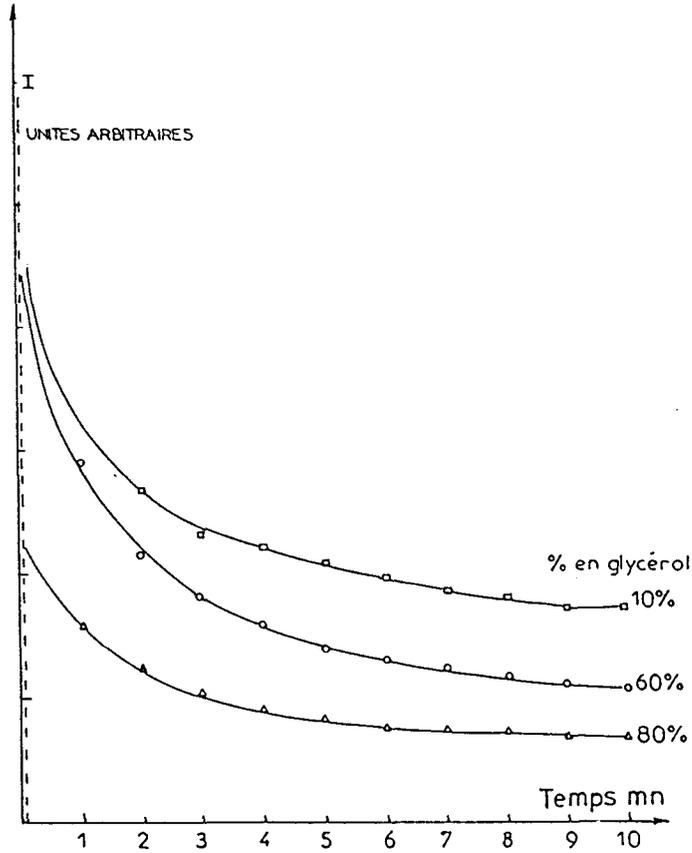


Figure II-13 : Influence du temps de transit sur le photoblanchiment

Nous avons pu montrer que la décroissance de l'intensité de fluorescence est d'autant plus importante et rapide que la viscosité de la solution est élevée. Ces résultats peuvent se justifier par une absorption plus importante de photons par les molécules de fluoresceine due à une augmentation du temps de passage au travers du faisceau Laser. Aussi, pour éviter le photoblanchiment, le seuil de puissance admissible à l'échantillon doit être limité à une dizaine de microwatts.

Si à partir des résultats de la figure II-12, on porte (fig. II-14) l'intensité de l'émission de fluorescence en fonction de la puissance d'excitation pour une durée d'exposition constante, on remarque que la plus grande perte de l'intensité de fluorescence a lieu dès les premières secondes d'irradiation.

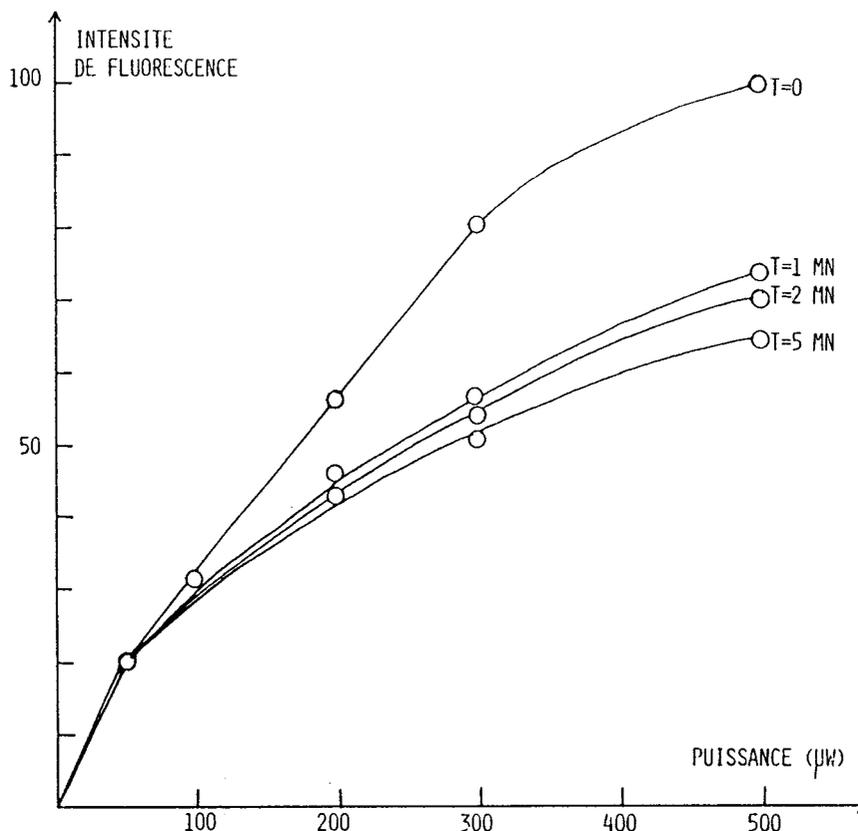


Figure II-14 : Intensité de fluorescence en fonction de la puissance d'excitation à durée d'irradiation donnée

L'état stationnaire est pratiquement atteint au bout de la première minute d'irradiation, même le premier spectre enregistré ($t = 0$), qui n'a nécessité qu'une seconde d'exposition au faisceau Laser, est perturbé aux puissances élevées. Cette perturbation est mise en évidence sur la figure II-15 où nous avons porté l'intensité de l'émission de fluorescence en fonction de la puissance d'excitation, lorsque la solution est soumise ou non à une circulation forcée à l'intérieur du tube capillaire.

Dans le cas où une circulation suffisamment rapide de la solution est assurée, tout risque de photoblanchiment est écarté et la loi linéaire qui relie l'intensité de l'émission de fluorescence et la puissance d'excitation est respectée.

Lorsque les molécules ne sont pas renouvelées par circulation du liquide la décroissance de l'intensité d'émission (ΔE) d'autant plus importante que la puissance d'excitation est élevée, est observable même pour une durée d'irradiation très brève (1 sec) et fait apparaître une non linéarité dans cette relation.

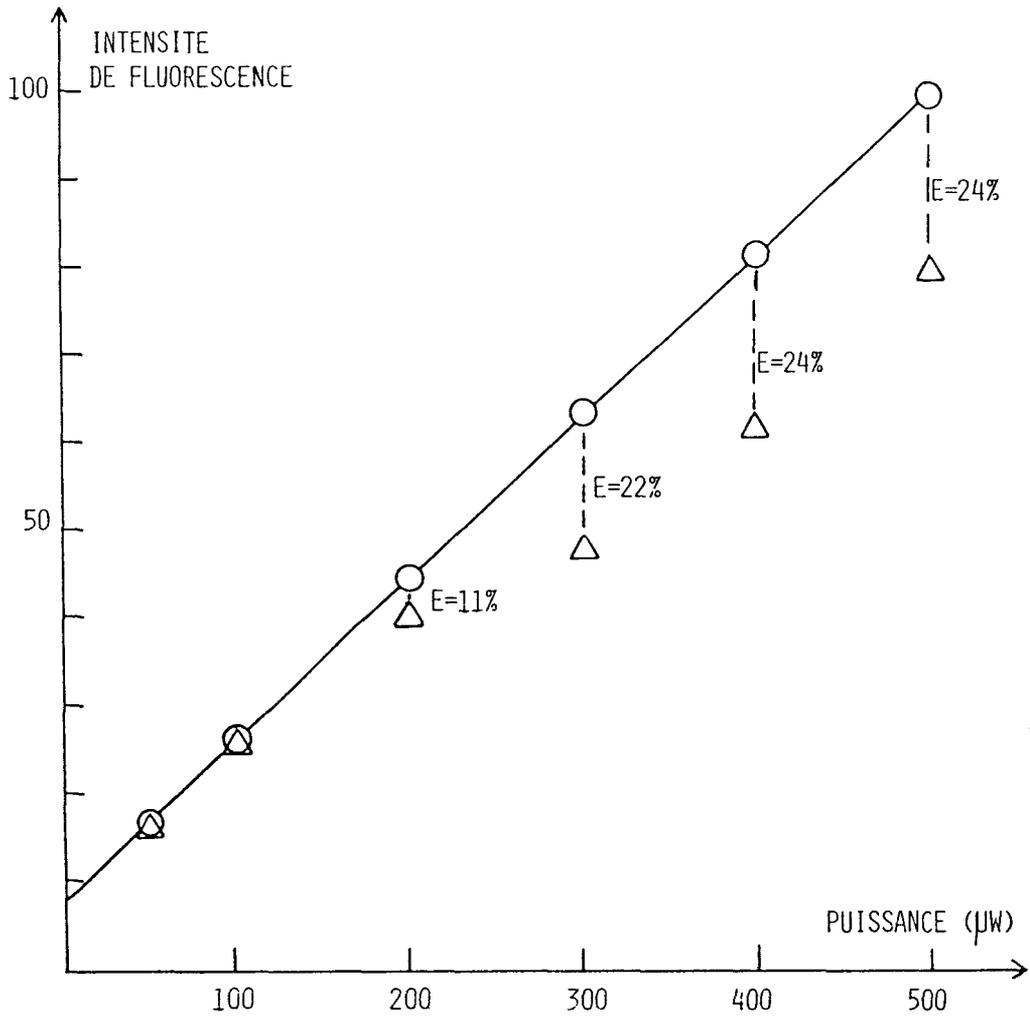


Figure II-15 : Intensité de fluorescence en fonction de la puissance d'irradiation

A) avec circulation ○ B) sans circulation △

Ces considérations quant à l'influence de la puissance et de la durée de l'irradiation sur la cinétique de décroissance de l'émission de fluorescence confirment l'intérêt d'utiliser une détection multicanale pour l'enregistrement de

spectres d'émission. La grande sensibilité de ces détecteurs permet de travailler avec des puissances d'excitation extrêmement faibles, le gain en rapport signal sur bruit comparé à un photomultiplicateur, peut au choix de l'utilisateur se traduire par un gain de temps lors de l'acquisition du spectre, ou par une diminution de la puissance du faisceau Laser au point de focalisation.

Parfois, le phénomène de photoblanchiment peut être exploité de façon intéressante notamment dans les études de diffusion dans des systèmes lipidiques [55,56].

- CHAPITRE II : APTITUDES DE LA MICROSPECTROFLUORIMETRIE INDUITE
PAR LASER QUANT A LA MESURE DES PARAMETRES
REGISSANT L'EMISSION DE FLUORESCENCE

Les méthodologies basées sur le principe de l'émission de fluorescence fournissent des renseignements à la fois d'ordre qualitatif et quantitatif. Elles permettent, par un spectre caractéristique, d'identifier un fluorophore particulier et d'en donner la concentration. Les perturbations que peuvent subir ces spectres caractéristiques, aussi bien au niveau de l'intensité d'émission qu'au niveau de la forme de la bande de fluorescence donnent des renseignements quant à la nature du milieu environnant la sonde fluorescente.

Toutefois de telles informations ne peuvent être accessibles que si le système d'analyse de l'émission de fluorescence présente :

- Une résolution spectrale suffisante pour permettre, sans ambiguïté, d'identifier un fluorophore donné ou de mettre en évidence des modifications éventuelles du spectre d'émission de ce fluorophore.

- Un système de détection suffisamment sensible, permettant l'obtention de signaux très peu bruyants, pour pouvoir rendre compte de toutes modifications susceptibles d'altérer l'intensité du signal de fluorescence (concentration, pH, présence d'inhibiteurs de fluorescence).

- Une optique d'excitation et de collection de l'émission de fluorescence n'engendrant pas de phénomènes particuliers risquant de nuire à la validité des résultats obtenus ou de conduire à une interprétation erronée de ces résultats.

Si les tests préliminaires présentés dans la première partie de ce travail permettent de répondre aux critères de sensibilité et de résolution spectrale, nous avons vu qu'en microspectrofluorimétrie induite par Laser, de nombreux paramètres liés autant à la source d'excitation utilisée qu'à la configuration de l'instrument peuvent interférer sur les résultats obtenus.

C'est pourquoi, dans le cadre de ce chapitre, nous nous proposons de tester l'aptitude de cette méthode d'investigation quant aux mesures :

- Quantitative d'émission de fluorescence : relation entre l'intensité d'émission et la concentration en fluorophore.
- Qualitative d'émission de fluorescence : influence du pH de la solution sur l'émission de fluorescence.
- D'extinction de fluorescence : étude de l'extinction dynamique de l'émission de fluorescence par l'iodure de potassium.
- De polarisation de fluorescence : vérification de la loi de Perrin.

Les résultats obtenus sont comparés à ceux donnés par des techniques conventionnelles d'analyse de l'émission de fluorescence. On discute, le cas échéant des corrections à apporter, notamment en polarisation de fluorescence.

Pour faciliter la comparaison avec les techniques conventionnelles d'analyse, la plupart des manipulations sont effectuées sur des solutions. Nous présentons toutefois, dans le cadre de la troisième partie de ce travail, quelques applications au niveau cellulaire, des divers principes ici énoncés.

II-1 : Relation entre l'intensité d'émission et la concentration en molécules de fluorophore.

Evaluation du seuil de sensibilité

Dans le cas où l'autoabsorption ($\epsilon l C$ faible) et l'extinction de fluorescence sont négligeables, il y a proportionnalité entre l'intensité de l'émission de fluorescence et le nombre de photons absorbés par seconde (cf annexe). On peut aussi dire qu'il y a proportionnalité entre l'intensité de l'émission et le nombre de molécules de fluorophore excitées et traduire cette relation par l'expression : [22]

$$I_f = Q I_0 (2,3\epsilon l C)$$

avec Q = Rendement quantique de fluorescence

ϵ = Coefficient d'absorption moléculaire du fluorophore

C = Concentration en mole/litre du fluorophore

l = Longueur du trajet optique dans l'échantillon.

A) Seuil minimum de détection

De manière à s'affranchir des risques de décroissance de l'intensité de l'émission de fluorescence (cf Chap. I-4) et pouvoir ainsi déterminer les limites de détection de l'appareil, nous avons étudié dans un premier temps, l'émission de fluorescence issue de solutions de fluoresceine soumises à une circulation forcée (pompe péristaltique) à l'intérieur d'un tube capillaire ($\varnothing = 300 \mu\text{m}$). Cette façon de procéder permet de détecter l'émission de fluorescence de solutions très diluées en conservant un rapport signal/bruit correct par augmentation de la durée de l'irradiation ou de la puissance d'excitation.

La figure II-16 représente la variation de l'intensité de l'émission de fluorescence en fonction de la concentration en mole/litre de la solution de fluoresceine circulant dans le tube capillaire. A chaque concentration, nous avons fait correspondre un nombre de molécules, estimé à partir du volume de la zone de détectibilité précédemment définie (cf chap. I.2)

La forte densité photonique du Laser et la grande sensibilité du système de détection confère à l'appareil un excellent seuil de détectivité.

Pour des concentrations très faibles ($< 10^{-9} \text{ M}$), la fluorescence du support utilisé (tube capillaire) et/ou la fluorescence intrinsèque de l'instrument (optique du microscope, optique de couplage, filtre d'arrêt) deviennent des facteurs limitatifs. A de telles concentrations, seules quelques centaines de molécules sont présentes dans la "zone de détectibilité".

Si certaines techniques de détection de l'émission de fluorescence permettent de déceler l'émission issue de solutions allant jusqu'à 10^{-14} M , pour des molécules dont le rendement quantique est voisin de celui de la fluoresceine, le volume de solution, donc le nombre de molécules analysées, est très important comparé au microvolume analysé par microspectrofluorimétrie Laser.

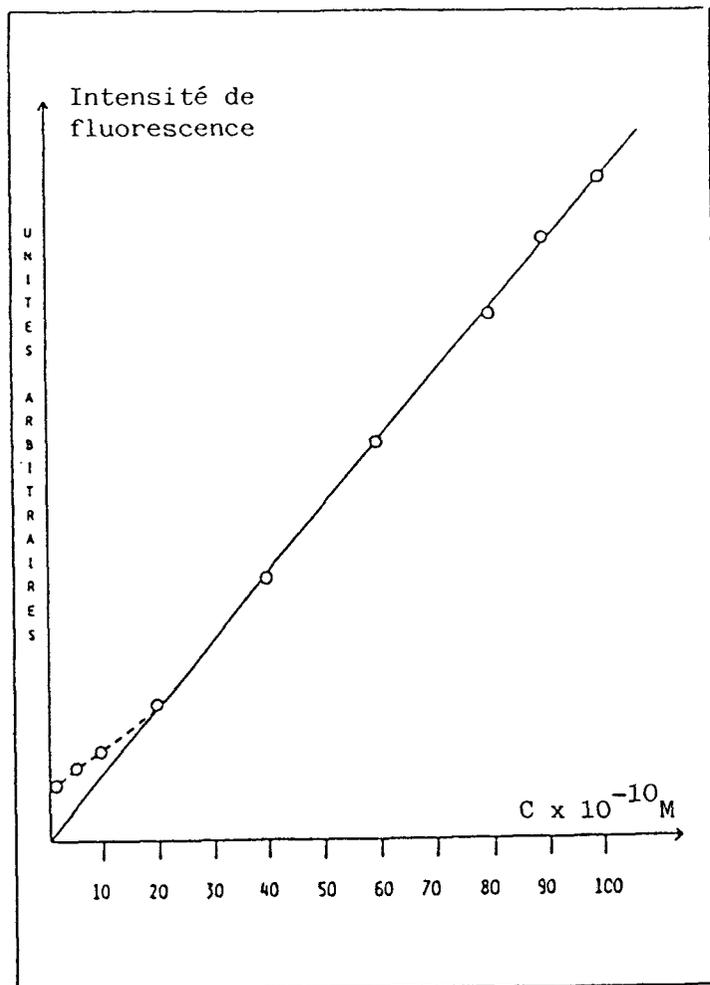


Figure II-16 : Estimation du seuil minimum de détection
Solutions de fluoresceine (milieu HEPES pH 7,2)

B) Seuil pratique de détection

En pratique, il n'est pas envisageable d'augmenter de façon inconsidérée la puissance d'excitation ou la durée de l'irradiation. Généralement, on se doit, pour éviter tout risque d'altération de l'échantillon, de travailler avec des puissances aussi faibles que possible.

Si dans le cas d'une solution de fluoresceine la puissance peut être limitée à une centaine de microwatts (cf I-4.B) pour éviter le photoblanchiment, lors d'études au niveau de la cellule unique, celle-ci ne doit pas excéder quelques microwatts pour préserver l'intégrité cellulaire. Aussi, il nous a paru nécessaire de déterminer le seuil de détection de l'instrument avec de telles conditions expérimentales.

Les résultats obtenus, pour une puissance de $1 \mu\text{w}$ à l'échantillon, sont portés sur la figure II-17.

Les diverses solutions de fluoresceine, soumises à leurs seuls mouvements moléculaires, sont analysées au travers d'un tube capillaire.

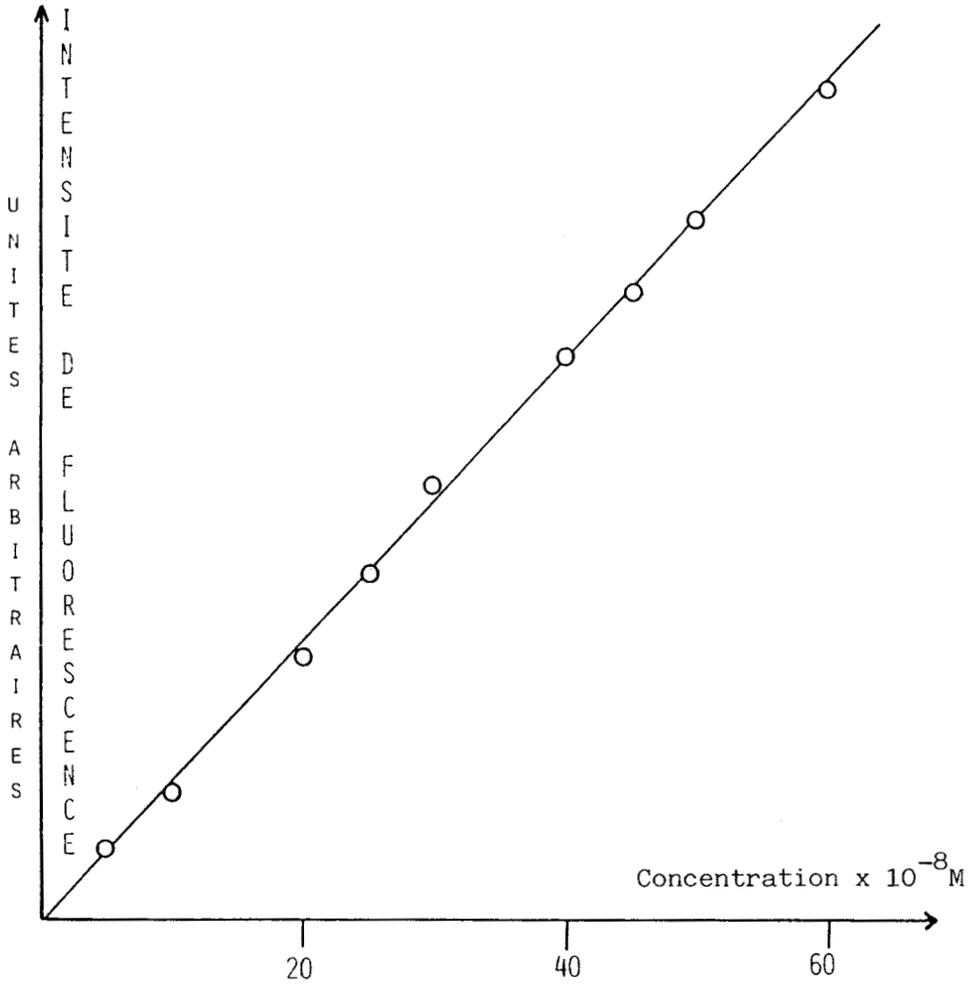


Figure II-17 : Seuil pratique de détection

Fluoresceine milieu Hepes pH 7,2 puissance $1 \mu\text{w}$

La loi entre l'intensité de fluorescence et la concentration en fluorophore est respectée pour des concentrations allant jusqu'à 10^{-8} M.

Toutefois, le fait de s'imposer une puissance très faible pour l'excitation nous amène, pour l'enregistrement du spectre, à augmenter considérablement la durée de l'irradiation.

Bien qu'il soit préférable, pour éviter la décroissance de l'émission de fluorescence, de travailler à faible puissance et temps d'intégration long, la durée de l'irradiation représente une limite à ne pas négliger.

En effet, lors des études d'accumulation ou d'élimination d'un fluorophore à l'intérieur d'une cellule vivante isolée, la concentration en espèce fluorescente devra être suffisante pour permettre, lors de l'enregistrement du spectre, de sélectionner un temps d'intégration suffisamment bref pour envisager le suivi de l'évolution temporelle du phénomène à observer.

Avec une puissance de $1 \mu\text{w}$ à l'échantillon et un temps d'intégration de une seconde, l'appareil permet, dans les conditions précitées, de détecter avec un rapport signal/bruit satisfaisant ($S/B = 5$), l'émission de fluorescence issue d'une solution 10^{-7} M de fluoresceine (milieu HEPES pH 7,2) ce qui correspond à quelques milliers de molécules présentes dans la "zone de détectibilité".

L'utilisation d'objectifs à immersion à grande ouverture numérique permet, à rapport signal/bruit identique, de diminuer la puissance du faisceau d'excitation ou la durée de l'irradiation ou encore d'améliorer le seuil de détectivité.

Les dimensions de la "zone de détectibilité" pour un objectif à immersion de grandissement X100 sont tout à fait compatibles aux dimensions cellulaires ce qui permet d'envisager, dans de nombreux cas, des analyses quantitatives au niveau d'une cellule vivante isolée [57]. La concentration en molécules de fluorophore à l'intérieur de la cellule est obtenue en comparant pour un fluorophore donné, les intensités d'émission obtenues au niveau cellulaire et en solution étalon, on doit cependant estimer que toutes les conditions expérimentales ainsi que le volume de la "zone de détectibilité" sont rigoureusement identiques.

Toutefois de nombreux paramètres physico-chimiques tels que le pH, la présence d'inhibiteurs de fluorescence, la viscosité, la température, peuvent, pour un même nombre de molécules de fluorophore analysées, modifier considérablement l'intensité d'émission. Dans la suite de ce chapitre, nous donnons quelques exemples mettant en évidence l'influence de quelques-uns de ces paramètres sur l'intensité de l'émission de fluorescence de la fluoresceine.

La cellule étant un milieu hétérogène, dans lequel on distingue des compartiments de propriétés différentes, il est très difficile, au niveau de la cellule unique de maîtriser tous ces paramètres. Ceci suggère donc d'utiliser, avec beaucoup de précautions, la méthode précédemment décrite pour l'évaluation de la concentration intra-cellulaire en fluorophore.

II-2 : Influence du pH sur l'intensité d'émission de fluorescence :

Une variation de pH engendre généralement des modifications dans le spectre d'absorption et par suite dans le spectre d'émission d'un fluorophore [22].

Ces modifications peuvent se traduire par un déplacement spectral de la bande de fluorescence ou une variation non négligeable de l'intensité d'émission. Ceci explique l'importance, autant au niveau qualitatif que quantitatif, de maîtriser ce paramètre.

La figure II-18 représente les spectres d'émission d'une solution de fluoresceine 10^{-8} M en fonction du pH.

Si dans ce cas précis, on n'observe pas de déplacement spectral de la bande de fluorescence, on constate toutefois une forte diminution de l'intensité d'émission au pH acide. Cette observation suggère donc une variation importante du rendement quantique du fluorophore des pH basique aux pH acide.

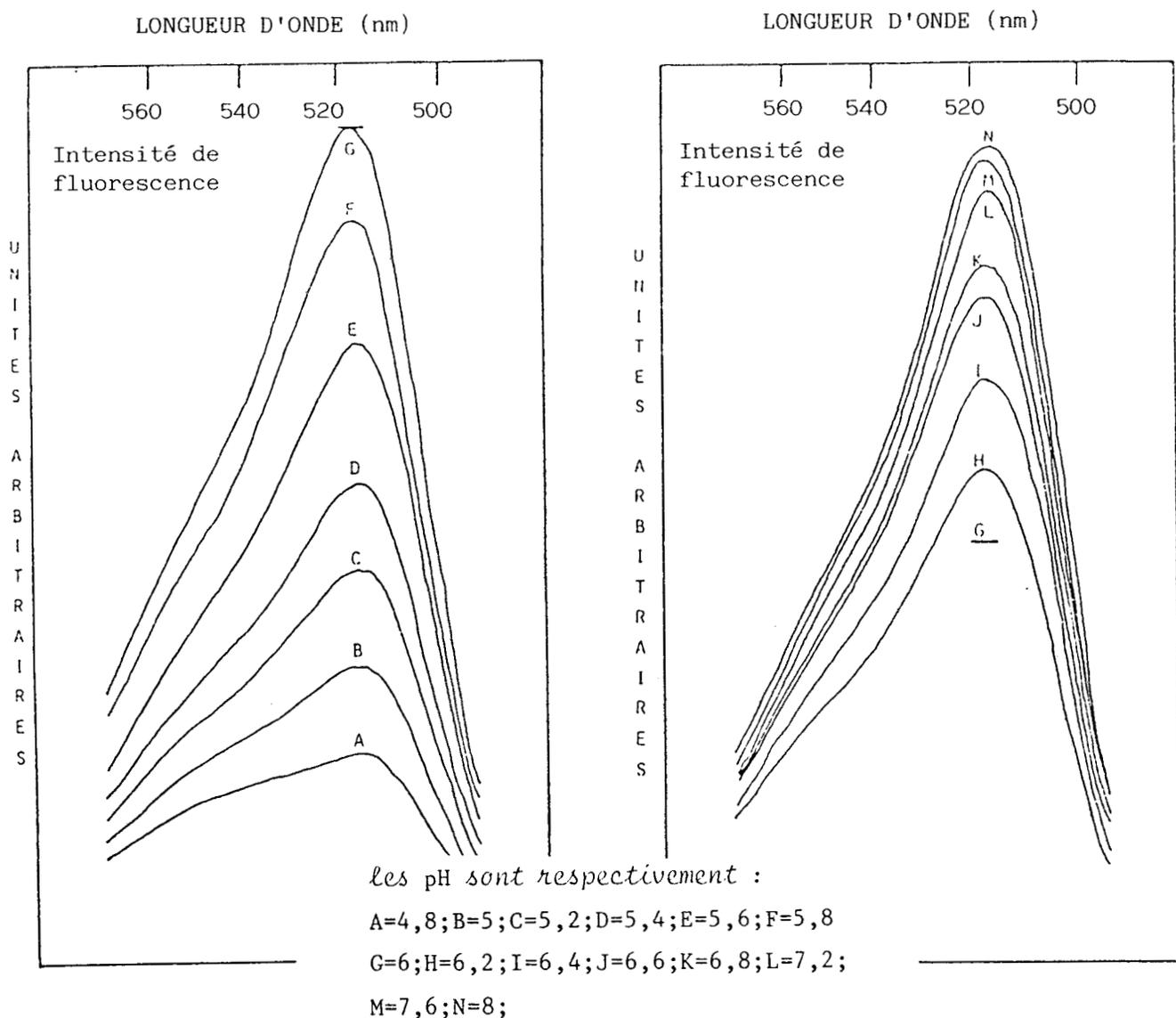


Figure II-18 : Spectres d'émission d'une solution de fluoresceine en fonction du pH (solution 10^{-8} M)

La courbe de la figure II-19 représente l'évolution de l'intensité d'émission de la fluoresceine en fonction du pH. Le point d'inflexion de cette courbe permet de déterminer le PK du fluorophore, la valeur de 6,33 est en accord avec celle de la littérature. La connaissance du rendement quantique de la fluoresceine aux pH 7 et 13 permet, à partir de la courbe de la figure II-19, de déterminer ce rendement pour toutes les autres valeurs de pH [1].

On remarque que pour un pH acide ($\text{pH} < 3$), le rendement quantique de la fluoresceine est pratiquement nul alors qu'il est proche de l'unité (0,92) en milieu basique ($\text{pH} > 9$)

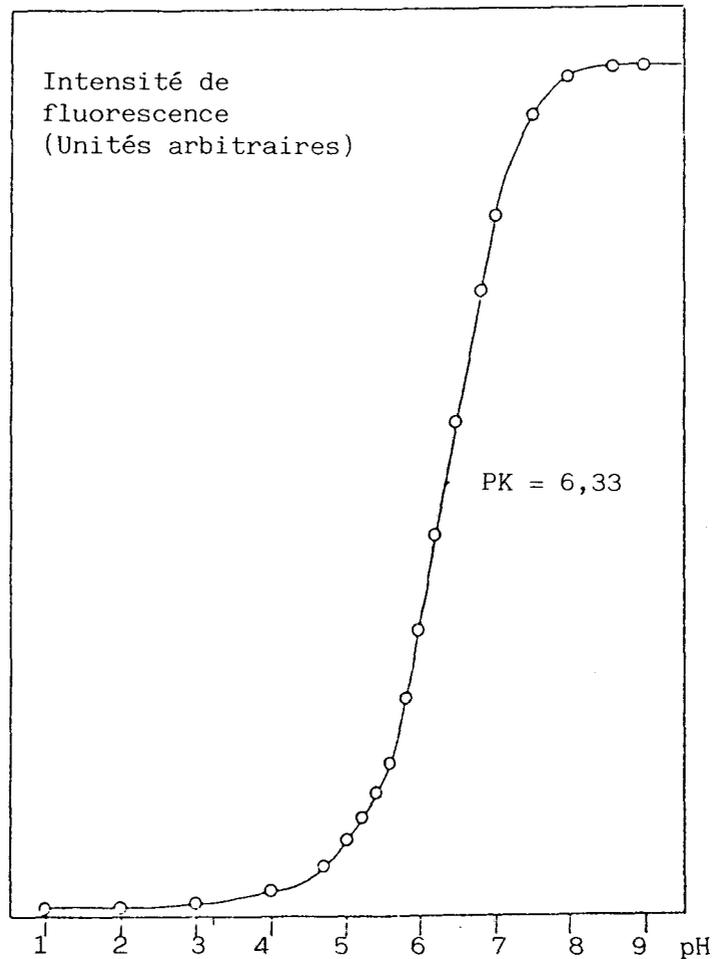


Figure II-19 : Intensité de l'émission de fluorescence d'une solution de fluoresceine en fonction du pH

II.3 : Extinction de fluorescence

Extinction dynamique de l'émission de fluorescence de la fluoresceine par l'iodure de potassium

La fluorescence d'une substance est généralement plus affectée par son environnement que ne l'est l'absorption. Par exemple, la fluorescence peut être fortement réduite, c'est-à-dire que le rendement quantique d'émission de fluorescence peut être considérablement diminué par des substances qui n'ont qu'une influence minime sur le spectre d'absorption.

Les processus d'extinction se classent grossièrement en deux catégories (cf annexe), l'extinction de type collisionnel (a) et l'extinction par formation de complexes ayant un rendement quantique nul ou très faible (b). Les inhibiteurs de type (a) affectent la durée de vie de l'état excité, alors que ceux du type (b) réduisent simplement la concentration en molécules effectivement fluorescentes. Les équations qui permettent de représenter ces deux types d'extinction sont définies en annexe [21].

Notre but ici est de s'assurer que l'irradiation élevée d'une substance fluorescente par un faisceau Laser focalisé n'affecte en rien sa cinétique d'extinction.

Pour ce faire, une étude de l'extinction dynamique de la fluoresceine par l'iodure de potassium est conduite en analyse conventionnelle d'émission de fluorescence et en microspectrofluorimétrie induite par Laser.

Toutes les mesures sont réalisées à 20°C et en présence d'oxygène atmosphérique. Afin de s'affranchir des erreurs provoquées par les ajouts d'inhibiteur (KI) nous apportons aux résultats expérimentaux, les corrections dues aux modifications de volume.

- Spectrofluorimétrie conventionnelle :

Les mesures ont été réalisées à l'institut de biochimie d'Orsay (Pr Volfin) sur un spectrofluorimètre Jobin Yvon (JY3) dont la cuve de mesure peut être thermostatée et agitée. L'excitation est réalisée par une lampe à Xénon couplée à un monochromateur. L'émission de fluorescence est collectée à 90° de l'excitation.

Les résultats présentés (figure II-21) sont issus d'un volume de 3 ml d'une solution de fluoresceine (10^{-6} M, HEPES pH 7.2) dans lequel sont ajoutées des doses de 25 µl d'une solution d'iodure de potassium (molaire).

- Microspectrofluorimétrie Laser :

Le faisceau Laser est focalisé à l'intérieur d'un tube capillaire ($\varnothing = 300 \mu\text{m}$) dans lequel circule la solution thermostatée de fluoresceine.

On travaille sur un volume de 100 ml de solution de fluoresceine ($2 \cdot 10^{-8} M$ dans l'HEPES pH 7.2) dans lequel on ajoute des doses de 200 μl d'une solution d'iodure de potassium (4 M).

Sur la figure II-20 sont portés quelques spectres d'émission d'une solution de fluoresceine $2 \cdot 10^{-8} M$ en fonction de la concentration en iodure de potassium.

La forme de la bande de fluorescence n'est pas modifiée, seule l'intensité d'émission diminue avec la concentration en inhibiteur.

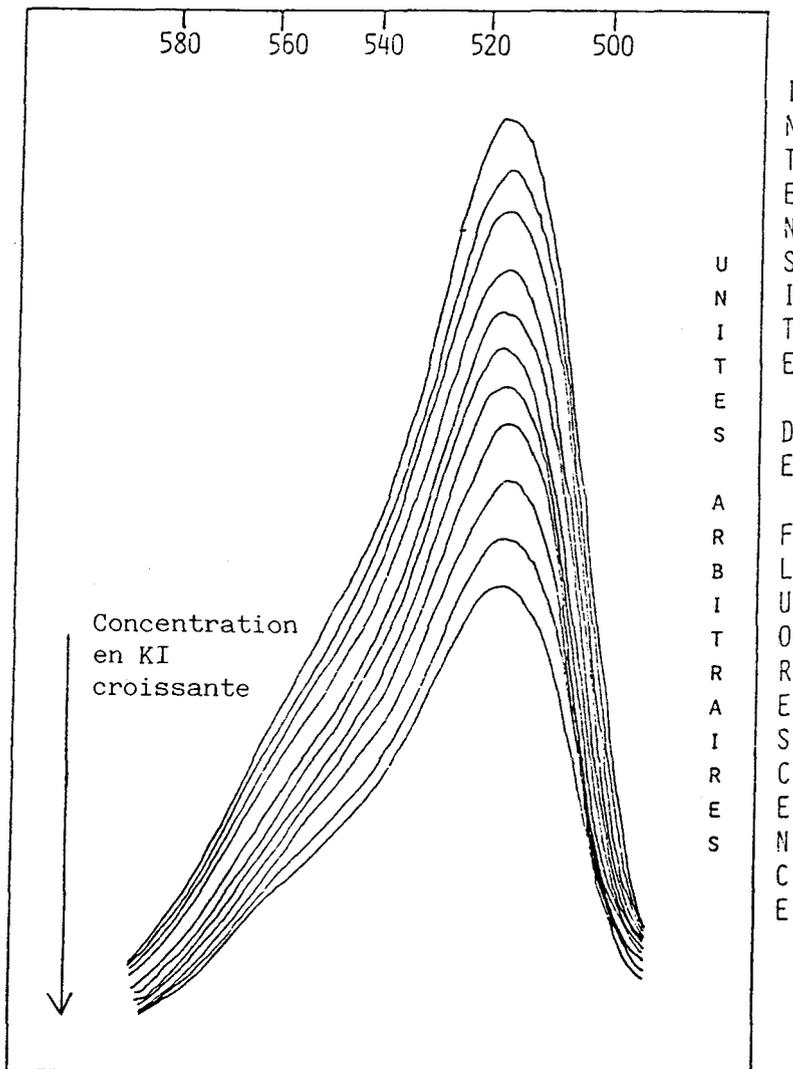


Figure II-20 : Spectres d'émission d'une solution $2 \cdot 10^{-8} M$ de fluoresceine en fonction de la concentration en iodure de potassium

D'après la figure II-21, on constate que la loi de Stern Volmer qui rend compte de l'extinction dynamique est vérifiée. Les cinétiques d'extinction obtenues selon les deux modes d'analyse sont comparables.

Il apparait que l'irradiation par faisceau Laser, tout du moins dans la gamme de puissance où nous nous sommes fixés de travailler, n'entraîne pas de perturbations risquant de nuire aux mesures d'extinction. La forte densité photonique du Laser qui aurait pu être à l'origine de ces perturbations (échauffement local, dégradation photochimique du KI, modifications des mécanismes de désactivation) peut être exploitée de manière favorable en permettant des études d'extinction sur un très petit nombre de molécules comparé aux méthodes conventionnelles.

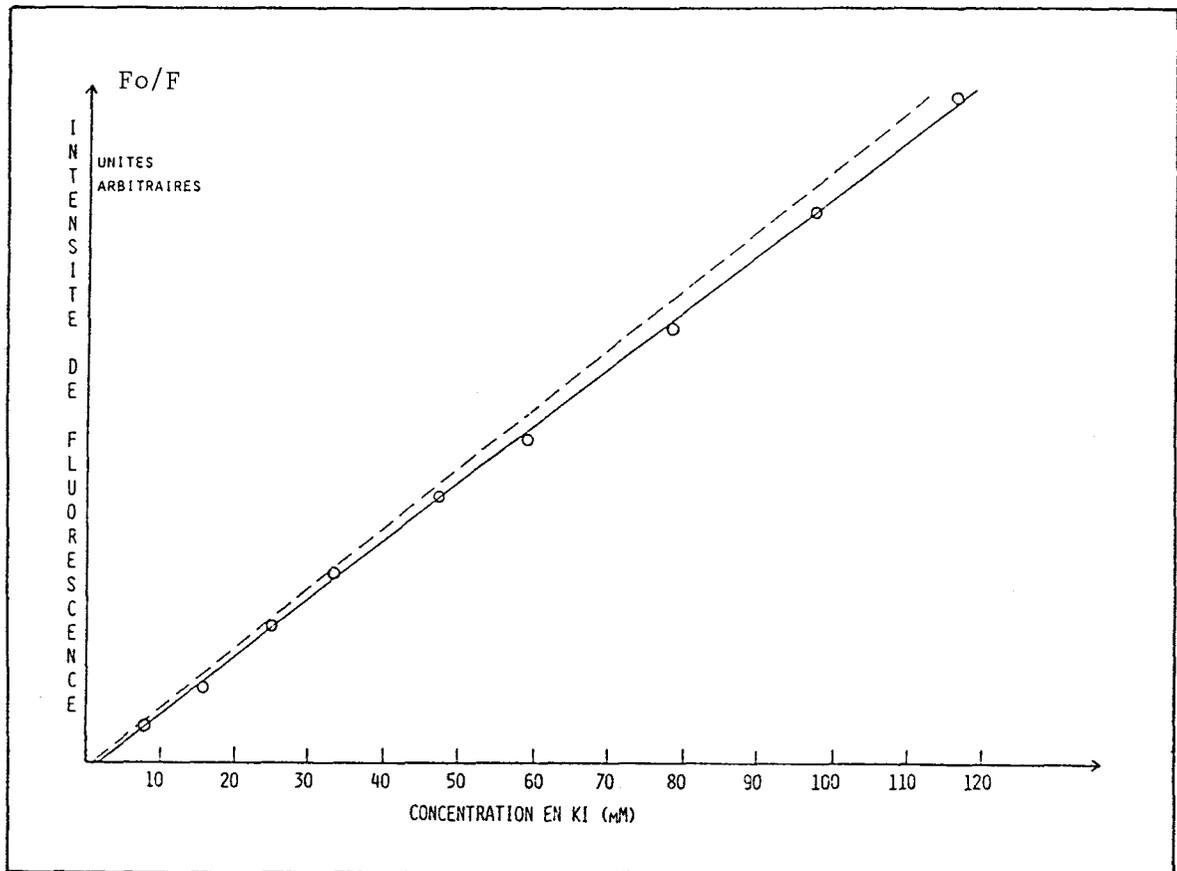


Figure II-21 : Vérification de la loi de Stern Volmer

F_0/F en fonction de la concentration en KI

- - - Spectrofluorimétrie conventionnelle (sol 10^{-6} M)
- Microspectrofluorimétrie Laser (sol $2 \cdot 10^{-8}$ M)

Remarque :

Dans le cas de la microspectrofluorimétrie induite par Laser, nous avons utilisé une solution très peu concentrée de fluoresceine de manière à être amené à travailler au maximum de puissance autorisée pour l'excitation ($\approx 50 \mu\text{W}$).

II-4 : Polarisation de fluorescence

Vérification de la loi de Perrin

Devant l'intérêt des renseignements apportés par les mesures de polarisation de fluorescence dont le principe et les domaines d'applications sont brièvement présentés en annexe, il nous a semblé inconcevable de ne pas tirer profit de cette méthodologie d'analyse au niveau de la microspectrofluorimétrie [58,59].

Toutefois, nous avons déjà signalé que deux éléments principaux entrant dans la configuration des microspectromètres sont, à priori, susceptibles de modifier considérablement les mesures de polarisation, rappelons :

- La présence d'une lame semi réfléchissante pour séparer le faisceau d'excitation du faisceau d'émission.
- L'utilisation d'objectifs de microscope à grande ouverture numérique pour la focalisation de la radiation excitatrice et la collection de la lumière émise ou diffusée.

Après un aperçu des méthodes conventionnelles de mesure de la polarisation de fluorescence et un bref rappel des conditions à respecter pour obtenir des résultats significatifs, nous analysons les perspectives de rendre ce type d'analyse accessible en microspectrofluorimétrie induite par Laser.

Nous discutons des influences respectives des composants optiques qui différencient les deux méthodes d'investigations et proposons une méthodologie pour la mesure de la polarisation de fluorescence à partir de microspectrofluorimètres.

La méthodologie d'analyse étant définie, nous présentons un exemple classique d'application de la polarisation de fluorescence et vérifions la corrélation des résultats obtenus en analyse conventionnelle et en microspectrofluorimétrie induite par Laser.

A) Mesure de la polarisation de fluorescence par des appareils conventionnels

Pour les mesures de polarisation de fluorescence en lumière polarisée rectilignement, la géométrie la plus couramment employée est celle dite à 90°, où la direction de propagation de l'onde incidente est perpendiculaire à la direction de collection de la lumière émise. On détermine la polarisation de fluorescence soit à l'aide d'un spectrofluorimètre équipé d'accessoires de polarisation soit à partir de fluorimètres spécifiques à ce type de mesures. [58]

a) Spectrofluorimètre équipé pour la polarisation

Le montage généralement utilisé est présenté sur la figure II-22.

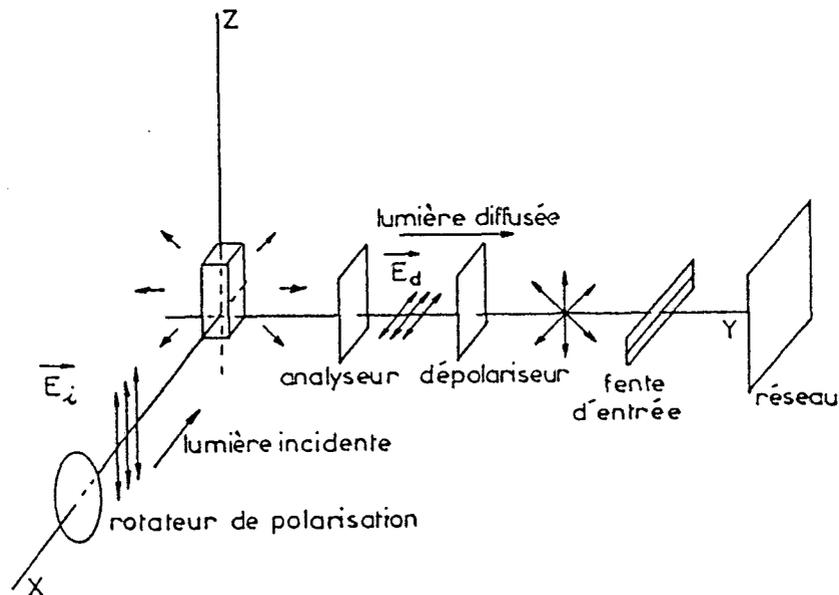


Figure II-22 : Configuration d'un appareil conventionnel de mesures de la polarisation de fluorescence.

Le polariseur d'excitation (P_1), réglé sur une polarisation verticale (direction du vecteur champ électrique perpendiculaire au plan XOY) est fixe.

Le polariseur d'analyse (P_2) permet en deux mesures successives d'atteindre les valeurs de $I_{//}$ et I_{\perp} utilisées pour la détermination du taux de dépolarisation P qui s'exprime d'après l'équation :

$$P = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + I_{\perp})$$

La valeur de $I_{//}$ est obtenue lorsque la direction du vecteur champ électrique de l'onde incidente est parallèle à celui de la radiation émise alors que la valeur de I_{\perp} correspond au cas où les vecteurs champ électrique des deux ondes sont perpendiculaires.

Pour éviter les effets néfastes de la polarisation de la lumière naturelle par le monochromateur d'analyse, il est courant d'utiliser un troisième polariseur réglé à 45° qui permet d'éliminer cet effet parasite.

Plusieurs variantes de montages ont été utilisées [60], toutefois celle décrite ici, qui utilise simultanément un analyseur et un dépolariseur est réputée donner la meilleure précision sur la valeur du taux de dépolarisation. Toutefois, cette technique qui consiste à faire deux mesures successives de l'émission de fluorescence pour la détermination de $I_{//}$ et I_{\perp} doit être utilisée avec circonspection. En effet, la durée de l'analyse est préjudiciable à l'étude de substances fortement photodégradables et, pour obtenir des résultats reproductibles, la source doit être parfaitement stabilisée. Pour pallier ces inconvénients, des appareils plus spécifiques ont été développés.

b) Fluorimètre spécifique aux études de polarisation

Le schéma synoptique d'un tel instrument est représenté sur la figure II-23 [22].

Le système est constitué de deux arbres d'analyse (A et B) qui permettent une mesure simultanée de $I_{//}$ et de I_{\perp} .

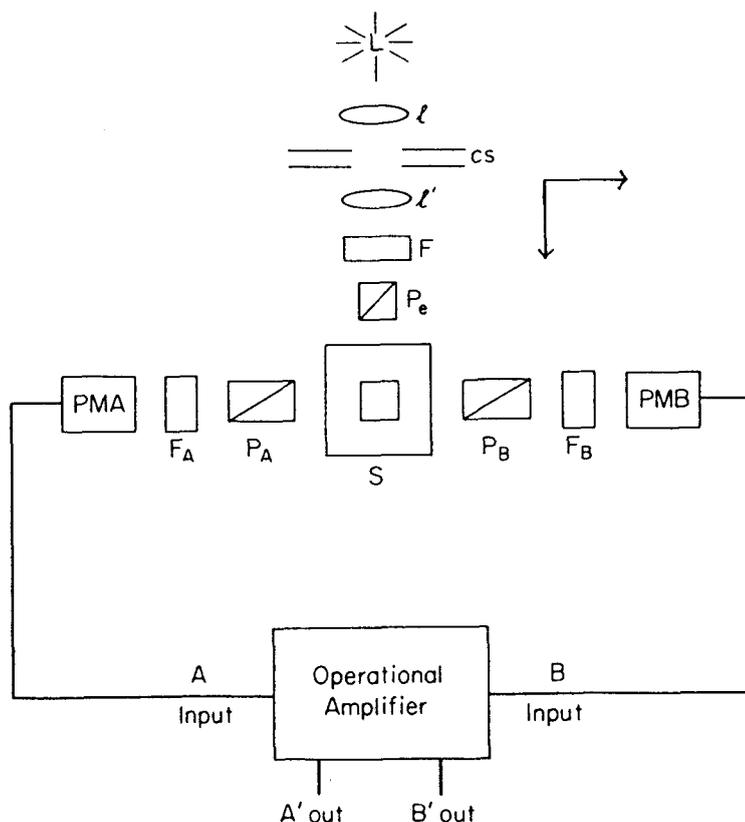


Figure II-23 : Fluorimètre spécifique aux études de polarisation

Les polariseurs d'analyses (PA et PB) sont orientés de telle sorte qu'ils laissent passer respectivement la lumière dont le vecteur champ électrique est contenu dans le plan XY (PA) ou parallèle à l'axe Z (PB).

Le polariseur d'excitation a deux positions :

- soit il laisse passer la lumière polarisée dans le plan YZ, avec un vecteur champ électrique parallèle à l'axe Z, c'est la géométrie utilisée pour la détermination de $I_{//}$ et I_{\perp} .

- Soit il laisse passer la lumière suivant le plan XY avec un vecteur champ électrique parallèle à l'axe X, c'est la géométrie utilisée pour l'étalonnage de l'appareil puisque dans ce cas la valeur de I_{\perp} est mesurée dans les deux bras d'analyse.

Un tel montage optique est de plus grande sensibilité qu'un spectrofluorimètre équipé d'un accessoire de polarisation.

B) Remarques sur la qualité des mesures de polarisation de fluorescence

La qualité des mesures de polarisation de fluorescence dépend d'un certain nombre de conditions expérimentales qu'il convient de rappeler et de discuter :

- La solution étudiée doit être excitée avec une lumière aussi parallèle que possible et polarisée verticalement.

Pour minimiser l'effet de la biréfringence, l'échantillon doit être éclairé normalement à ces faces qui devront être taillées et polies.

- L'angle de collection doit être le plus faible possible pour que la lumière émise puisse encore être considérée comme parallèle.

- Pour les appareils équipés d'un monochromateur, l'utilisation d'un dépolariseur placé entre l'analyseur et la fente d'entrée est indispensable dans le cas où la mesure de $I_{//}$ et de I_{\perp} est faite par rotation de l'analyseur. Cette précaution permet de s'affranchir de la réponse des réseaux de diffraction à la lumière polarisée.

Toutefois, si la réalisation d'un faisceau parallèle de petite taille est concevable, elle se fait toujours au détriment de l'intensité lumineuse incidente et donc au détriment de la détectivité de l'instrument. Pour pallier cet inconvénient, on utilise un faisceau incident légèrement convergeant ($+4^{\circ}$), parfois pour gagner en sensibilité on travaille avec des angles solides plus grands, cependant pour des ouvertures supérieures à 10° des corrections peuvent être nécessaires.

Les divers éléments optiques qui permettent d'améliorer la qualité des mesures de polarisation diminuent néanmoins l'intensité des signaux, dans de nombreux cas, un compromis doit être trouvé entre la précision à donner au taux de polarisation et la qualité du rapport signal/bruit de la mesure. Dans cette optique, une méthode qui consiste à moduler la polarisation de la lumière incidente en conservant une orientation fixe à l'analyse pour la mesure de $I_{//}$ et I_{\perp} est très intéressante, elle permet en effet d'éviter l'utilisation d'un dépolariseur. La

rotation du vecteur champ électrique de l'onde incidente peut être assurée en interposant sur le trajet d'excitation, une lame demi-onde ou mieux une cellule de Pockels qui permet d'éviter les jeux mécaniques.

C) Mesure de la polarisation par des microspectromètres

Nous venons de passer en revue les principales conditions qui, tant au niveau de la géométrie d'excitation qu'au niveau de la collection de l'émission, permettent d'entreprendre des mesures significatives de polarisation.

On constate que, les microspectromètres qui travaillent en mode "rétro" et utilisent pour la focalisation de la radiation excitatrice et la collection de l'émission des objectifs à grandes ouvertures ne semblent pas se prêter de façon satisfaisante aux conditions idéales pour ce type de mesures. Une étude plus approfondie du rôle des éléments optiques qui différencient un microspectromètre d'un appareil conventionnel s'avère donc indispensable avant de vouloir envisager des mesures correctes de polarisation.

1 - Perturbations dues à la lame semi-réfléchissante et au système dispersif [61,62].

Les lames semi-réfléchissantes utilisées sont des lames diélectriques inclinées à 45° par rapport à la direction de propagation de l'onde incidente.

La proportion de lumière transmise ou réfléchi par une telle lame dépend de la nature de celle-ci, de la direction de propagation et de la polarisation de la lumière qu'elle reçoit. Ceci nous impose donc d'apporter quelques corrections quant aux spectres enregistrés en lumière polarisée. Deux facteurs de corrections peuvent être définis :

- Un facteur de réflexion (R), qui tient compte des modifications dues aux éléments optiques présents sur le trajet d'excitation.

- Un facteur de transmission (T), qui tient compte à la fois des effets induits par les éléments optiques du trajet d'analyse et par le système dispersif.

Les deux facteurs R et T sont fonctions de la longueur d'onde.

Pour évaluer le facteur de réflexion R , nous avons mesuré la puissance reçue au niveau de l'échantillon pour différentes orientations du plan de polarisation du faisceau Laser d'excitation. Le montage utilisé est représenté sur la figure II-24.

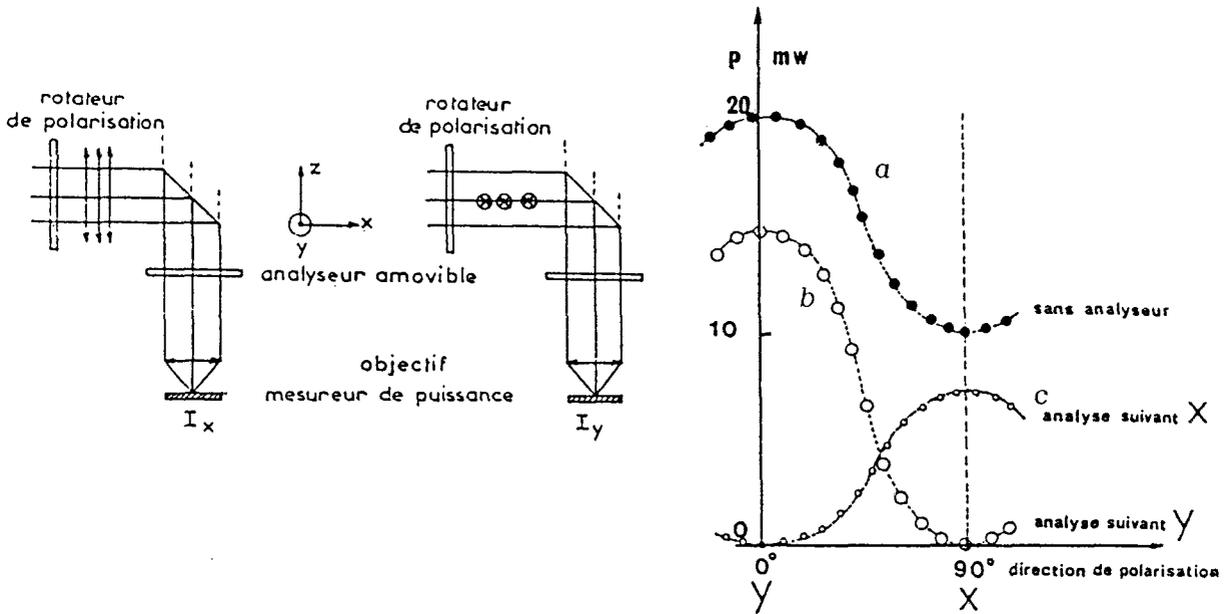


Figure II-24 : Montage utilisé pour la mesure du facteur R (à $\lambda = 488 \text{ nm}$)
Effet de la lame semi-transparente en réflexion.

Un rotateur de polarisation, lame demi-onde, placé en sortie du faisceau Laser permet d'orienter le plan de polarisation de la radiation excitatrice, dans une direction quelconque autour de sa direction de propagation. Après réflexion sur la lame semi-transparente, la puissance du faisceau Laser est mesurée en fonction de l'orientation du plan de polarisation. Pour cela, un mesureur de puissance insensible à la polarisation du faisceau qu'il reçoit est placé au niveau de l'échantillon. Pour s'affranchir des effets induits par l'objectif de microscope, la radiation excitatrice n'est pas focalisée sur la cellule photo-sensible du mesureur de puissance.

On détermine, pour chaque longueur d'onde disponible avec le Laser utilisé, le coefficient R défini comme le rapport des puissances obtenues pour les deux orientations particulières du vecteur champ électrique \vec{E}_{iy} et \vec{E}_{ix} . Une courbe similaire à celle de la figure II-24(a), nous permet d'évaluer le coefficient de réflexion R , dont la valeur est généralement comprise entre 1,5 et 3 et de repérer

les positions du rotateur de polarisation correspondant aux deux directions adéquates du plan de polarisation de la radiation excitatrice. On note, en couplant un analyseur au mesureur de puissance, qu'aucune dépolarisation n'est engendrée par la lame semi-transparente (fig. II-24 b et c), c'est-à-dire qu'avant l'objectif de microscope, l'onde incidente est parfaitement polarisée rectilignement.

L'analyse du système, lame séparatrice, analyseur, réseau de diffraction a permis d'établir un facteur de transmission global (T). Ce facteur qui peut atteindre la valeur 30 en l'absence de dépolariseur n'excède plus 2.5 lorsqu'un tel élément est placé devant la fente d'entrée du système dispersif.

Comme avec les appareils conventionnels, pour réaliser des mesures de polarisation deux possibilités sont envisageables :

- Travailler avec une direction fixe à l'analyse optimisée de manière à se situer au maximum d'efficacité du système dispersif (perpendiculaire aux traits du réseau) et faire varier la position du plan de polarisation de la radiation excitatrice. On utilise alors le facteur de correction R et on exprime le taux de dépolarisation par la relation :

$$P = (R_{I//} - I_{\perp}) / (R_{I//} + I_{\perp})$$

- Travailler avec une direction fixe pour l'excitation et faire varier la position de l'analyseur. On utilise alors le facteur de correction T.

Toutefois, la solution qui consiste à moduler la polarisation de la radiation excitatrice est préférable. Outre le fait qu'elle permet d'éviter l'emploi d'un dépolariseur, les valeurs du facteur de réflexion R utilisé sont connues avec plus de précision que celles du facteur de transmission T. De plus si quelques valeurs de ce facteur R (une pour chaque radiation excitatrice disponible) sont suffisantes pour envisager des mesures de polarisation de fluorescence, les valeurs du facteur de transmission T doivent être définies pour chaque longueur d'onde de la lumière émise.

2 - Perturbations dues à l'objectif de microscope

De par la présence de l'objectif de microscope, les conditions requises pour obtenir des mesures significatives de polarisation de fluorescence semblent compromises. En effet l'emploi d'objectif à grande ouverture numérique (ON 0,95) implique un angle de demi-ouverture ($71^\circ 8'$) très éloigné des conditions idéales pour ce type de mesure. [58,60]

Pour exprimer les propriétés de polarisation de la lumière au niveau du point focal, il faut considérer la nature ondulatoire électromagnétique de celle-ci. Dès 1965 [63], une description très complète d'une onde cohérente monochromatique dans la région du point focal a été réalisée. Plus récemment [64] un modèle théorique de l'effet de l'objectif sur les mesures de polarisation a été développé. Les hypothèses sur lesquelles s'appuient ce modèle sont les suivantes :

- la surface d'onde issue du Laser est uniphase et gaussienne.
- Le système de focalisation est aplanétique.
- La surface de l'échantillon est perpendiculaire à l'axe de révolution du faisceau Laser focalisé et au système employé pour la focalisation.
- L'échantillon est homogène et isotrope.
- Le point de focalisation est situé dans l'échantillon à une faible distance de la surface.

Afin d'évaluer l'effet de l'objectif de microscope sur les mesures de polarisation, les taux de dépolarisation de bandes Raman caractéristiques (CCl₄) ont été mesurées en microspectrométrie en utilisant des objectifs d'ouverture numérique différente. Les valeurs obtenues sont comparées à celles calculées à partir du modèle théorique précédemment défini qui tient compte de l'ouverture de l'objectif et de l'indice de réfraction de l'échantillon.

Les taux de dépolarisation expérimentaux obtenus à partir des intensités intégrées des bandes de diffusion, après correction de l'intensité réfléchie par la lame semi-transparente, concordent avec les valeurs théoriques. On peut donc à priori, sans commettre une erreur trop importante sur la valeur du taux de dépolarisation, négliger l'effet induit par l'objectif de microscope tant que l'ouverture numérique ne dépasse pas 0,7 environ. Au-delà les corrections restent cependant faibles.

D) Vérification de la loi de Perrin [65,66]

Nous venons de montrer qu'il est tout à fait envisageable de réaliser des mesures de polarisation à partir de microsondes. Toutefois, pour obtenir des mesures correctes, si les corrections dues à l'utilisation d'objectifs à grande ouverture peuvent être négligées, il est impératif de tenir compte des perturbations induites par la lame semi-transparente. Nous avons vu que pour tenir compte de ces effets néfastes, il est plus commode d'utiliser le facteur de correction R et donc de moduler la polarisation de la radiation excitatrice et de travailler avec une direction d'analyse fixe. Le montage expérimental présenté sur la figure II-25 permet de satisfaire à ces conditions d'analyse.

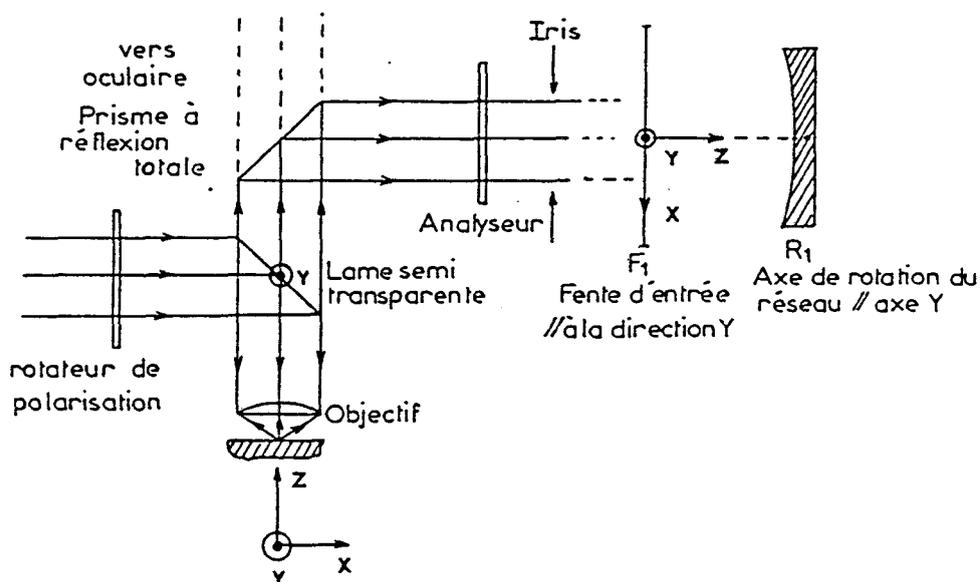


Figure II-25 : Montage expérimental utilisé pour les mesures de polarisation à partir d'un microspectrofluorimètre.

De manière à confirmer l'aptitude d'un tel système pour la mesure de la polarisation de fluorescence, nous avons étudié l'émission de fluorescence issue de solutions de fluoresceine 10^{-8} M de viscosité variable (mélange eau-glycérol). Les spectres ont été enregistrés à une température de 20°C et en présence d'oxygène atmosphérique. La longueur d'onde d'excitation utilisée est la radiation à 488 nm du Laser à argon ionisé, le facteur de correction R dû à la réflexion du faisceau sur la lame semi-transparente est égal à 3.

La loi de Perrin, définie en annexe, est vérifiée. La polarisation fondamentale $P\varnothing$ est en parfait accord avec la théorie.

$P\varnothing$ expérimental : 0,435 $P\varnothing$ théorique : 0,440

La figure II-26 représente la loi de variation de l'équation de Perrin.

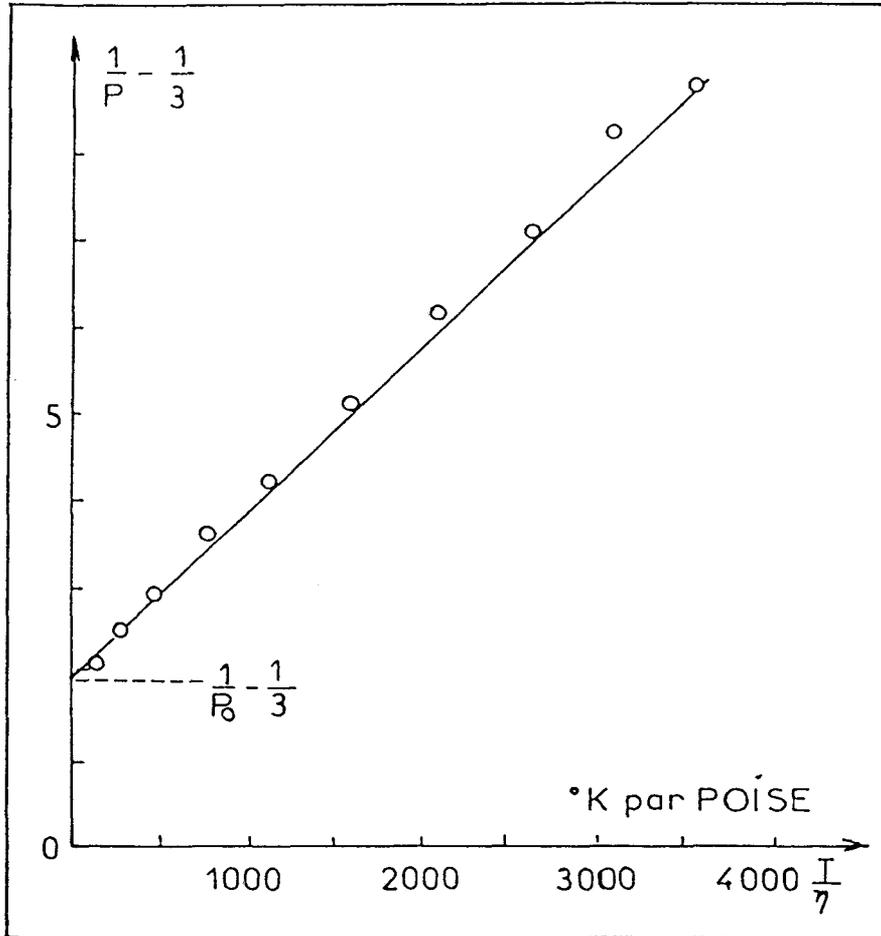


Figure II-26 : Vérification de la loi de Perrin

- CONCLUSIONS DE LA SECONDE PARTIE

A la fin de la première partie de ce travail, nous nous étions proposé de répondre à deux questions essentielles quant à l'aptitude des instruments pour la mesure d'émission de fluorescence :

- Savoir si l'irradiation de l'échantillon par un faisceau Laser n'altérerait pas les phénomènes d'émission de fluorescence.
- Vérifier que la configuration des instruments, notamment au niveau de la géométrie "excitation collection" ne modifiait en rien les résultats obtenus.

Pour répondre à la première de ces questions, nous avons été amenés à faire une comparaison entre les techniques d'excitation par arc (mercure ou xénon) et l'excitation Laser. Cette comparaison étant basée sur l'estimation du nombre de photons absorbés par molécule et par seconde dans le volume analysé, il nous a fallu dans un premier temps définir ce volume.

Dans le cas de l'excitation Laser, à partir des dimensions de la tache de focalisation (waist) et de la profondeur de champ des instruments, on peut définir une "zone de détectibilité" correspondant au volume effectivement pris en compte par le système de détection pour la mesure de l'émission de fluorescence. Cette "zone de détectibilité" assimilée à un cylindre correspond à un volume analysé d'une dizaine de micromètres cube. Ce volume est tout à fait compatible avec les études d'émission de fluorescence au niveau de la cellule unique.

Toutefois, toute l'énergie lumineuse du faisceau Laser pouvant être concentrée dans la "zone de détectibilité" conduit à une irradiance extrêmement élevée de l'échantillon comparée aux techniques conventionnelles d'excitation. Cette forte densité photonique obtenue au niveau de la zone irradiée entraîne une exhaltation des phénomènes de photoblanchiment. Pour pallier à cet inconvénient la puissance du faisceau Laser au niveau de l'échantillon ne doit pas excéder quelques dizaines de microwatts.

A partir du moment où l'on maîtrise la puissance d'excitation, on montre que l'irradiation par faisceau Laser n'altère en rien les phénomènes d'émission de fluorescence. L'influence sur l'émission de fluorescence de paramètres physico chimique tels le pH où la présence d'inhibiteurs de fluorescence peut être suivie à partir de solutions très diluées de fluorophore. La loi de linéarité entre l'intensité d'émission et la concentration de la solution de fluorophore est respectée jusqu'à des concentrations voisines de 10^{-8} M pour la fluoresceine (milieu HEPES pH 7,2). (Puissance 1 μ W).

La présence d'une lame semi-réfléchissante sur les trajets d'excitation et de collection, ainsi que l'utilisation d'objectifs de microscope à grande ouverture numérique sont à l'origine de la seconde question que nous nous étions posée. En effet désirant tirer profit des avantages de la microspectrofluorimétrie pour des investigations en polarisation de fluorescence, ces deux éléments optiques étaient susceptibles d'interférer sur les résultats obtenus.

Une étude de l'influence de ces divers éléments sur les caractéristiques de focalisation du faisceau Laser a montré qu'il était tout à fait possible, moyennant l'introduction d'un facteur de correction du à la lame semi-réfléchissante, d'envisager des études de polarisation de fluorescence à partir des appareils développés. La valeur obtenue pour la polarisation fondamentale de la molécule de fluoresceine est en accord avec les données bibliographiques.

Au terme de cette seconde partie, on peut donc affirmer que la microspectrofluorimétrie Laser est un outil remarquable pour la mesure d'émission de fluorescence à bas niveau à partir d'échantillons de taille microscopique. La forte densité photonique du faisceau Laser, bien que devant être limitée permet d'atteindre un excellent seuil de sensibilité, seuil qui s'adapte parfaitement à l'étude de milieux très peu concentrés tels que les milieux biologiques. C'est l'application de cette nouvelle méthodologie d'analyse dans des domaines aussi variés que la pharmacologie et la gemmologie que nous nous proposons de présenter dans la suite de ce travail.

TROISIEME PARTIE

- <u>INTRODUCTION</u>	159
- <u>CHAPITRE I : APPLICATION DE LA MICROSPECTROFLUORIMETRIE LASER A L'ETUDE DE LA DAUNORUBICINE</u>	161
I-1 : Influence du pH de la solution sur l'émission de la fluorescence de la daunorubicine.....	162
I-2 : Rendement quantique de la daunorubicine en fonction du pH, Méthode de Parker et Rees.....	164
I-3 : Application de la polarisation de fluorescence à l'étude de l'interaction de la daunorubicine avec l'ADN.....	168
- Discussion et perspectives.....	171
- <u>CHAPITRE II : MESURES TEMPORELLES DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE : CINETIQUE DE REACTIONS ENZYMATIQUES AU NIVEAU CELLULAIRE</u>	173
II-1 : Application en biologie.....	173
II-2 : Cinétique d'hydrolyse enzymatique d'esters de fluoresceine à l'intérieur de fibroblastes.....	174
II-3 : Protocole expérimental.....	175
II-4 : Résultats et mesures.....	177
II-5 : Cinétique d'hydrolyse.....	179
- Discussion et perspectives.....	183
- <u>CHAPITRE III : ETUDE DE MATERIAU DOPE : LE RUBIS</u>	185
III-1 : Protocole expérimental.....	187
III-2 : Emission de fluorescence du rubis.....	189
III-3 : Evolution du spectre d'émission du rubis avec la concentration en chromophore.....	192
- Discussion et perspectives.....	195
- <u>CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE</u>	197

- INTRODUCTION

Dans le cadre de cette partie, nous présentons quelques applications de la microspectrofluorimétrie à excitation laser et détection multicanale.

Ces applications ne peuvent pas être considérées comme des thèmes d'étude en eux-mêmes, elles ont pour objectif de rendre compte des performances de cette méthodologie d'analyse.

Les divers domaines d'investigations envisagés ont trait à :

- L'étude préliminaire de quelques propriétés d'émission de fluorescence d'une drogue antitumorale utilisée dans des traitements de chimiothérapie.*
- L'étude cinétique de réactions enzymatiques au niveau cellulaire.*
- L'étude de matériaux dopés.*

Ces orientations d'études ont été choisies de manière à présenter des exemples représentatifs des diverses qualités de la microspectrofluorimétrie à excitation laser et détection multicanale à savoir la sensibilité, l'excellente résolution spatiale et la résolution temporelle.

Nous tirons partie de certaines particularités des instruments développés à savoir, études de fluorescence à bandes larges ou fines et mesure de polarisation de fluorescence.

- CHAPITRE I : APPLICATION DE LA MICROSPECTROFLUORIMETRIE LASER
A L'ETUDE DE LA DAUNORUBICINE

La daunorubicine est une substance antitumorale très active sur un certain nombre de tumeurs expérimentales [67], elle est, depuis plusieurs années, utilisée en chimiothérapie des cancers [68]. Sa structure chimique, constituée d'un hétérocycle anthracycline (daunomycinone) lié par une liaison glycosidique à un sucre aminé (daunosamine), est représentée sur la figure III-1.

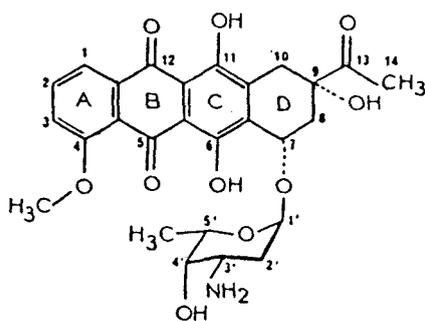


Figure III-1 : Structure moléculaire de la daunorubicine

Si la chimiothérapie constitue une approche essentielle dans le traitement des cancers, un problème majeur réside dans le fait que les substances antitumorales employées, en détruisant les cellules tumorales, affectent souvent les cellules normales.

Ceci explique que le ciblage de médicaments dont le but est d'obtenir la réponse pharmacologique ou biologique désirée sur un site choisi sans altération des autres sites par le médicament, suscite actuellement beaucoup d'intérêt.

C'est dans le cadre d'une étude de ciblage de drogues antitumorales (daunorubicine et dérivés) par glycosilation [69] que nous avons été amenés à tirer profit de la microspectrofluorimétrie.

Ce ciblage consiste à greffer sur des médicaments des structures glucidiques susceptibles d'être spécifiquement reconnues par les récepteurs membranaires des cellules-cibles et de servir de transporteurs pour les drogues considérées.

La daunorubicine, qui a la propriété d'être fluorescente, peut être excitée à son maximum d'absorption par la radiation bleue d'un Laser à argon (λ : 488 nm). Cette particularité permet donc d'utiliser la microspectrofluorimétrie Laser pour "suivre" la molécule de daunorubicine, que ce soit pour le contrôle des produits de couplage médicament-transporteur synthétisés, ou pour l'étude des interactions entre le médicament libre ou couplé avec des cellules.

Toutefois, avant d'envisager des investigations au niveau cellulaire, il nous a semblé nécessaire de commencer par étudier quelques propriétés d'émission de fluorescence de la molécule de daunorubicine en solution.

I-1 : Influence du pH de la solution sur l'émission de fluorescence de la daunorubicine.

Nous avons déjà eu l'occasion, pour la molécule de fluoresceine (partie II, chap. II-2) de discuter de l'influence du pH sur l'émission de fluorescence et de mettre ainsi en évidence l'intérêt qu'il faut attacher à ce paramètre pour pouvoir envisager des mesures quantitatives ou qualitatives. C'est pourquoi, nous avons jugé opportun de nous intéresser à l'influence de ce paramètre sur l'émission de fluorescence de la daunorubicine.

Les figures III-2 et III-3 représentent respectivement les spectres d'absorption et d'émission d'une solution $2 \cdot 10^{-5}$ M de daunorubicine dans divers tampons (pH 3 à 10).

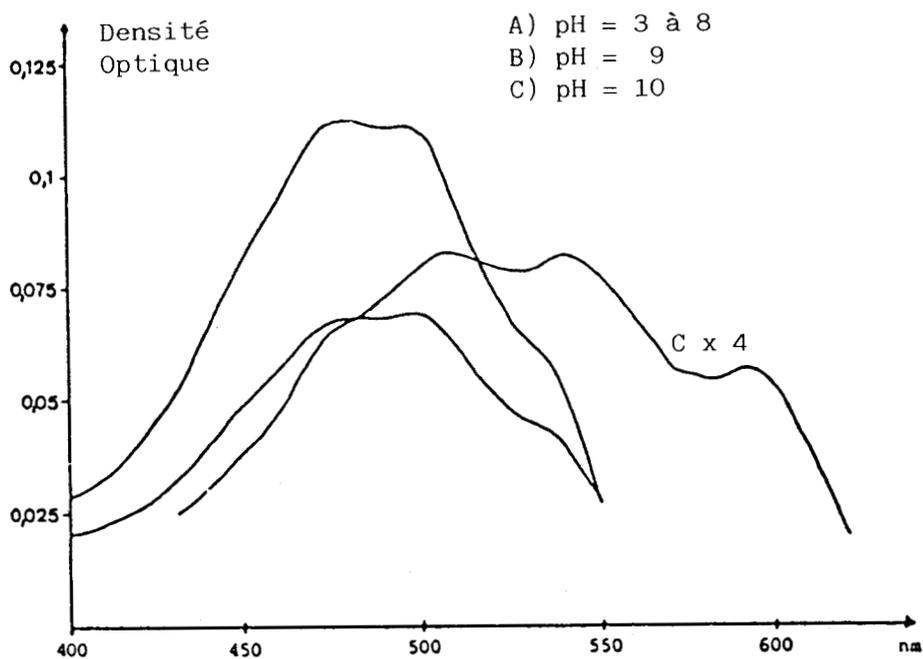


Figure III-2 : Spectres d'absorption de la daunorubicine en fonction du pH de la solution ($2 \cdot 10^{-5}$ M)

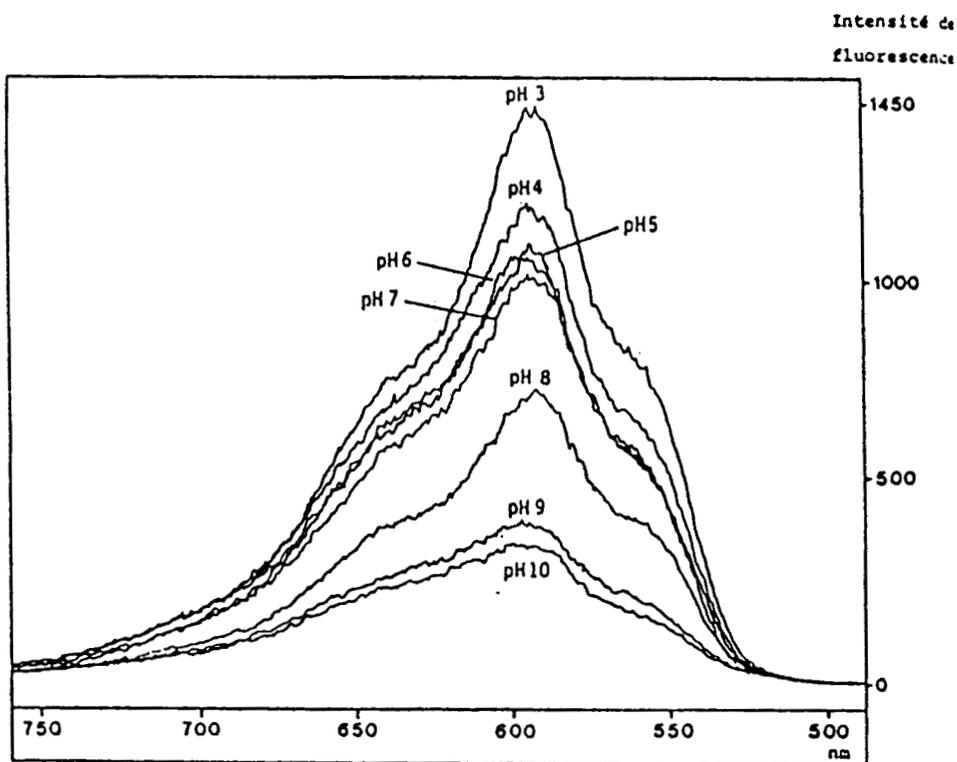


Figure III-3 : Spectres d'émission de la daunorubicine en fonction du pH de la solution ($2 \cdot 10^{-5}$ M)

Les spectres d'absorption enregistrés à partir d'un spectrophotomètre Cary ne sont pas modifiés pour un pH compris entre 3 et 8, par contre à pH plus élevé, l'absorption de la molécule de daunorubicine est dans un premier temps, fortement diminuée (effet hypochrome) puis déplacée vers les grandes longueurs d'onde (effet bathochrome). Toutefois, quelque soit le pH, la radiation à 488 nm d'un Laser à argon ionisé permet d'exciter l'émission de fluorescence de la molécule.

Les spectres d'émission de fluorescence confirment les observations faites au niveau des spectres d'absorption. Alors que l'émission de la drogue reste constante pour un pH compris entre 4 et 7 celle-ci décroît rapidement pour des pH plus élevés. Un déplacement spectral vers les grandes longueurs d'onde est observé pour les spectres d'émission obtenus en milieu basique (pH > 9).

La déprotonation des groupements phénoliques de la daunorubicine serait à l'origine des modifications observées au niveau des spectres d'absorption et d'émission de la drogue en milieu fortement basique.

Ces observations, quant à l'influence du pH sur l'émission de fluorescence de la daunorubicine, permettent de mettre en évidence la stabilité de la drogue en milieu neutre, propriété particulièrement intéressante pour pouvoir envisager des applications au niveau cellulaire. Elles montrent également que toute investigation au niveau quantitatif ou qualitatif, nécessitera la connaissance du milieu environnant la sonde, ceci de manière à pouvoir se référer à un spectre ou une gamme étalon pour une exploitation correcte des résultats.

L'évolution de l'intensité d'émission avec le pH de la solution, suggère une modification du rendement quantique de fluorescence de la daunorubicine. A partir des résultats précédemment obtenus (fig. III-2 et III-3) une estimation de ce rendement a pu être faite en fonction du pH.

I-2 : Rendement quantique de la daunorubicine en fonction du pH

Méthode de Parker et Rees [22].

Nous savons (cf annexe) que dans le cas de solutions diluées, l'intensité de l'émission de fluorescence peut s'exprimer par la relation :

$$I_f = \% \text{ Abs} * I_0 * Q * f_x$$

avec :

I_f : Intensité de l'émission de fluorescence à λ donnée

$\% \text{ Abs}$: Pourcentage d'absorption de la solution à λ donnée

I_0 : Intensité de la radiation excitatrice à λ donnée

Q : Rendement quantique d'émission de fluorescence

f_x : Fonction d'appareillage.

Soit deux fluorophores, un dont le rendement quantique d'émission de fluorescence (Q_{ref}) est connu et un dont le rendement (Q_X) est à déterminer. On peut écrire pour les solutions issues de ces fluorophores :

$$I_f(ref) = \% \text{ Abs}(ref) * I_0(ref) * Q(ref) * f_x(ref)$$

$$I_f(X) = \% \text{ Abs}(X) * I_0(X) * Q(X) * f_x(X)$$

A partir de ces équations, Parker et Rees, ont établi une méthode relative permettant de déterminer le rendement quantique d'émission de fluorescence du fluorophore (X). Cette méthode implique :

- De trouver une solution fluorescente de référence qui absorbe dans le même domaine spectral que la solution à étudier.
- Qu'à la longueur d'onde sélectionnée pour l'excitation de l'émission de fluorescence des deux solutions, celles-ci aient la même densité optique.
- Que les mesures de l'émission de fluorescence soient effectuées sur le même appareil et avec des conditions opératoires aussi proches que possible (intensité d'irradiation, volume analysé, température etc...).

Dans ces conditions, le rendement quantique d'émission du fluorophore (X) est directement obtenu à partir du rapport des intensités d'émission de fluorescence des deux solutions (X et ref) et s'exprime par la relation :

$$Q(X) = Q(ref) * I_f(ref) / I_f(X)$$

Le rendement quantique d'émission de fluorescence d'une solution tamponnée (pH 6) de daunorubicine ($2 \cdot 10^{-5}$ M) a été déterminé à partir de celui de la fluoresceine (0,65 à pH 7) (1). Ces deux fluorophores pouvant être excités par la radiation 488 nm d'un Laser à argon ionisé, répondent aux critères nécessaires pour l'application de la méthode de Parker et Rees.

Ainsi, la valeur retenue pour le rendement quantique de la daunorubicine à pH 6 est de 0,023.

Dans la gamme de pH (3 à 8) où la densité optique à 488 nm des solutions de daunorubicine est pratiquement constante, il est possible, à partir du rendement quantique à pH 6, d'évaluer ce rendement pour d'autres pH :

$$Q(\text{pHx}) = Q(\text{pH6}) * \frac{I_f(\text{pHx})}{I_f(\text{pH6})} * \frac{A\%(\text{pH6})}{A\%(\text{pHx})}$$

Le tableau III-1 résume l'ensemble des valeurs de rendements quantiques obtenus pour la daunorubicine à divers pH. Le rendement quantique de la daunorubicine pour un pH compris entre 4 et 7 est pratiquement constant et égal à 0,023, soit environ quarante cinq fois plus faible que celui de la fluoresceine en milieu basique (0,95 à pH 12).

pH	3	4	5	6	7	8	9	10
Emission de fluorescence :	1450	1200	1120	1080	1060	743	400	344
Densité optique :	0,108	0,222	0,115	0,111	0,111	0,105	0,066	0,021
Rendement quantique de fluorescence :	0,032	0,025	0,023	0,023	0,022	0,017	---	---

Tableau III-1 : Rendement quantique de la daunorubicine avec le pH

L'émission de fluorescence étant directement proportionnelle au rendement quantique, on peut donc prévoir pour la molécule de daunorubicine un seuil de détection pratiquement cinquante fois inférieur à celui de la fluoresceine dans les mêmes conditions opératoires.

L'étude de l'émission de fluorescence de solutions de daunorubicine de concentrations variables (pH 7) a permis d'évaluer expérimentalement ce seuil de détection. La concentration minimale qui, dans des conditions adéquates (temps d'intégrations courts, puissances faibles) permet de détecter la présence de daunorubicine dans une solution, est voisine de 10^{-6} M. Pour cette concentration (10^{-6} M), en considérant un volume analysé d'une centaine de micromètres cube, la masse de daunorubicine détectée est proche de 10^{-16} g.

En deçà de cette concentration, le spectre Raman de l'eau, la fluorescence intrinsèque du support utilisé et le fond de lumière parasite propre à l'instrument deviennent des facteurs limitatifs.

Ces observations quant à l'émission de fluorescence de la daunorubicine ont permis de développer un protocole expérimental pour l'étude du mode d'action des produits de couplage daunorubicine-glycoconjugués au niveau cellulaire.

Des résultats très intéressants ont été obtenus par F. Delplace Delhaye [69] à partir d'hépatocytes de rat et de cellules d'hépatome humain (Hep G2). Ces résultats montrent que, dans ces cellules, la daunorubicine semble s'accumuler préférentiellement dans le noyau. L'incorporation de la daunorubicine par les cellules d'hépatome semble s'effectuer selon un processus de diffusion passive dépendant de sa concentration dans le milieu d'incubation.

Dans certains cas, après incubation, les cellules peuvent être traitées par un mélange HCl 0,3 N-éthanol 50%. Un tel mélange permet d'augmenter le rendement quantique de fluorescence de la daunorubicine et donc d'améliorer les possibilités de détection. L'étude de l'émission de fluorescence de solutions de daunorubicine dans un tel mélange montre que l'émission d'une solution 10^{-7} M devient détectable. Cette amélioration de la sensibilité est très intéressante pour l'étude de milieux cellulaires pour lesquels la fluorescence intrinsèque aux cellules et les contraintes liées à l'analyse d'un matériau très fragile imposent de sérieuses limitations.

I-3 : Application de la polarisation de fluorescence à l'étude de l'interaction de la daunorubicine avec l'ADN.

La polarisation de fluorescence peut fournir des renseignements quant à la nature des liaisons moléculaires (cf annexe). Nous avons donc pensé bénéficier de la fluorescence intrinsèque de la daunorubicine pour étudier son interaction avec la molécule d'ADN.

Les interactions d'une "drogue" avec la molécule d'ADN peuvent se traduire selon deux processus essentiels [70] :

- Par intercalation de la drogue avec les paires de bases successives de l'ADN.
- Par liaisons électrostatiques ou hydrophobiques des groupements cationiques de la drogue avec les groupements phosphate anioniques à l'extérieur de l'hélice d'ADN.

Dans certains cas les deux processus d'interactions peuvent intervenir simultanément.

Nous avons précédemment eu l'occasion de discuter de l'influence de la viscosité sur les mesures de polarisation de fluorescence. A cet effet, nous avons mis en évidence la variation du taux de dépolarisation de la molécule de fluoresceine en fonction de la viscosité de la solution étudiée. De la même façon que le taux de dépolarisation de la fluoresceine est modifié selon le degré de mobilité de la molécule, on peut supposer une modification du taux de dépolarisation de la daunorubicine lorsque la molécule est en interaction avec l'ADN.

La microspectrofluorimétrie Laser, permettant l'étude de la polarisation de fluorescence au niveau de la cellule unique, laisse donc entrevoir la possibilité d'étudier le mode d'interaction de la daunorubicine (libre ou couplée) avec l'ADN au niveau cellulaire. Avant d'entreprendre de telles investigations nous avons tenu toutefois à vérifier que le taux de dépolarisation de la daunorubicine est bien modifié lors de son interaction avec l'ADN en solution.

Une première série de mesures, basée sur les conditions établies par TW. Plunbridge et R. Brown [71] a consisté à suivre l'évolution du taux de dépolarisation d'une solution de daunorubicine de concentration donnée en fonction de la concentration en ADN.

Les mesures sont effectuées à partir d'une solution $2,5 \cdot 10^{-6} M$ de daunorubicine (tampon TRIS 0,008 M/HCl, 0,05 NaCl pH7) dans laquelle sont ajoutées des petites quantités d'ADN de thymus de veau de manière à faire varier le rapport (r) du nombre de nucléotides sur le nombre de mole de drogue.

Les quantités d'ADN ajoutées sont telles que le rapport (r) passe successivement de 100 à 10000, la concentration en ADN dans la solution varie alors de 0,07 à 7 mg/ml.

Le taux de dépolarisation est déterminé à partir des valeurs des intensités d'émission de fluorescence $I_{//}$ et I_{\perp} selon la méthode précédemment décrite (chap. II-4-C seconde partie).

Le taux de dépolarisation obtenu pour la solution de daunorubicine seule est très faible ($< 0,1$). On observe une augmentation de ce taux de dépolarisation lorsque le rapport (r) croît. Le spectre d'émission de la daunorubicine est toutefois décalé vers les grandes longueurs d'onde lorsque la concentration en ADN augmente. [72,73].

Pour tenter de limiter la contribution de l'ADN au spectre d'émission de fluorescence, nous avons effectué une seconde série de manipulations qui a consisté à utiliser une concentration faible en ADN (1mg/ml) et à faire varier la concentration en daunorubicine pour modifier le rapport r du nombre de nucléotides sur le nombre de moles de daunorubicine. La concentration en daunorubicine est égale à 0,76 $\mu\text{g/ml}$ pour $r = 2500$ et 76 $\mu\text{g/ml}$ pour $r = 25$.

Les tableaux III-1 et III-2 résument les résultats obtenus à partir des deux manipulations précédemment énoncées.

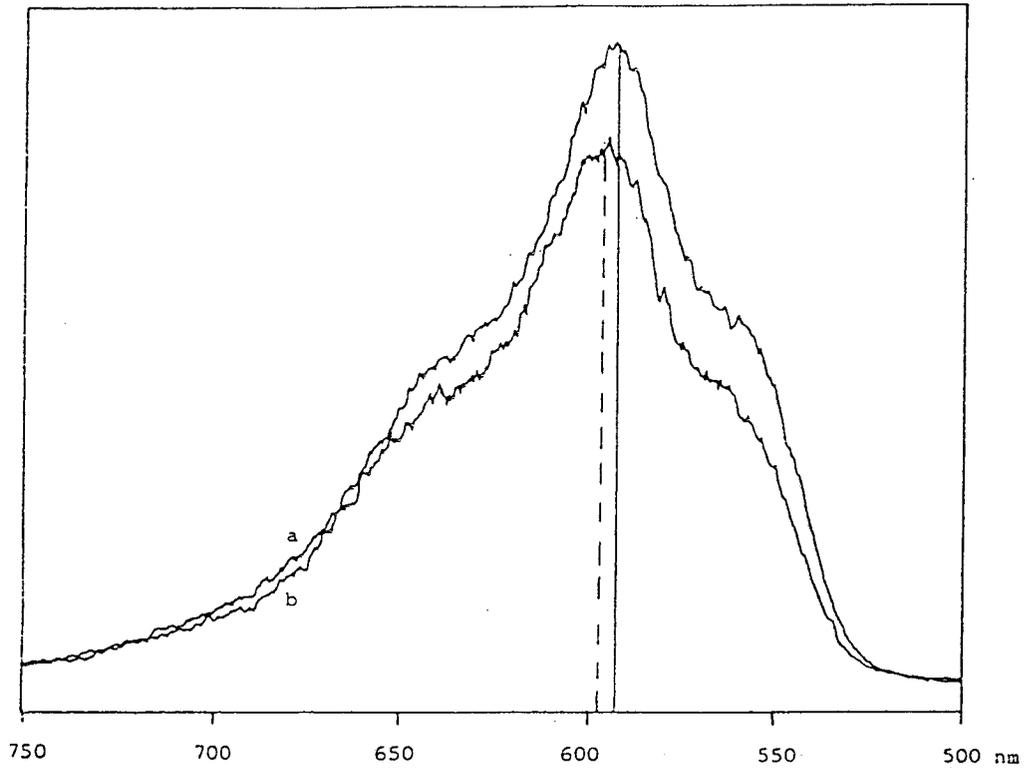


Figure III-4 : Spectres d'émission de fluorescence de la daunorubicine libre (1) ou liée (2) à l'ADN
 λ_{exc} : 488 nm ; $P = 50 \mu W$;
 Obj. : 50 ULWD ; rapport $r = 50$.

r	:	:	:	:	:	:	:
	:	100	:	500	:	2500	:
	:	:	:	:	:	5000	:
	:	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	10000	:
	:	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:	:
p	:	:	:	:	:	:	:
	:	0,186	:	0,229	:	0,228	:
	:	:	:	:	:	0,237	:
	:	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	0,254	:
	:	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:	0,096

Tableau III-1 : Concentration en daunorubicine constante ($2,5 \cdot 10^{-6} M$)

Tableau III-2 : Concentration en ADN constante (1 mg/ml).

<i>r</i>	:	25	:	50	:	100	:	250	:	100	:	2500	:
<i>p</i>	:	0,157	:	0,173	:	0,175	:	0,178	:	0,216	:	0,224	:

Tableau III-1 et III-2 : Variation du taux de dépolarisation (*p*) de la daunorubicine lors de son interaction avec l'ADN.

Ces résultats sont en accord avec une modification du taux de dépolarisation de la fluorescence émise par la molécule de daunorubicine lors de son interaction avec la molécule d'ADN.

En effet, on constate que si le taux de dépolarisation obtenu pour la solution de daunorubicine seule est faible ($< 0,1$) une augmentation considérable de celui-ci est observée lors de l'interaction de la molécule avec l'ADN ($\approx 0,220$ pour $r = 2500$).

Toutefois les modifications observées dans le spectre d'émission de fluorescence (déplacement vers les grandes longueurs d'onde) nous amènent à considérer ces résultats avec beaucoup de prudence. En effet, la variation du taux de dépolarisation pourrait être liée à une modification du cortège électronique de la molécule de daunorubicine, influençant ainsi ses propriétés d'émission de fluorescence. Des mesures complémentaires de durée de vie, d'évaluation de rendement quantique etc... s'avère donc nécessaire avant de pouvoir exploiter de tels résultats notamment au niveau de la cellule unique.

I-4 : Discussions et perspectives

Nous avons présenté dans le cadre de ce chapitre quelques caractéristiques de l'émission de fluorescence d'une drogue antitumorale, la daunorubicine, utilisée pour le traitement des cancers.

Ces investigations, menées dans un premier temps, en solution, mettent en évidence l'aptitude de la microspectrofluorimétrie laser, pour l'analyse de la daunorubicine, même à très faible concentration à partir d'un volume analysé de

l'ordre de quelques micromètres cube. On peut penser que, bientôt, les résultats de ces analyses préliminaires pourront être transposés au niveau de la cellule unique.

Les informations données par les mesures de polarisation de fluorescence, feront alors de la microspectrofluorimétrie à excitation laser et détection multicanale une méthode d'investigation remarquable pour non seulement suivre le devenir de la drogue à l'intérieur de la cellule mais également pour comprendre les mécanismes d'interactions de cette drogue avec l'ADN notamment.

CHAPITRE II - MESURES TEMPORELLES DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE :
CINETIQUE DE REACTIONS ENZYMATIQUES AU NIVEAU CELLULAIRE

[74,85]

Jusqu'à présent, nous avons utilisé la microspectrofluorimétrie à excitation laser comme un outil remarquable pour obtenir des informations à la fois d'ordre qualitatif et quantitatif. Nous avons montré que la sélectivité et la grande sensibilité de cette méthodologie d'analyse permet de mettre en évidence rapidement à partir de volumes analysés extrêmement faibles, la présence d'un fluorophore donné à très faible concentration. Cette sélectivité et cette rapidité d'analyse peuvent être mises à profit pour effectuer des études temporelles d'émission de fluorescence.

III-1 : Application en biologie :

De plus en plus, en biologie clinique, on utilise les techniques d'émission de fluorescence pour tenter d'élucider certains mécanismes réactionnels ou mettre en évidence certains sites réactionnels au niveau cellulaire. A cet effet, on utilise l'émission de fluorescence induite par des sondes extrinsèques ou intrinsèques au matériau cellulaire. L'évolution temporelle des spectres d'émission de fluorescence de ces sondes représente un atout considérable pour la compréhension des mécanismes à étudier.

Pour suivre efficacement l'évolution temporelle d'une sonde fluorescente, il est intéressant de pouvoir suivre simultanément :

- l'évolution de l'intensité de l'émission de fluorescence pouvant traduire une variation de la concentration ou l'évolution d'un paramètre influençant le rendement quantique d'émission.

- les modifications éventuelles de la forme de la bande d'émission, pouvant caractériser une métabolisation du fluorophore considéré.

Si l'utilisation d'un photomultiplicateur en tant que détecteur permet, en calant le monochromateur d'analyse sur la longueur d'onde du maximum d'émission d'un fluorophore, de suivre la variation de l'intensité d'émission de fluorescence, l'information spectrale est toutefois perdue. Seule l'utilisation d'un détecteur multicanal permet d'obtenir simultanément ces deux types d'informations.

la perspective d'appliquer ces techniques de mesures temporelles d'émission de fluorescence au niveau de la cellule unique nécessite un appareil bénéficiant d'une excellente résolution spatiale et d'une très grande sensibilité.

La microspectrofluorimétrie à excitation laser et détection multicanale semble pouvoir répondre efficacement à ce type d'investigations.

III-2 : Cinétique d'hydrolyse enzymatique d'esters de fluoresceine à l'intérieur de fibroblastes :

L'utilisation d'esters de fluoresceine en tant que sondes fluorescentes est une méthode facile à mettre en oeuvre pour vérifier la viabilité cellulaire.

Si des fibroblastes sont mises au contact d'une solution aqueuse d'acétate de fluoresceine, aucune fluorescence n'est observée dans un premier temps, mais très rapidement, lorsque l'acétate (molécule non polaire) traverse la membrane de la cellule, il se trouve par catalyse enzymatique avec des estérases, transformé en fluoresceine et une émission de fluorescence intracellulaire apparaît. Si la cellule est viable, la fluoresceine (molécule polaire) ne peut pas ressortir de celle-ci et l'émission de fluorescence reste localisée (Photo III-1).

Dans le cas contraire, la cellule relache la fluoresceine et une émission de fluorescence est observée à l'extérieur des cellules.

Pour mettre en évidence la faisabilité de la méthode, nous nous sommes proposés de travailler sur des fibroblastes de Hamster (BHK). Ces cellules proviennent d'une souche qui nous a été fournie par le laboratoire de chimie biologique de l'Université de Lille. Notre étude a porté sur cinq esters de fluoresceine : soit l'acétate (C2), le propionate (C3), le butyrate (C4), le caprylate (C8) et le laurate (C12).

III-3 : Protocole expérimental :

Les fibroblastes adhèrent à une lamelle de microscope immergée dans le milieu de culture. La fluorescence intrinsèque du milieu de culture nécessite un lavage des cellules (NaCl 9 ‰) avant leur mise en contact avec les solutions d'esters de fluoresceine.

Les divers esters sont solubilisés dans l'acétone, la solution finale est préparée par dilution d'une quantité déterminée (qçq µl) de la solution acétonique dans un milieu NaCl 9‰ (pH 7,4). La concentration des différentes solutions est fixée à $2,5 \cdot 10^{-6}$ M.

Pour faciliter les mesures, la lamelle de microscope sur laquelle adhèrent les cellules est mise sur un porte échantillon permettant une fixation correcte de celle-ci et une introduction ou un retrait aisé des diverses solutions de rinçage ou d'esters (figure III-5).

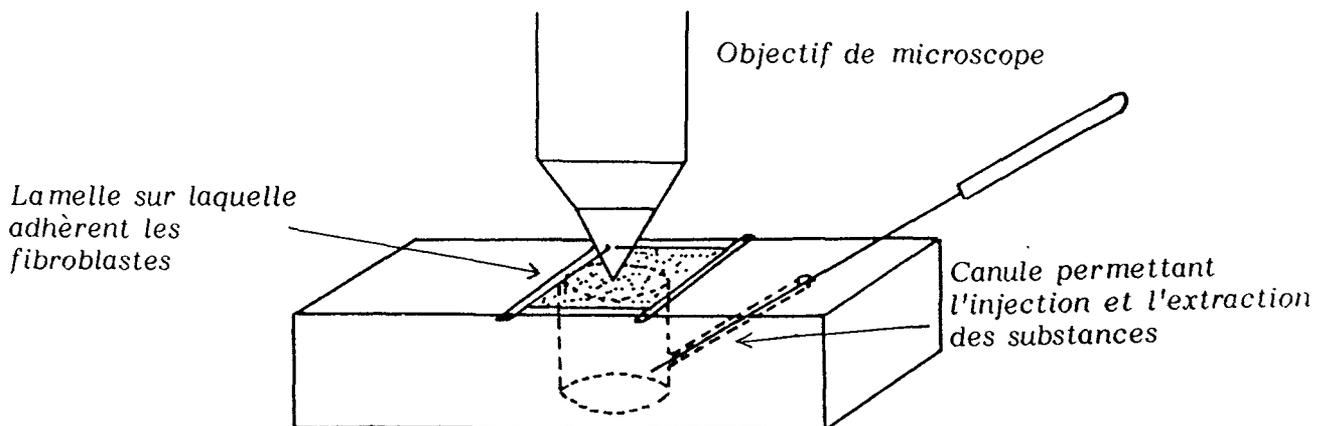


Figure III-5 : Schéma du porte échantillon utilisé.

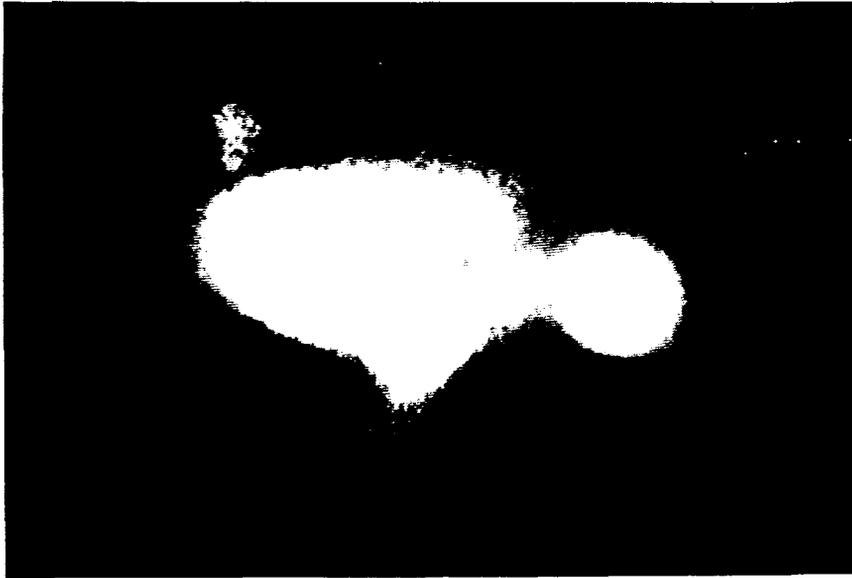


Photo III-1 : Emission de fluorescence issue d'une cellule de fibroblaste (BHK) incubée par l'acétate de fluoresceine.

λ_{ex} : 488 nm P : 1 μ w éclaircissement global de l'échantillon.

A partir de ce modèle purement qualitatif, nous avons pensé utiliser la microfluorimétrie à excitation laser et détection multicanale pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse de divers esters de fluoresceine dans des fibroblastes en culture. En effet, ces cellules qui contiennent des estérases, enzymes qui hydrolysent les esters d'acides gras à chaîne courte, ne contiennent pas, à la différence des cellules pancréatiques de lipases, enzymes qui hydrolysent les esters d'acides gras à longue chaîne. Nous avons donc cherché à mettre en évidence l'influence de la longueur de chaîne des acides gras (C2 à C12) sur l'hydrolyse de ces esters.

Ce type de détermination est généralement effectué "in vitro", après analyse des cellules et séparation éventuelle des divers organites cellulaires (mitochondries, noyaux, etc...). Il nécessite généralement un très grand nombre de cellules et peut amener des artéfacts liés à la destruction de celles-ci. Dans le cadre de ce travail, entrepris en collaboration avec le laboratoire de biochimie de l'Hôpital de Bicêtre (Pr Levillain), notre objectif est de montrer que de telles investigations sont envisageables au niveau de la cellule unique.

Après lavage des cellules, la mise au point du microscope (OBJ 100X) est faite à travers la lamelle de microscope sur le cytoplasme d'une cellule unique puis après retrait de la solution de rinçage, les cellules sont mises au contact de la solution d'ester. On enregistre les spectres d'émission en fonction du temps.

III-4 : Résultats et mesures :

Un paramètre important pour envisager des études temporelles d'émission de fluorescence réside dans la stabilité de l'échantillon au cours du temps. Aussi, la densité de puissance du faisceau laser au niveau de l'échantillon joue ici un rôle primordial, il est en effet impératif d'éviter tout phénomène de photoblanchiment et d'altération de la viabilité cellulaire. Nous avons montré précédemment que dans le cas de solutions, ces phénomènes étaient négligeables pour une puissance n'excédant pas 50 μW au niveau de l'échantillon. Mais on constate qu'au niveau cellulaire cette puissance doit être considérablement diminuée.

Des cellules de fibroblastes sont incubées pendant 15' dans une solution d'acétate de fluoresceine selon le protocole précédemment établi. Avant de procéder à l'enregistrement de l'émission de fluorescence, la solution d'ester est extraite et les cellules sont rincées (NaCl 9 ‰).

La quantité de fluoresceine contenue dans chaque cellule est alors fixée et doit donner lieu, si la cellule ne subit aucune altération, à une intensité d'émission constante. Des puissances croissantes sont alors utilisées pour l'excitation des cellules, on détermine ainsi le seuil de puissance à partir duquel une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence est observée.

On montre que la puissance au niveau de la cellule ne doit pas excéder le μW pour éviter tout phénomène d'altération. Pour des puissances supérieures, on observe une décroissance rapide de l'intensité d'émission de fluorescence, dans certains cas ($P > 10 \mu\text{W}$) une émission de fluorescence peut être détectée à l'extérieur des cellules, ce qui suppose une altération des cellules (test de viabilité) (fig. III- 6).

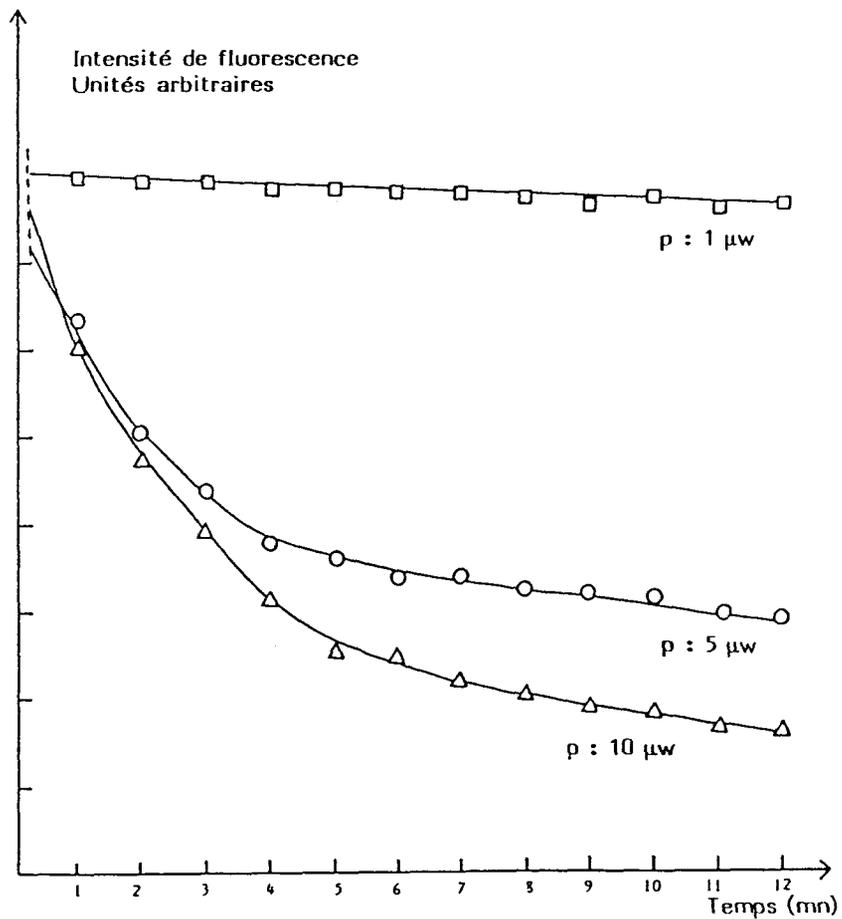


Figure III- 6 : Influence de la puissance d'excitation sur l'émission de fluorescence de cellules de fibroblastes (BHK) incubées (15') par une solution $2 \cdot 10^{-6}$ M d'acétate de fluoresceine. λ_{ex} : 488 nm.

Nous avons signalé précédemment que la fluorescence du milieu de culture des cellules nécessitait un lavage avant de commencer l'étude des cinétiques d'hydrolyse. Il est donc nécessaire de vérifier, qu'après cette opération, aucune fluorescence résiduelle autre que la fluorescence intrinsèque des cellules, ne peut interférer sur les résultats obtenus.

Les spectres de la figure III- 7 A, B et C représentent respectivement les spectres d'émission de fluorescence :

- du milieu de culture
- d'une cellule après rinçage
- d'une cellule incubée (15') dans l'acétate de fluoresceine.

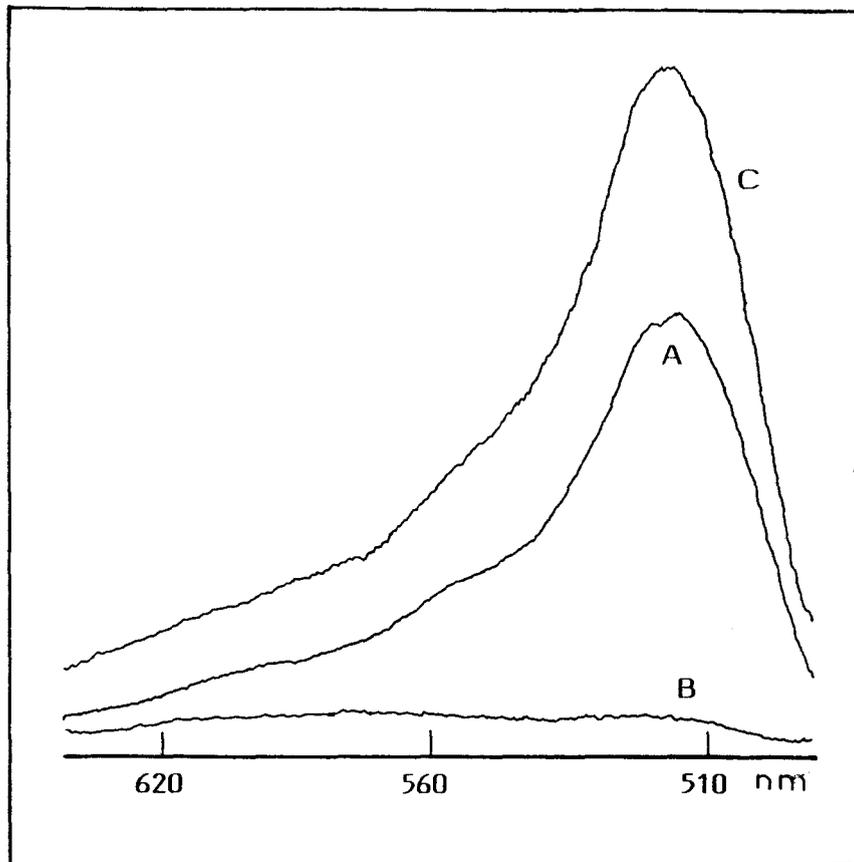


Figure III-7 : Spectres d'émission de fluorescence du milieu de culture (A) d'une cellule après rinçage (B) et d'une cellule incubée par l'acétate de fluoresceine (C).

Puissance d'excitation : $1\mu\text{W}$ exc : 488 nm Durée d'analyse : 1 sec

La similitude des spectres d'émission du milieu de culture et de la fluoresceine intra-cellulaire met en évidence la nécessité du rinçage des cellules.

La fluorescence intrinsèque des cellules sera dans le cadre de cette application considérée comme négligeable, toutefois, le cas échéant, un traitement informatique permet de soustraire cette fluorescence résiduelle du spectre d'émission obtenu après incubation. Cette correction peut être très intéressante si l'on désire mettre en évidence une éventuelle métabolisation du composé étudié (légère modification du spectre d'émission) ou de très faibles quantités de produits à l'intérieur de la cellule.

III-5 : Cinétique d'hydrolyse :

De manière à obtenir des résultats suffisamment représentatifs, nous avons étudié les cinétiques d'hydrolyse des divers esters de fluoresceine sur vingt cellules isolées par ester ce qui a donc nécessité une centaine d'analyse au total.

Les résultats obtenus permettent de classer les différents esters en deux groupes distincts :

- Un premier groupe qui comprend l'acétate, le propionate et le butyrate de fluoresceine pour lesquels on observe une augmentation rapide de l'émission de fluorescence à l'intérieur de la cellule jusqu'à obtention d'un palier.

- Un second groupe qui comprend le caprylate et le laurate de fluoresceine pour lesquels l'émission de fluorescence à l'intérieur de la cellule reste pratiquement nulle.

La figure III-8 représente l'évolution de l'émission de fluorescence de cellules de fibroblastes incubées par le propionate de fluoresceine.

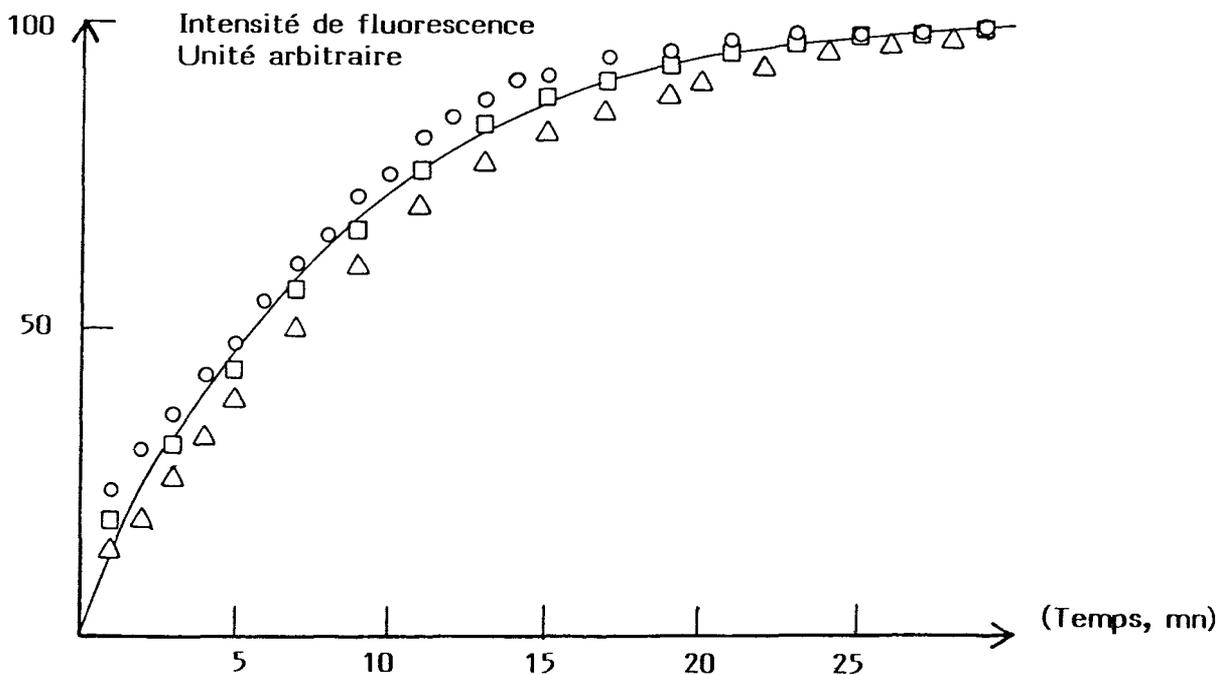


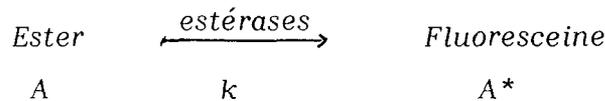
Figure III-8 : Cinétique d'hydrolyse du propionate de fluoresceine à l'intérieur de cellules de fibroblastes (BHK)

Cette évolution est représentative du premier groupe d'esters précédemment défini. Pour les esters du second groupe, la faiblesse de l'émission ne permet pas de bénéficier d'un rapport signal/bruit autorisant une exploitation correcte des résultats.

Nous n'avons fait figurer sur les courbes de la figure III-8 que les résultats obtenus sur quelques cellules. La faible dispersion des points témoigne de la reproductibilité des mesures et rend plausible une exploitation des résultats.

Les résultats de la figure III-8 ont été normalisés (100 % au niveau du palier) il faut toutefois signaler que l'intensité de fluorescence au temps infini est très variable d'une cellule à l'autre, on peut facilement obtenir un facteur 10 entre deux expériences.

Ainsi pour les esters du premier groupe (acétate, propionate et butyrate) il est à priori envisageable de faire une estimation de la constante de vitesse (k) de la réaction d'hydrolyse.



En considérant une loi cinétique d'ordre 1, il est possible d'obtenir l'expression de A*.

$$A^* = A_0 - A = A_0 (1 - e^{-kt})$$

Sachant que l'intensité d'émission de fluorescence est proportionnelle à la concentration, on peut écrire cette équation sous la forme :

$$I_f = IF (1 - e^{-kt}) \text{ ou } \text{Log} \left(\frac{IF - I_f}{IF} \right) = k t$$

avec I_f = intensité de fluorescence au temps t

IF = intensité limite de fluorescence ($t \rightarrow \infty$)

Cette expression permet d'accéder à l'évaluation d'une constante de vitesse (k) de la réaction d'hydrolyse.

Les courbes de la figure III-9 montrent que la constante de vitesse (k), dans le cas des cellules de fibroblastes, est d'autant plus grande que la chaîne carbonée de l'ester à hydrolyser est courte.

Pour chacun des trois esters, nous avons déterminé la valeur de k pour les 20 cellules étudiées puis calculé la moyenne arithmétique, l'écart type et le coefficient de variation (tableau III-3). Ces résultats confirment la bonne reproductibilité des mesures sur l'ensemble des cellules.

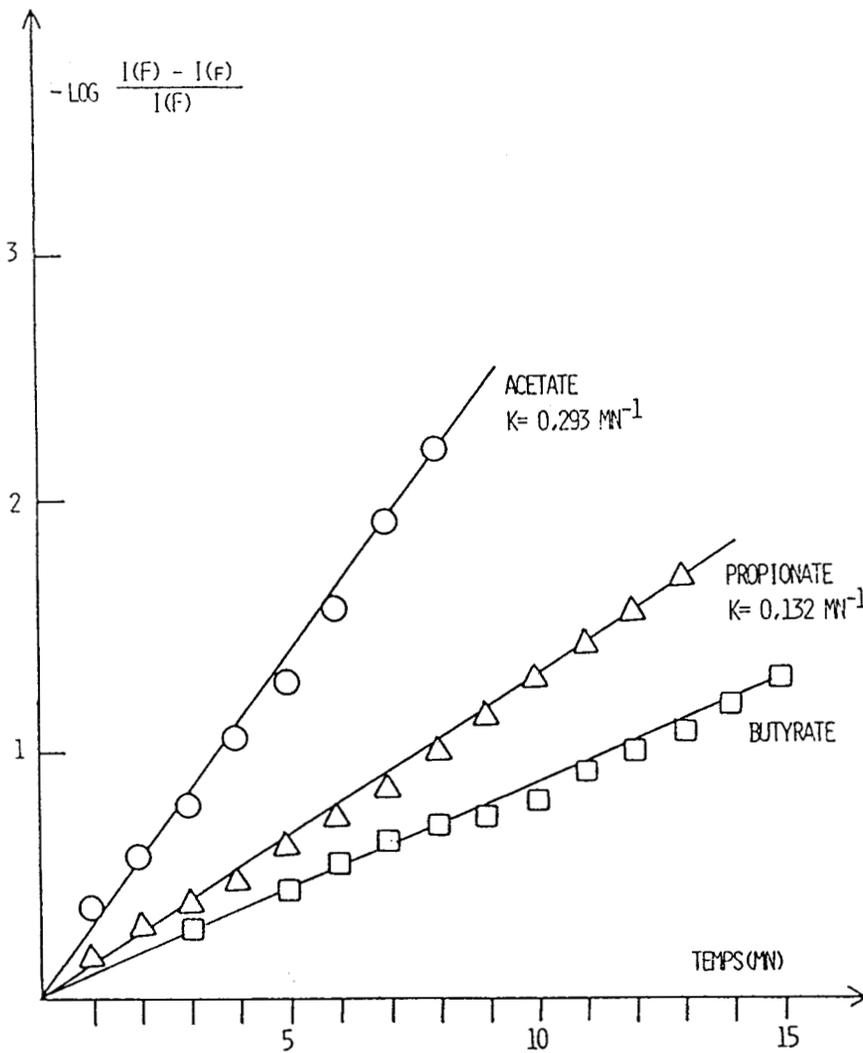


Figure III- 9 : $\text{Log} (IF-I_f)/IF = f (t)$

(A) acétate (B) propionate (C) butyrate de fluoresceine

	\bar{k}	σ^n	σ^{n-1}
Acetate	0,293	0,015	0,017
Propionate	0,132	0,018	0,025
Butyrate	0,092	0,025	0,041

Tableau III-3 : Evaluation de la constante de la cinétique d'hydrolyse k pour l'acétate, le propionate et le butyrate de fluoresceine.

- Discussion et perspectives :

Lors des études de cinétique, une seule cellule par lamelle est étudiée, ce qui nécessite, pour obtenir des résultats représentatifs, l'utilisation d'un nombre important de lamelles. Ceci conduit à une perte considérable et à une consommation importante du matériau cellulaire. L'utilisation d'une platine à micro déplacement autorisant l'étude successive de plusieurs cellules par lamelle permet aujourd'hui de pallier cet inconvénient.

Le temps $t=0$ de l'expérience est mal défini. Toutefois, en raison des propriétés de la courbe obtenue, une incertitude sur le temps $t=0$, c'est-à-dire l'instant où l'intensité de fluorescence devient différente de 0, est sans effet sur la valeur de la constante (k).

Malgré ces quelques difficultés, nous avons montré que moyennant quelques précautions sur la limitation de la puissance d'excitation et l'élimination de la fluorescence parasite, il est tout à fait envisageable de faire des mesures significatives de l'évolution temporelle de l'émission de fluorescence au niveau de la cellule unique. Nous pouvons tout particulièrement insister, à ce stade de l'exposé, sur l'excellente reproductibilité des mesures d'une cellule à l'autre.

Les mesures de cinétique d'hydrolyse d'esters de fluoresceine par des cellules de fibroblastes (BHK) permettent de mettre en évidence une activité enzymatique accrue de ces cellules pour l'hydrolyse des esters à chaînes carbonées courtes. Toutefois, dans les mesures effectuées, deux paramètres liés à la longueur de la chaîne carbonée peuvent en fait s'additionner :

- la vitesse de pénétration des esters à l'intérieur de la cellule qui peut diminuer avec l'encombrement stérique,

- la vitesse de la réaction d'hydrolyse.

Pour confirmer la spécificité des cellules de fibroblastes (oliestérases) quant à l'hydrolyse des esters à courtes chaînes carbonées et lever l'incertitude quant au problème de pénétration des esters à l'intérieur de la cellule, nous envisageons le même type de mesure avec des cellules pancréatiques. Dans ce cas, la présence de lipases devrait montrer une affinité enzymatique favorisant l'hydrolyse des esters à longues chaînes carbonées. L'utilisation de lysosomes sur lesquels serait greffé l'ester permettrait également de lever l'incertitude quant à la contribution de la cinétique de pénétration avec la longueur de la chaîne carbonée.

- CHAPITRE III - ETUDE DE MATERIAUX DOPES : LE RUBIS [86,95]

L'ensemble des applications présentées précédemment concernent principalement le domaine biologique ; les fluorescences observées sont généralement à bandes larges. Nous avons voulu dans ce chapitre, montrer les possibilités de la microspectrofluorimétrie à excitation laser et détection multicanale dans le domaine des fluorescences à bandes fines, telles celles engendrées par les matériaux dopés.

Les niveaux électroniques de ces matériaux ont été tout particulièrement étudiés par spectrométrie d'absorption et d'émission de fluorescence à cause de l'intérêt qu'ils présentent dans le domaine des lasers (lasers à rubis, alexandrites, YAG etc...) et en gemmologie.

Notre objectif étant de montrer la faisabilité de certaines mesures d'émission de fluorescence, nous nous sommes proposés de travailler sur un matériau déjà longuement étudié : le rubis.

Le rubis est du corindon (Al_2O_3) dans lequel du chrome a été incorporé en quantité variable (1 % pour les rubis les plus concentrés). Le corindon cristallise dans le système rhomboédrique, la cellule unité contient deux molécules Al_2O_3 , chaque ion Al^{3+} est entouré d'un "octaèdre distordu" dont les sommets sont les ions O^{2-} (fig. III-10).

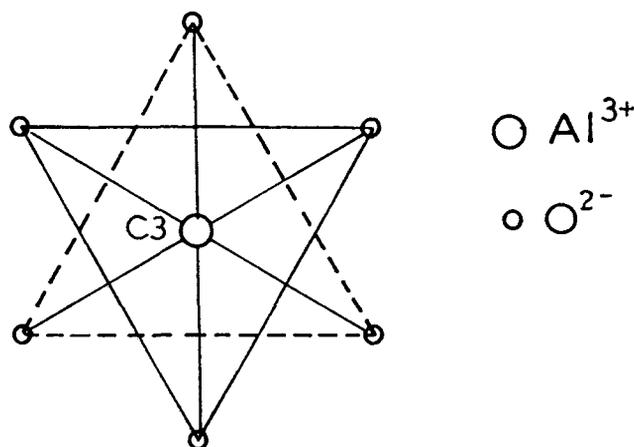


Figure III-10 : position des ions O^{2-} et Al^{3+} dans le corindon.

Nous avons considéré pour la représentation de la figure III-10, le cas où la symétrie du champ serait Oh, toutefois l'ion Al^{3+} n'est pas, en réalité, équidistant des deux plans définis par les ions O^{2-} . De plus les deux triangles formés par les ions O^{2-} sont légèrement décalés ($2,8^\circ$) l'un par rapport à l'autre.

Dans le rubis, les ions Cr^{3+} sont substitués aux ions Al^{3+} . Cette substitution entraîne des distorsions supplémentaires de la maille cristalline du corindon, la symétrie du champ cristallin agissant sur le chrome se trouve donc affaiblie. Aussi pour l'interprétation du diagramme énergétique des ions Cr^{3+} dans Al_2O_3 (figure III-11) l'introduction de la symétrie du champ trigonal (C_3 ou C_{3v}) et du couplage spin orbite s'avère nécessaire. L'axe C_3 est défini comme l'axe joignant les centres des deux triangles composés par les ions O^{2-} et l'ion Cr^{3+} .

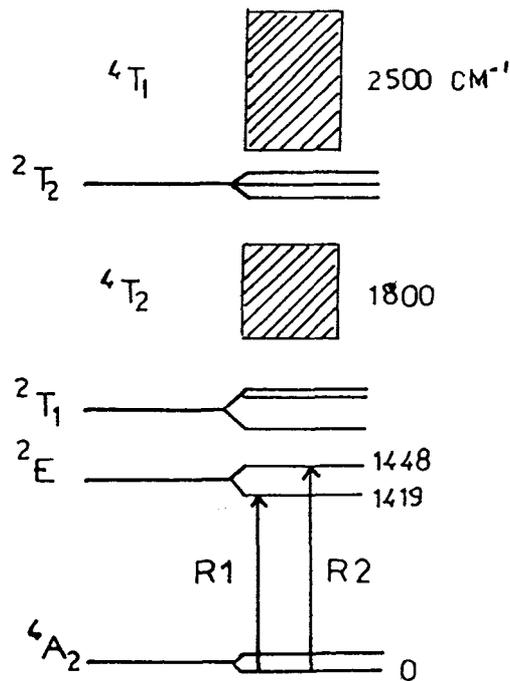


Figure III-11 : Diagramme énergétique de Cr^{3+} dans Al_2O_3 .

Ce sont les ions Cr^{3+} qui sont responsables de la coloration rouge du rubis et qui sont à l'origine d'un spectre de fluorescence tout à fait caractéristique. La dépendance de ce spectre d'émission en fonction de nombreux paramètres physico-chimiques tels que la température, la pression, la concentration en ion Cr, la polarisation etc..., a été très étudiée et a servi de base à notre étude.

Pour montrer les possibilités de la microspectrofluorimétrie à excitation laser, nous nous sommes attachés à étudier quelques rubis synthétiques en fonction de leur concentration en chrome et de l'orientation du vecteur champ électrique de la radiation excitatrice par rapport à l'axe optique de la pierre (axe C_3 précédemment défini).

Les travaux présentés ont été développés en étroite collaboration avec Mme DUBOIS (laboratoire des douanes de Lille) dans un but d'identification de gemmes. Nous résumons ici quelques-uns des résultats obtenus ; une exploitation plus complète de l'étude a fait l'objet d'un mémoire de gemmologie [96].

III-1 : Protocole expérimental

Le spectre d'émission de fluorescence du rubis se présente sous la forme de plusieurs bandes d'émission à structure relativement étroite. Le réseau à 1800 traits/mm dont est équipé le monochromateur du premier prototype de microspectrofluorimètre trouve ici tout son intérêt pour étudier ces structures fines.

L'étude a porté sur une série de six corindons dopés au chrome (synthèse Verneuil). De manière à pouvoir matérialiser avec exactitude la position de l'axe optique de la pierre, les différents échantillons ont été taillés en forme de cube.

Cette géométrie permet également d'améliorer la reproductibilité des mesures lors des divers positionnement du gemme sous l'objectif de microscope.

Chaque cube présente deux faces parallèles appartenant à la face de clivage spontanée du corindon. L'axe optique de la pierre, c'est à dire l'axe C_3 de l'octaèdre déformé est perpendiculaire à ces faces.

L'orientation de la pierre vis-à-vis du vecteur champ électrique du laser (\vec{E}) est définie selon la notation de Porto.* Par convention les diverses orientations seront donc notées selon les coordonnées :

$$Z (X , Y) \overline{X,Y,Z}$$

avec : Z : direction de propagation de l'onde incidente.

X : orientation du vecteur champ électrique de l'onde incidente.

Y : direction d'analyse de l'émission de fluorescence.

$\overline{X,Y,Z}$: orientations de l'axe optique de la pierre.

Seules les coordonnées concernant l'orientation de la pierre ont été modifiées. Les schémas de la figure III-12 représente les différentes configurations d'analyse qui ont été utilisées.

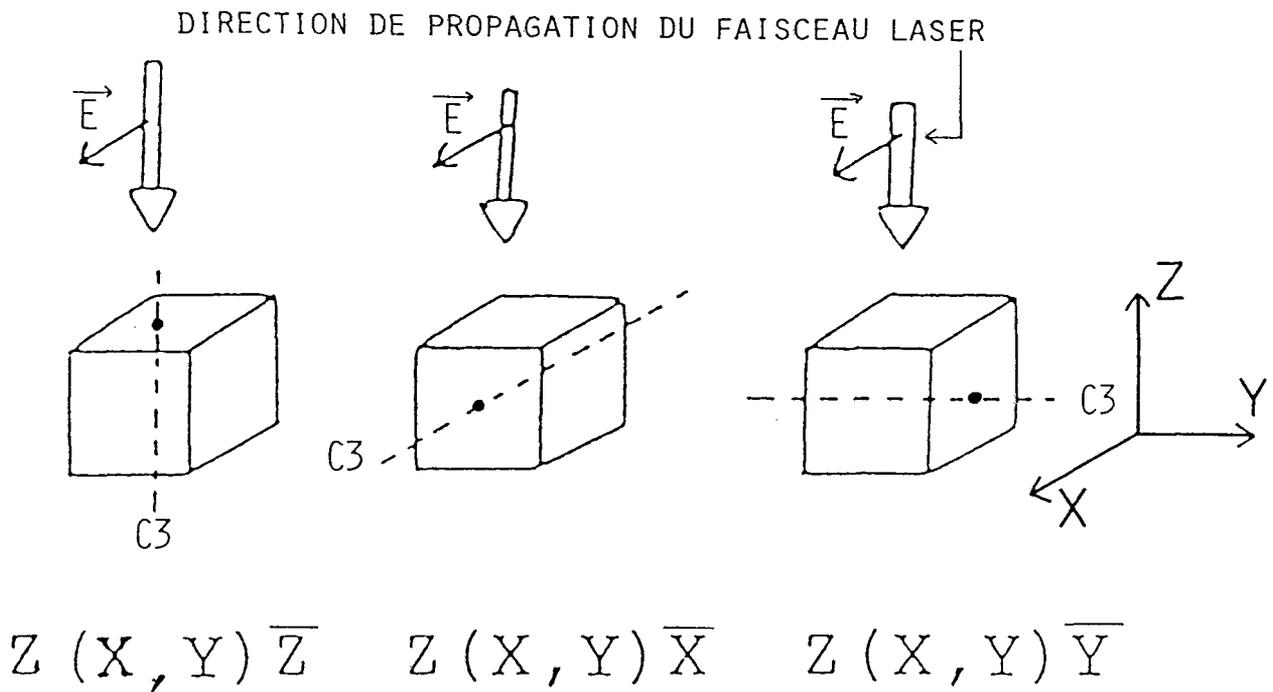


Figure III-12 : Orientations de l'axe optique C_3 vis-à-vis du vecteur champ électrique du laser : Notation de Porto.

* Remarque : la notation de Porto a été adaptée pour ce type de mesure.

Les concentrations en chrome des divers échantillons ont été établies d'après des mesures réalisées à la microsonde électronique.

III-2 : Emission de fluorescence du rubis

Le spectre de fluorescence du rubis, excité par la radiation verte d'un laser argon ionisé (5145 Å) couvre un domaine spectral compris entre 640 et 745 nm (figure III-13). Le champ spectral couvert par le réseau 1800 traits/mm ainsi que les différences d'intensité des bandes d'émission, nous ont amené à décomposer ce domaine en trois zones :

- 640 à 690 nm
- 670 à 715 nm
- 697 à 745 nm.

Les spectres d'émission ont été enregistrés avec une puissance d'excitation fixe à l'échantillon (10 µW). Toutefois l'intensité des bandes d'émission comprises entre 670 et 715 nm a nécessité l'utilisation d'un filtre de densité (DO= 1) pour éviter la saturation du détecteur.

Le spectre d'émission du rubis est parfaitement connu et peut être relié au diagramme énergétique du rubis (fig. III-11). Dans le cadre de ce travail, nous n'en donnons qu'une interprétation très sommaire.

- Les deux raies les plus intenses à 694,2 et 694,8 nm, respectivement notées R1 et R2 proviennent des transitions ${}^2E \rightarrow {}^4A_2$, le doublet s'explique par l'éclatement du niveau 2E . L'intensité de ces raies est très variable avec la pression et la température, la raie R1 est responsable de l'effet laser du rubis. Les raies à 660 et 670 nm sont attribuées aux transitions ${}^2T_1 \rightarrow {}^4A_2$. Toutes ces transitions sont issues des ions Cr^{3+} isolés.

- Les raies fines observées à 700 et 705 nm ainsi qu'à 698 et 702 nm sont respectivement appelées raies de paires des séries N1 et N2. Elles traduisent la contribution de plusieurs ions de chromophore voisins. En effet, dès que la concentration en chromophore augmente, la distance entre ions isolés diminue et des groupes d'ions (deux ou trois pour N1, quatre pour N2) peuvent être excités simultanément. Ces raies se manifestent donc particulièrement dans les rubis à teneur élevée en chromophore.

- La relaxation non radiative de l'énergie s'opère par dissipation de chaleur et par transmission d'énergie au milieu, qui, amené à un niveau vibrationnel excité, émet alors une onde électromagnétique : le phonon. Cette transition se traduit par les raies de phonons à 675 , 682 , 708 et 714 nm.

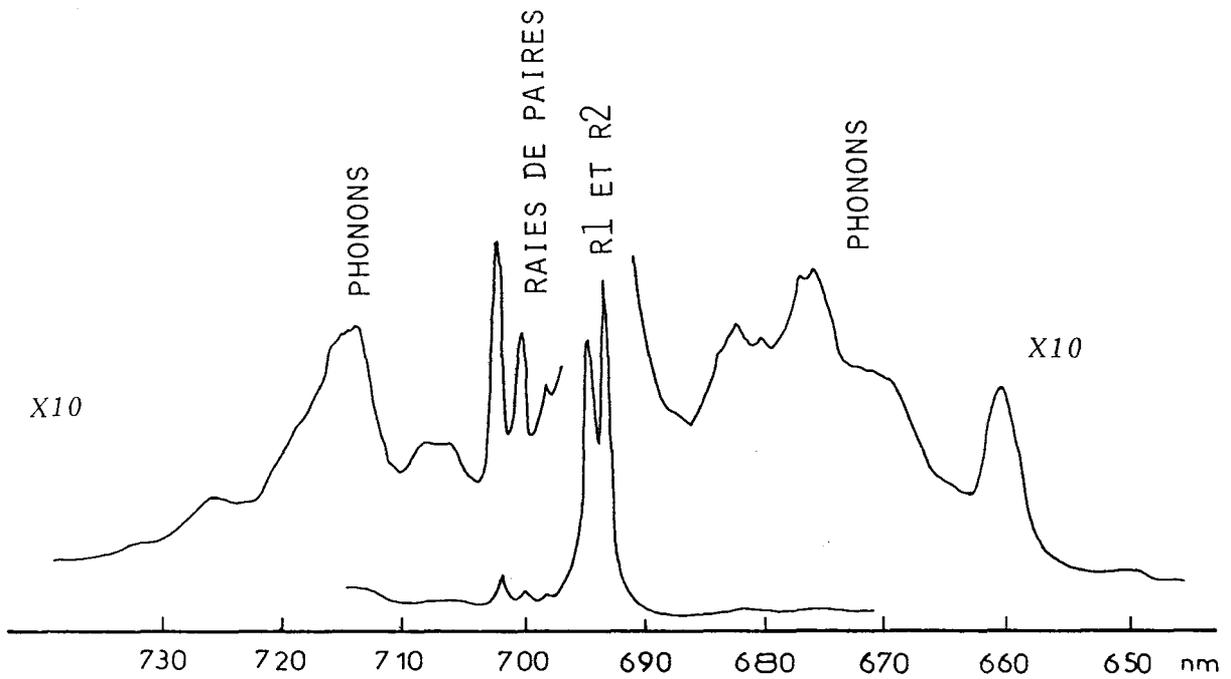


Figure III-13 : Spectre d'émission du rubis

Patm, température ambiante, position $Z(X,Y)\bar{Y}$.

Les intensités relatives de ces différentes raies sont dépendantes de l'orientation du vecteur champ électrique de l'onde incidente par rapport à l'axe optique de la pierre (C3). La figure III-14 illustre ces variations pour les trois positions $Z(X,Y)\bar{Z}$, $Z(X,Y)\bar{X}$ et $Z(X,Y)\bar{Y}$.

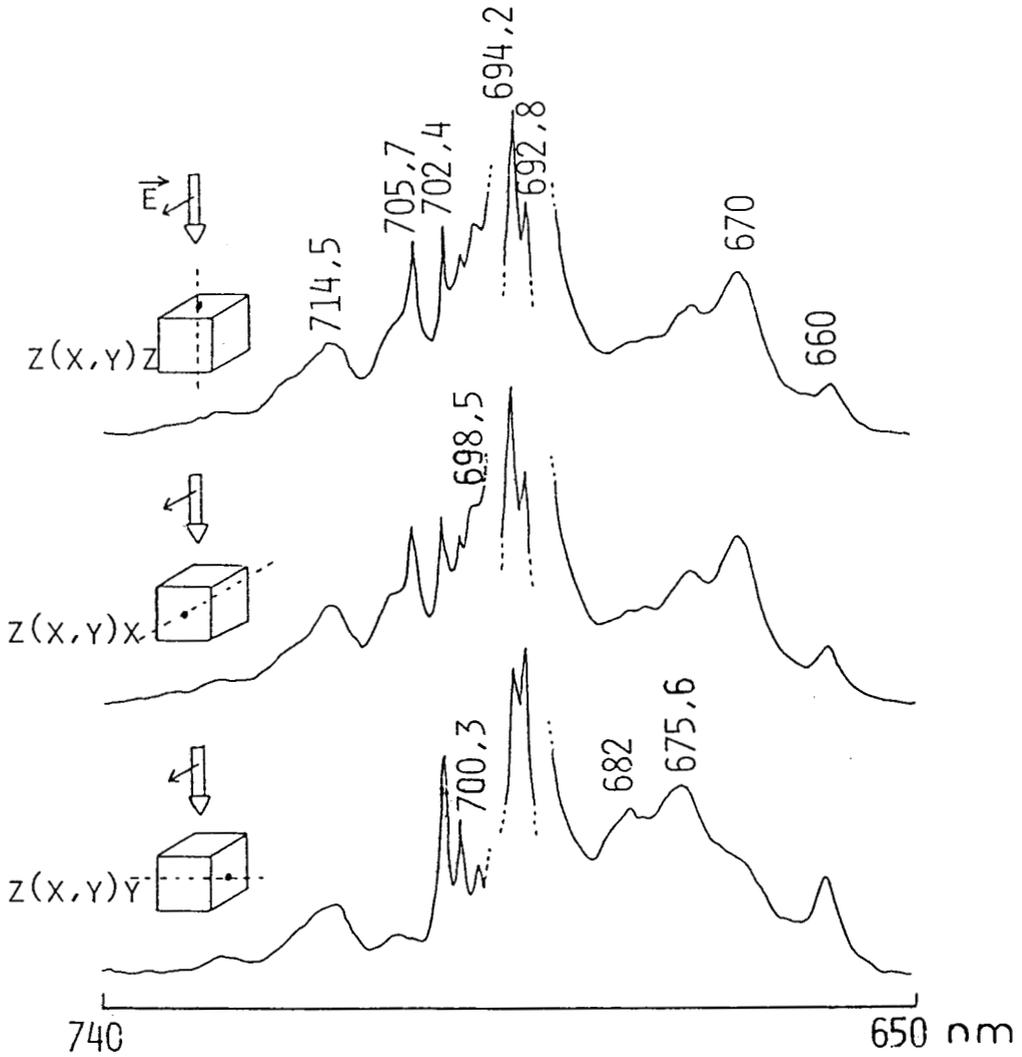


Figure III-14 : Spectre d'émission du rubis en fonction de l'orientation du vecteur champs électrique du laser et de l'orientation de l'axe optique de la pierre.

On remarque que si pour les positions $Z(X,Y)\bar{Z}$ et $Z(X,Y)\bar{X}$ les spectres d'émission restent inchangés, l'intensité des raies R1 et R2 s'inversent pour la position $Z(X,Y)\bar{Y}$. De plus des modifications apparaissent au niveau des raies de paires et de phonons, certaines sont exaltées (675 , 682 , 698 , 700 et 702 nm) d'autres s'éteignent (708 , 705 nm) ou restent inchangées (714 nm). Ces phénomènes ont été observés sur les six échantillons étudiés.

Ainsi, la rotation de la pierre autour de son axe optique C3 [position $Z(X,Y)\bar{Z}$], n'entraîne aucune modification dans le spectre d'émission. Pour les positions $Z(X,Y)\bar{X}$ et $Z(X,Y)\bar{Y}$ on observera une évolution du spectre d'émission. On montre donc que si pour la première position, l'émission de fluorescence est totalement dépolarisée, pour les deux autres positions une forte modification dans l'intensité des bandes d'émission est observée par polarisation.

III-3 : Evolution du spectre d'émission du rubis avec la concentration en chromophore.

On montre sur la figure III-15 que l'intensité des raies R1 et R2 est directement liée à la concentration en chromophore.

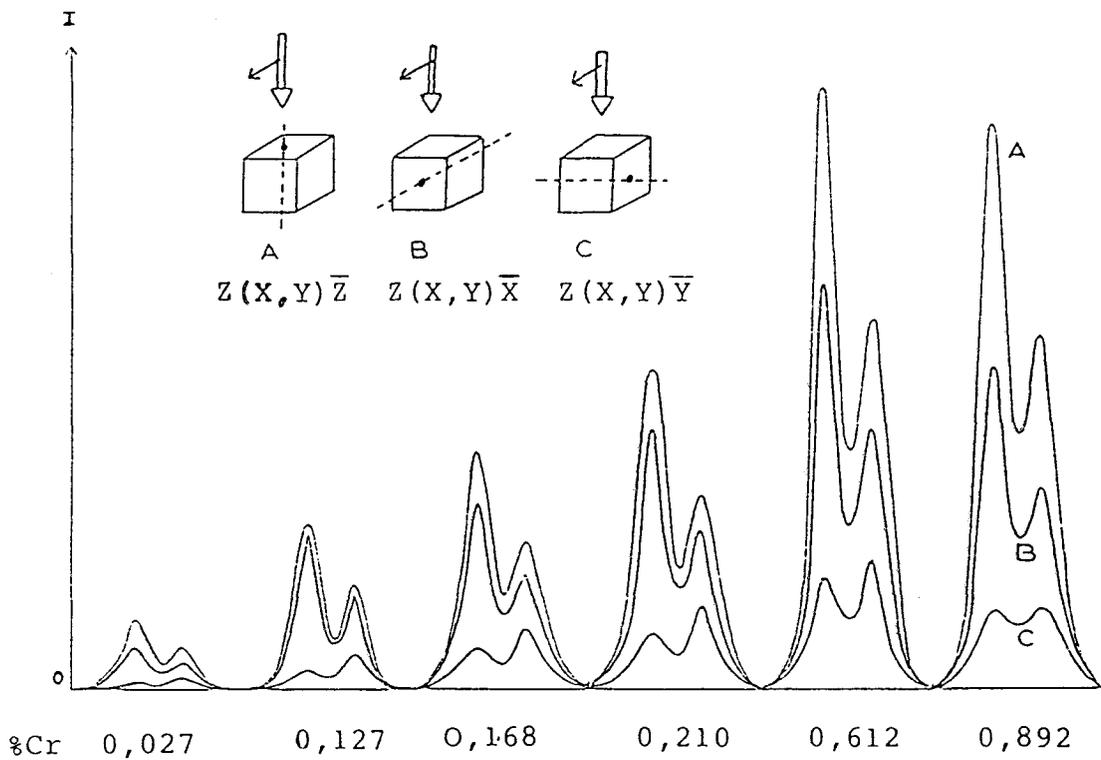


Figure III-15 : Influence de la concentration en ion Cr sur l'intensité des raies R1 et R2.

Toutefois, si l'on représente (figure III-15), pour les trois orientations précédemment définies, l'intensité des raies R1 et R2 en fonction de la concentration massique en chromophore, on constate que la loi linéaire associant ces deux paramètres, n'est respectée que dans une certaine gamme de concentration. Les courbes de la figure III-16 peuvent être décomposées en trois parties :

- Pour des concentrations faibles en chromophore ($C < 0,5 \%$), l'intensité croît quasi linéairement avec la concentration.

- Pour des teneurs moyennes en chromophore ($0,5 \% < C < 0,7 \%$), l'émission de fluorescence atteint une valeur maximale.

- Pour des concentrations plus élevées ($C > 0,7 \%$) on observe une diminution de l'intensité d'émission.

Cette diminution de l'intensité, peut être attribuée à un phénomène d'extinction par la concentration.

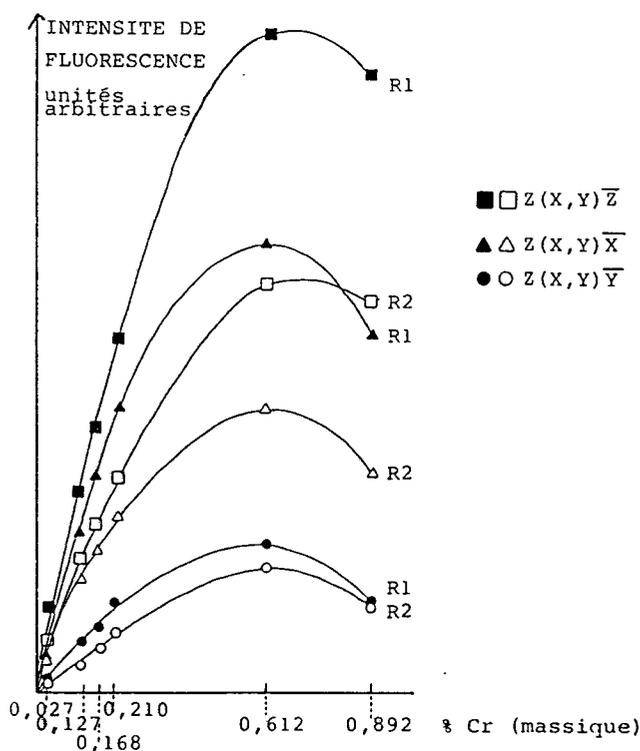


Figure III-16 : Intensité des raies R1 et R2 en fonction de la concentration.

De même que pour les raies R1 et R2, l'intensité des raies de paires (N1 et N2) est une fonction croissante de la teneur en chromophore, comme le montre les spectres représentés sur la figure III-17.

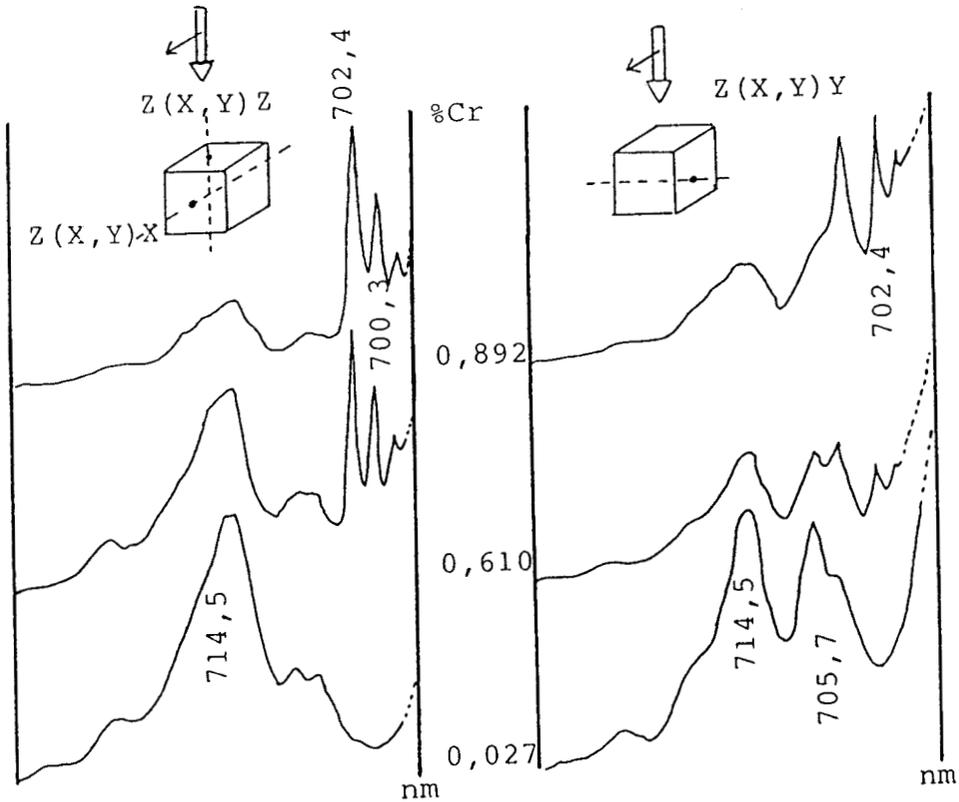


Figure III-17 : Evolution des raies de paires en fonction de la concentration en chromophore.

Une des causes de l'extinction des raies R1 et R2 lors de l'augmentation de la concentration en chromophore peut être attribuée à un phénomène de "pompage" des raies de paires. En effet, on constate sur les spectres de la figure III-18 que l'augmentation des raies de paires est liée à la diminution des raies R1 et R2. On peut corrélérer cette observation au fait que les paires d'ions Cr^{3+} sont excités à partir des ions Cr^{3+} isolés. Les paires d'ions, liées à la concentration en chromophore, jouent le rôle d'inhibiteur de fluorescence pour les raies R1 et R2.

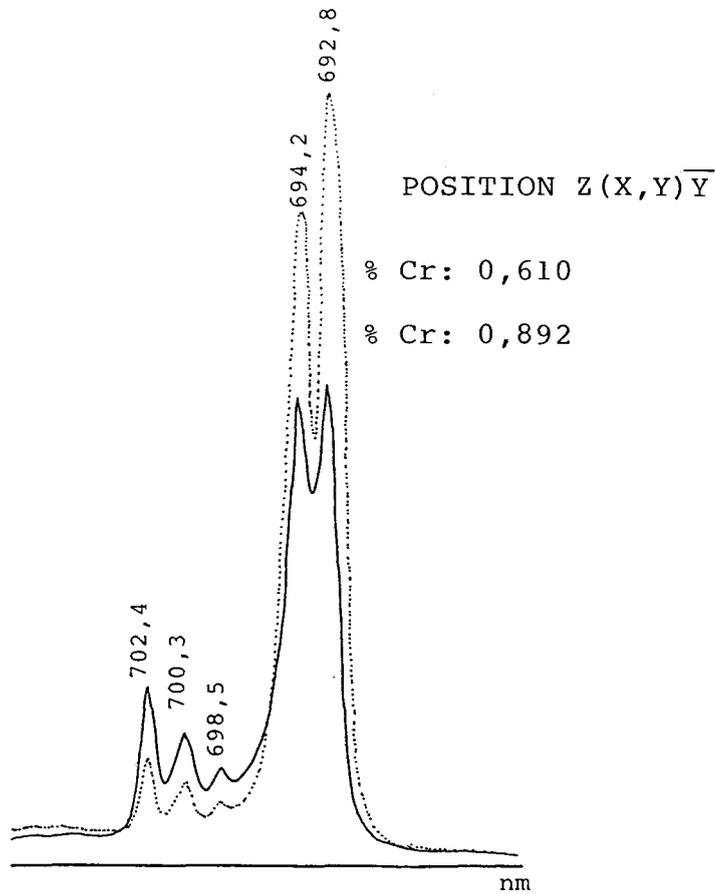


Figure III-18 : Effet de "pompage" des raies R1 et R2.

- Discussion et perspectives :

Nous avons montré au cours de cette étude que :

- quelles que soient les orientations respectives des directions d'analyse et de l'axe optique de la pierre, des informations sur la teneur en Cr peuvent être obtenues.

- Pour une concentration donnée en chromophore, la mesure de la polarisation peut donner des renseignements quant à l'orientation de l'axe optique de la pierre.

Ces deux types d'informations peuvent être mis à profit à des fins d'identification de gemmes. Le faible volume analysé en microspectrofluorimétrie laser rend possible ce type d'investigation sur des pierres de très petite taille isolées ou serties sur un bijou sans préparation particulière de l'échantillon.

D'autres gemmes tels les spinelles ou les grenats qui doivent leur coloration au chrome, pourrait également être identifiés par cette technique.

La configuration de l'instrument permettant l'utilisation d'un réseau suffisamment dispersif (1800 traits/mm) fait de la microspectrofluorimétrie à excitation laser et détection multicanale un outil remarquable pour l'étude de matériaux dopés. Les informations obtenues peuvent être utilisées pour traduire l'homogénéité d'un matériau dopé avec une résolution spatiale proche du micromètre et fournir des renseignements sur l'orientation cristallographique de ce matériau (ex : application à l'étude de barreaux utilisés dans les lasers).

- CONCLUSION

Comme les résultats l'ont montré, la grande sensibilité de la microspectrofluorimétrie à excitation laser et détection multicanale autorise l'étude de substances fluorescentes en solutions très diluées, telles qu'elles peuvent être rencontrées dans les systèmes biologiques, ou des fluorophores à rendement quantique faible telle la daunorubicine.

La résolution spatiale issue de la focalisation du faisceau laser permet l'étude d'émission de fluorescence à partir de volumes analysés extrêmement faibles (qq μm^3). Aussi en associant, sensibilité, résolution spatiale et rapidité d'analyse, la microfluorimétrie laser rend envisageable les études temporelles d'émission de fluorescence au niveau de la cellule isolée. La reproductibilité des résultats obtenus lors de l'étude des cinétiques d'hydrolyse d'ester de fluoresceine à l'intérieur de fibroblastes traduit la fiabilité de la méthode pour de telles investigations.

Les résultats obtenus quant aux mesures de polarisation de fluorescence laissent présumer à la microspectrofluorimétrie laser un avenir prometteur pour l'étude des interactions drogue-ADN au niveau de la cellule unique.

Les possibilités d'analyse, notamment quant au choix de la résolution spectrale qui permet d'étudier à la fois des fluorescences à structures larges ou étroites, ouvrent à la microspectrofluorimétrie à excitation laser et détection multicanale un vaste champ d'application dans des domaines aussi varié que la biologie, la chimie ou la gemmologie.



- QUATRIEME PARTIE -

A N N E X E

- LES PHENOMENES DE LUMINESCENCE : [1] [22]

Certaines substances ont la propriété, après absorption d'une énergie lumineuse, d'émettre dans toutes les directions de l'espace des radiations lumineuses dont la longueur d'onde, caractéristique de la substance, est différente de celle de la lumière excitatrice.

De tels phénomènes sont connus sous le nom de photoluminescence, nous verrons ultérieurement que l'on peut distinguer deux cas de photoluminescence, la fluorescence et la phosphorescence.

Toutefois, il faut savoir qu'à ces deux phénomènes s'ajoutent beaucoup d'autres processus de désactivations.

Nous nous proposons dans le cadre de ce chapitre de rappeler succinctement l'ensemble des processus permettant le retour d'une molécule excitée à son état fondamental.

I - LES ETATS EXCITES

L'excitation d'une molécule résulte du transfert d'un électron d'une orbitale de faible énergie (état fondamental) vers une orbitale d'énergie plus élevée (état excité).

Cette transition accroît donc l'énergie de la molécule, modifie sa symétrie et éventuellement la multiplicité des états électroniques mis en cause.

De part les probabilités de transition reliées aux propriétés de symétrie des orbitales, les bandes d'absorption des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ seront plus intenses que les bandes $n \rightarrow \pi^*$.

Ces transitions s'effectueront d'abord entre états singulets puis entre états singulet et triplet.

A) Modifications électroniques des états excités.

L'excitation d'une molécule s'effectue en un temps suffisamment bref (10^{-15} Sec) pour que l'on puisse considérer que la position relative des noyaux n'a pas variée (Principe de Franck Condon).

La molécule à l'état excité va retrouver son état fondamental selon plusieurs processus de désactivation de durée très variable (figure IV-1).

Le diagramme d'énergie de la figure IV-1 schématise les divers processus mis en oeuvre pour l'excitation et la désactivation d'une molécule.

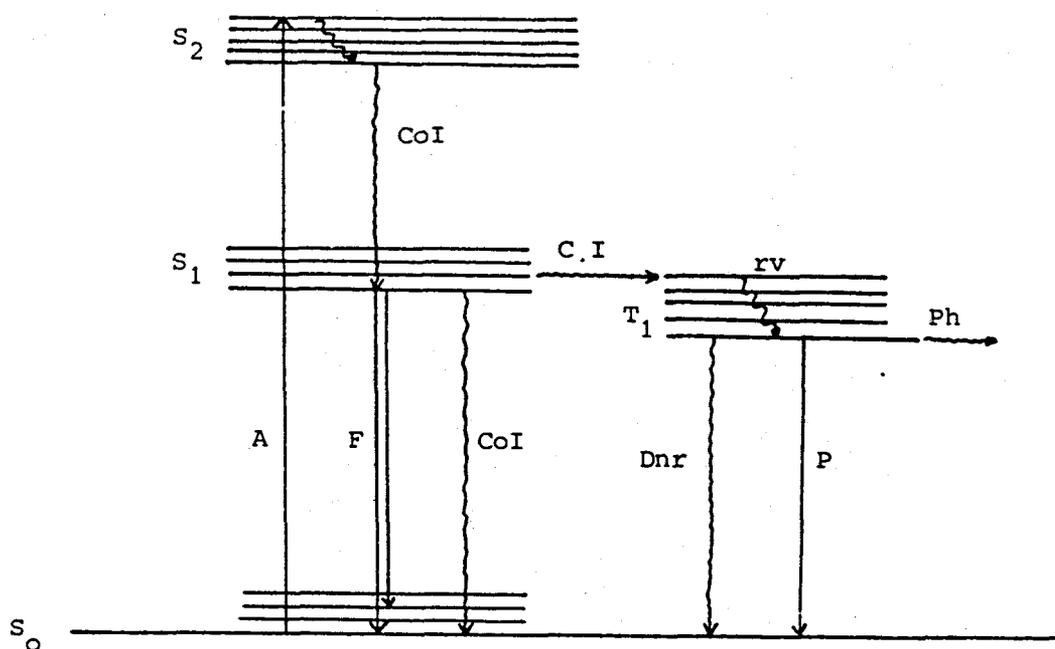


Figure IV-1 : Diagramme d'énergie et transitions

A : Absorption

COI : Conversion interne

F : Fluorescence

DNR : Désactivation non radiative

RV : Relaxation vibrationnelle

CI : Croisement intersystème

Ph : Réaction photochimique

P : Phosphorescence

- La relaxation vibrationnelle :

Le changement d'état d'une molécule est souvent accompagné de l'excitation d'un état vibrationnel.

Au cours de la désactivation on assistera dans un premier temps au retour à l'état vibrationnel de moindre énergie de l'état excité, c'est le processus de relaxation vibrationnelle (RV) d'une durée inférieure à 10^{-13} Sec. Ce phénomène consiste en une relaxation thermique peuplant principalement les sous niveaux vibrationnels les plus bas (loi de Boltzman).

- Conversion interne :

Ce phénomène consiste en une désactivation non radiative de l'état excité vers l'état fondamental. Toute l'énergie d'activation est transformée en chaleur. Ce processus est très rapide par rapport à l'émission de fluorescence, sa durée de vie est de l'ordre de 10^{-12} Sec.

- Fluorescence :

Lorsqu'une molécule atteint le niveau vibrationnel de moindre énergie du premier état singulet excité, elle peut retourner sur un niveau vibrationnel quelconque de l'état fondamental avec émission d'un photon. Ce processus constitue l'émission de fluorescence.

La dernière étape de ce processus est constituée par une relaxation sur un niveau vibrationnel nul de l'état fondamental.

La durée de vie de l'état singulet excité étant de 10^{-9} à 10^{-7} Sec, la durée de décroissance de l'émission de fluorescence sera du même ordre de grandeur. Si la fluorescence n'est pas perturbée par des processus compétitifs, le temps de vie de fluorescence correspond au temps de vie intrinsèque de l'état excité aussi appelé temps de vie "naturel".

Il est à noter que lorsqu'un quanta de radiation est émis par fluorescence, il est de plus faible énergie que celui absorbé par la molécule, ceci à cause des processus de conversion interne et de relaxation vibrationnelle (règle de Stokes). La variation d'énergie du photon provoque un déplacement des longueurs d'onde sur

le spectre de fluorescence vis-à-vis du spectre d'absorption (déplacement vers les grandes longueurs d'onde). La combinaison de ces deux processus de désactivation non radiative explique également le fait que la longueur d'onde du maximum d'émission est indépendante du niveau singulet excité initialement atteint, donc de la longueur d'onde d'excitation.

- Passage intersystème et phosphorescence :

Bien que le passage à un état triplet soit peu probable par absorption directe d'énergie à partir de l'état fondamental, il existe un processus très efficace pour peupler un état triplet à partir de l'état singulet excité de moindre énergie. La durée de vie de ce processus appelé "passage intersystème" dépendra de celle de l'état singulet excité 10^{-8} Sec. Le passage intersystème entre en compétition avec l'émission de fluorescence.

Ce processus de désactivation sera favorisé par :

- Un faible écart énergétique entre l'état singulet excité et l'état triplet qui lui est juste inférieur.
- Une augmentation de la durée de vie de l'état singulet excité.

Une fois le passage intersystème accompli, les molécules subissent le processus de conversion interne et atteignent le niveau vibrationnel de moindre énergie de l'état triplet. Il y a deux facteurs qui tendent à engendrer une transition non radiative entre l'état triplet et l'état fondamental :

- La différence d'énergie entre l'état triplet et l'état fondamental est plus faible que celle entre l'état singulet excité et l'état fondamental, ceci favorise la conversion interne.
- La durée de vie de l'état triplet est beaucoup plus grande que celle de l'état singulet excité, l'énergie d'excitation est alors perdue par transfert collisionnel.

Si la molécule excitée est placée dans un milieu rigide, une transition radiative peut être observée, ce phénomène est connu sous le terme de phosphorescence.

Comme la phosphorescence a pour origine l'état triplet, elle a un temps de décroissance dépendant de la durée de vie de cet état (10^{-4} à 10^{-5} Sec), ceci explique que le phénomène de phosphorescence persiste après excitation ce qui n'est pas le cas de la fluorescence.

La phosphorescence n'existe pratiquement pas à température ambiante, le phénomène est souvent observé à partir de milieux vitreux à la température de l'azote liquide (-77°K).

Après ce bref rappel des processus de désactivations, nous nous proposons dans la suite de ce chapitre de développer un peu plus en détail les caractéristiques du phénomène qui, dans le cadre de ce travail nous intéresse en priorité, soit l'émission de fluorescence.

II - PROPRIETES DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE

Toute molécule fluorescente est caractérisée par deux spectres :

- Un spectre d'excitation qui indique l'efficacité relative des différentes longueurs d'onde pour exciter l'émission de fluorescence d'un fluorophore donné.
- Un spectre d'émission qui indique les intensités relatives des radiations émises en fonction de la longueur d'onde.

Ce sont les relations existant entre le profil de ces spectres caractéristiques et quelques paramètres physicochimiques tels que la concentration, le pH, la viscosité et autres que nous présentons.

A) Relation intensité - concentration

Il est connu que l'intensité du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration et au rendement quantique de fluorescence du fluorophore considéré.

Cette corrélation peut être exprimée par une loi dérivée de celle de Beer Lambert de la forme :

$$I/I_0 = 10^{-\epsilon lc}$$

I_0 = Intensité du faisceau incident I = Intensité du faisceau transmis

A partir de cette expression, on peut déduire la quantité de lumière absorbée soit :

$$I_0 - I = I_0 (1 - 10^{-\epsilon lc})$$

et par suite l'intensité de l'émission de fluorescence :

$$I_f = Q_f I_0 (1 - 10^{-\epsilon lc})$$

Q_f représente le rendement quantique de fluorescence du chromophore, il est égal au rapport du nombre de molécules excitées sur le nombre de molécules effectivement fluorescentes.

Le développement limité de cette équation nous amène à exprimer l'intensité de fluorescence sous la forme :

$$I_f = Q_f I_0 \epsilon lc \left[1 - \frac{2,3 \epsilon lc}{2!} + \left(\frac{2,3 \epsilon lc}{6!} \right)^2 \right]$$

Si la proportion de lumière absorbée est faible, on peut en se limitant au premier terme du développement limité écrire :

$$I_f = Q_f I_0 \epsilon lc$$

Cette équation montre que pour des concentrations faibles en fluorophore, l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à cette concentration. Le tableau IV-1 donne l'importance relative de l'erreur commise sur l'intensité de fluorescence introduite par l'approximation précédente. [15]

Densité optique	:	$\frac{2,3 \text{ } \epsilon \text{ cl}}{2}$:	$\frac{(2,3 \text{ } \epsilon \text{ cl})^2}{6}$:	Erreur relative sur I_F %
0,001	:	0,0011	:	0,000001	:	0,1
0,01	:	0,0115	:	0,0001	:	1,1
0,05	:	0,0575	:	0,0022	:	5,5
0,10	:	0,115	:	0,0088	:	10,6
0,20	:	0,230	:	0,035	:	20
	:		:		:	

Tableau IV-1 : Erreur relative sur l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en fluorophore

Pour des concentrations relativement élevées, on peut observer une diminution du rendement quantique parfois accompagnée d'un déplacement de la bande spectrale d'émission de fluorescence.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ces altérations :

- Réabsorption de la lumière émise.
- Formation de dimères (à partir de l'état fondamental).
- Formation d'excimères (à partir de l'état excité).

Dans le premier mécanisme, la lumière émise peut être réabsorbée par des molécules à l'état fondamental. Ceci se produit surtout lorsqu'il y a un recouvrement important entre les spectres d'émission et d'absorption, la géométrie de la cellule d'excitation contribue de façon non négligeable à l'importance de ce phénomène.

Dans le second mécanisme on forme un composé appelé "dimère" entre deux molécules de fluorophores à l'état fondamental, la concentration en monomère se trouve ainsi diminuée par la formation du "dimère". Si le "dimère" n'est pas fluorescent, la lumière qu'il aura absorbée ne sera pas réémise et la fluorescence sera diminuée. Dans la plupart des cas de formation de dimère, le spectre d'absorption est modifié.

Le troisième mécanisme est similaire au précédent, mais on forme cette fois un excimère (dimère à l'état excité) susceptible de fluorescer mais à une longueur d'onde différente de celle du monomère.

B) Les phénomènes d'extinction de fluorescence

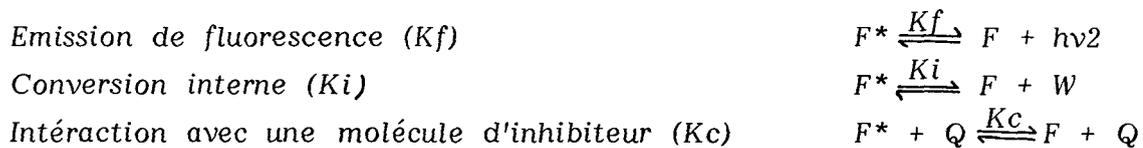
Il est d'usage d'appeler "extinction de fluorescence" toute influence physique ou chimique qui inhibe l'intensité de l'émission de fluorescence. Les processus d'extinction peuvent être classés schématiquement en deux catégories :

- L'extinction par collision ou "extinction dynamique"
- L'extinction par formation d'un complexe ayant un rendement quantique de fluorescence nul ou faible "extinction statique".

- Extinction du type collisionnel

L'extinction collisionnelle est un processus bimoléculaire dépendant du "contact" entre les molécules excitées et les molécules d'inhibiteur. C'est un processus de diffusion contrôlée nécessitant que la durée de vie de l'état singulet excité soit supérieure à 10^{-9} Sec. Le mécanisme de ce type d'extinction peut être résumé comme suit :

- La molécule fluorescente F absorbe un photon pour donner F* qui peut retrouver son état fondamental selon plusieurs mécanismes :



Kf, Ki, Kc représentent les probabilités respectives des différents mécanismes mis en jeu pour la désactivation de la molécule.

L'extinction collisionnelle peut être illustrée par une loi simple dite loi de Stern Volmer qui s'écrit, pour une intensité d'excitation constante :

$$F_0 / F = 1 + K C_q \tau$$

avec :

F et $F\emptyset$ les intensités respectives de l'émission de fluorescence en présence et en absence d'inhibiteur.

K La constante de la cinétique de l'extinction.

Cq la concentration en inhibiteur.

τ la durée de vie apparente de l'état excité en absence d'inhibiteur est égal à $1/(Kf+Ki)$.

- Extinction statique, interaction à l'état fondamental

La molécule de fluorophore (A) à l'état fondamental peut réagir avec une autre espèce moléculaire (Q) pour former un complexe dont le rendement quantique de fluorescence est faible ou nul. On peut représenter l'extinction du type statique par la relation :

$$F\emptyset / F = 1 + K CQ$$

avec :

F et $F\emptyset$ les intensités respectives d'émission de fluorescence en présence ou non d'inhibiteur.

K la constante de formation du complexe formé [$K = (AQ)/(A)(Q)$]

CQ la concentration en inhibiteur.

Les deux équations définies précédemment sont dérivées de modèles physiques différents, pour l'extinction dynamique on considère les cinétiques d'émission de fluorescence, d'extinction et de conversion interne, alors que pour l'extinction statique nous considérons le processus comme un équilibre pour lequel la concentration en molécules fluorescentes est modifiée suivant une constante d'équilibre.

On peut, pour faire une analogie entre les deux types d'extinction, considérer la formation d'un complexe. Dans le cas dynamique, la combinaison du fluorophore et de l'inhibiteur existe pendant un temps inférieur à la durée de vie de l'état singulet excité alors que dans le cas statique, les deux molécules sont en interaction pendant une période plus longue que la durée de vie de l'état excité.

Pour l'extinction dynamique, la constante du temps de déclin de fluorescence reste proportionnelle au rendement quantique de fluorescence lorsque la concentration en inhibiteur varie alors que pour le modèle statique, le rendement quantique diminue avec la concentration en inhibiteur.

On peut citer pour mémoire d'autres formes d'extinction telles que l'extinction par transfert d'énergie à distance, qui nécessite un recouvrement important du spectre d'émission d'une molécule donneuse et du spectre d'absorption d'une molécule acceptrice (Forster), ou encore l'extinction due à la concentration du fluorophore.

C) Influences diverses sur l'émission de fluorescence :

1) Effets de température et de viscosité

La diminution de température ou l'augmentation de viscosité ont pour effets de diminuer les probabilités de désactivations non radiatives et donc de favoriser l'émission de fluorescence. On peut dire également qu'une augmentation de la température ou une diminution de la viscosité du milieu fluorescent, en favorisant les chocs entre les molécules fluorescentes, augmentent la constante de la cinétique de l'extinction collisionnelle et provoquent une diminution du rendement quantique de fluorescence donc de l'intensité d'émission.

2) Effet de solvant

Une augmentation de la polarité du solvant a pour effet de stabiliser davantage l'état excité que l'état fondamental, ce qui se traduit en général par un déplacement du spectre d'émission vers les grandes longueurs d'onde.

3) Effet de pH

Le degré de protonation d'une molécule dépendant non seulement de sa structure mais aussi des groupements qui la constitue peut être modifié lors de l'excitation de la dite molécule.

La modification de la protonation lors d'une variation du pH peut se traduire par des modifications aussi bien dans le spectre d'absorption que dans le spectre d'émission.

D) Polarisation de fluorescence [58]

1) Origines du phénomène de polarisation de fluorescence.

Lorsque des molécules sont excitées par une lumière polarisée, la probabilité d'absorption dépend de l'orientation relative de la molécule et du vecteur champ électrique (\vec{E}) de la radiation excitatrice. On peut définir un vecteur d'orientation (\vec{M}) lié à la molécule et dire que la probabilité d'absorption est proportionnelle à $\cos^2 \theta$, θ étant l'angle entre le vecteur (\vec{M}) et le vecteur champ électrique (\vec{E}).

Il en est de même pour le phénomène d'émission où on définit un vecteur d'orientation (\vec{N}) lié à la molécule et on considère les différentes orientations dans lesquelles la molécule est susceptible d'émettre l'onde électromagnétique de fluorescence (\vec{F}). La probabilité d'émission est alors proportionnelle à $\cos^2 \theta$ où θ représente l'angle entre les vecteurs (\vec{N}) et (\vec{F}).

En première approximation, on pourrait penser que les vecteurs (\vec{M}) et (\vec{N}) sont confondus, en fait ces vecteurs font un angle compris entre 0° et 90° selon la nature de la molécule et de l'état excité concerné pour la transition.

L'origine de l'angle entre les vecteurs (\vec{M}) et (\vec{N}) peut être attribuée au fait que lors de l'émission de fluorescence, plusieurs processus, de durée de vie comparable à celle de l'état excité considéré, peuvent participer de façon plus ou moins importante à un phénomène de dépolarisation.

Nous pouvons illustrer quelques causes de cette dépolarisation en considérant un système bidimensionnel de molécules réparties de façon aléatoire et excitées par une lumière polarisée verticalement. La fluorescence issue de ce système est observée dans une direction perpendiculaire à la propagation de la radiation excitatrice (figure IV-2.A).

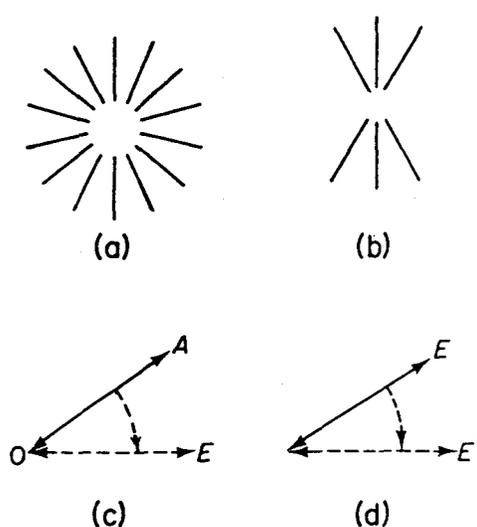
L'ensemble des phénomènes de dépolarisation peut être schématisé comme suit :

- Les molécules dont le vecteur d'orientation (\vec{M}) est parallèle au vecteur champ électrique (\vec{E}) sont préférentiellement excitées (figure IV-2.B). L'émission à partir de ces dipôles doit donc être polarisée. Toutefois, le fait que les dipôles non verticaux peuvent absorber une partie de l'énergie incidente rend cette polarisation

partielle. Le processus d'absorption est en lui-même une source de dépolariation.

- La différence d'orientation entre les dipoles d'absorption (vecteur \vec{M}) et d'émission (vecteur \vec{N}) est une seconde cause de dépolariation (Figure IV-2.C).

- Les dipoles d'émission ont des orientations relatives à la structure de la molécule, une rotation de celle-ci entraîne donc une rotation du dipole (figure IV-2.D). Ainsi, si la durée de vie de l'état excité est comparable au temps requis pour que le mouvement Brownien intervienne de façon non négligeable, une forte dépolariation est observée.



Figures IV-2 : Phénomènes de dépolariation de fluorescence.

D'autres processus tels que le transfert d'énergie non radiatif ou la réabsorption, dont l'importance dépend des propriétés spectrales de la molécule, de la concentration et de la géométrie de la cellule d'échantillonnage peuvent altérer la polarisation.

Nous avons résumé sur le tableau IV-2, les différents facteurs physiques et leurs influences intervenant dans la polarisation de fluorescence.

FACTEURS PHYSIQUES

EFFETS SUR LA POLARISATION

Absorption

Sélection des dipôles excités
Polarisation

Transfert intramoléculaire entre les oscillateurs d'absorption et d'émission

Changement dans l'orientation des dipôles
Dépolarisation intramoléculaire

Mouvement Brownien

Rotation des dipôles excités
Dépolarisation

Réabsorption de la lumière émise

Perte de l'orientation par transfert avec les dipôles non parallèles.
Dépolarisation.

Diffusion de la lumière

Perte d'orientation à la fois de la lumière excitatrice et émise
Dépolarisation

Tableau IV-2 : Influence de différents facteurs physiques sur la polarisation de fluorescence.

Sur le tableau IV-3, nous présentons quelques propriétés caractéristiques des molécules de fluorophore pouvant être étudiées par la technique de polarisation de fluorescence, nous précisons les conditions opératoires requises pour réaliser ces études.

<i>PROPRIETES ETUDIEES</i>	<i>CONDITIONS OPERATOIRES</i>
- Angle entre les dipoles d'absorption et d'émission	- Ni mouvement Brownien, transfert d'énergie, réabsorption, ce qui nécessite des viscosités élevées de faibles températures et des concentrations faibles.
- Dimension moléculaire	- Par variation de la viscosité
- Modification de conformation	- Par variation de température et ou de l'environnement.
- Nature des liaisons moléculaires	- Sondes fluorescentes
- Durée de vie de l'état excité	- Viscosité, température et volume moléculaire donné.
- Viscosité de l'environnement de la molécule de fluorophore	- Viscosité élevée Température faible.

Tableau IV-3 : Quelques applications de la polarisation de fluorescence.

Si les considérations précédentes quant à la théorie de la polarisation de fluorescence permettent de comprendre l'existence du phénomène, il faut signaler que ce n'est qu'en 1920 que F. Weigert a pu montrer que la lumière émise par une solution fluorescente, excitée par un rayonnement polarisé ou non, est en général partiellement polarisée.

Cette découverte tardive est due au fait qu'en solution aqueuse, seules les substances faiblement fluorescentes présentent une forte polarisation pour les substances fortement fluorescentes, il faut travailler en milieu de viscosité bien plus élevée.

En effet, dans les solutions fluides (viscosité de l'ordre de la centipoise) et dans les conditions où la durée de vie réelle de la molécule excitée électroniquement est supérieure à quelques nanosecondes, les molécules ont le temps de se réorienter dans une position quelconque après excitation.

Ainsi, si l'on excite une solution diluée d'un produit fluorescent à l'aide d'une lumière polarisée, on observera une émission de fluorescence non polarisée ou plutôt totalement dépolarisée. Par contre, si la viscosité de la solution est élevée, la molécule excitée ne pourra plus se réorienter totalement pendant sa durée de vie et l'on peut observer alors des polarisations particulièrement élevées.

2) Analyse de la polarisation de fluorescence

Considérons une solution fluorescente placée au centre d'un repère orthonormé et éclairée par un faisceau de lumière polarisée (verticalement par exemple), la lumière émise par fluorescence étant observée dans une direction perpendiculaire à celle de la propagation de la lumière excitatrice (figure IV-3).

Si les orientations des molécules dans le milieu sont quelconques, les molécules excitées ont des orientations distribuées en fonction de l'angle θ entre l'orientation du vecteur champ électrique (\vec{E}) et du vecteur (\vec{M}) précédemment défini. L'émission de chaque molécule a lieu de façon non isotrope liée aux angles θ .

On mesure l'intensité des deux composantes polarisées, soit $I_{//}$ (qui vibre suivant $\emptyset Z$) et I_{\perp} (qui vibre suivant $\emptyset X$) par l'intermédiaire d'un analyseur (P') placé suivant les positions adéquates (F'' et F').

Le phénomène de polarisation de fluorescence peut alors être représenté en définissant le taux de polarisation par la relation :

$$P = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + I_{\perp})$$

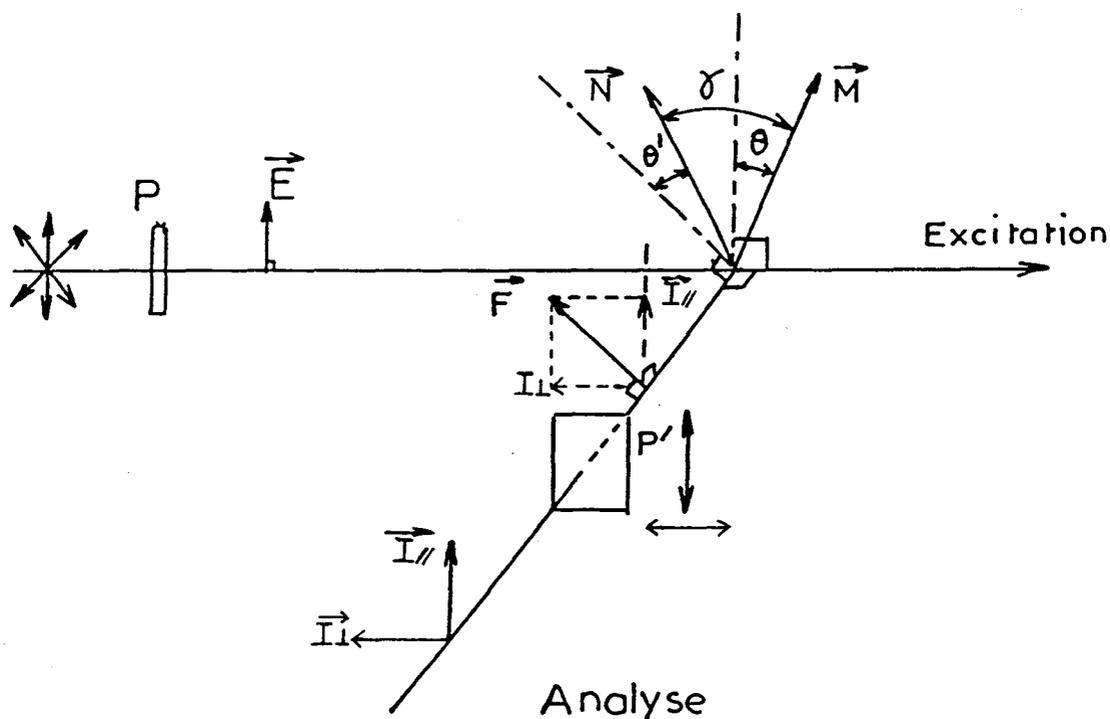


Figure IV-3 : Analyse de la polarisation de fluorescence

Dans la définition précédente du taux de polarisation, nous ne faisons aucune hypothèse quant à la position des molécules excitées à un moment donné. Toutefois, comme nous l'avons déjà signalé, par suite de l'agitation moléculaire, on peut observer une modification de la position des molécules émissives. En tenant compte de ce phénomène de diffusion rotationnelle, on peut donc prévoir trois cas possibles pour la polarisation de fluorescence.

- Pas de relaxation de rotation :

C'est le cas des excitations de molécules dans des milieux de très haute viscosité. La molécule n'a, pendant sa durée de vie, pas le temps de modifier sa position angulaire. On définit alors une polarisation fondamentale P_0 .

- Relaxation de rotation totale :

Ce résultat est obtenu en général pour des molécules dont la durée de vie est supérieure à quelques nanosecondes et dans des milieux fluides. Dans ce cas, les molécules ont le temps de retrouver une orientation quelconque avant l'émission.

- Cas intermédiaire :

Une formule très simple permet de relier la polarisation de fluorescence d'une solution quelconque à trois constantes caractérisant des propriétés intrinsèques des molécules fluorescentes soit : le volume moléculaire V , la polarisation fondamentale $P\emptyset$ et la durée de vie moyenne τ dans l'état excité. Cette formule connue sous le nom de "loi de Perrin" peut s'écrire :

$$1/P - 1/3 = (1/P\emptyset - 1/3) (1 + RT\tau/V\eta)$$

avec :

$P\emptyset$: Polarisation fondamentale

R : Constante des gaz parfaits

T : Température absolue

V : Volume moléculaire

P : Taux de polarisation

η : viscosité de la solution.

C'est bien entendu ce cas intermédiaire qui représente le modèle le plus intéressant à étudier car il donne accès soit à la détermination de la viscosité du milieu environnant la molécule de fluorophore ou à la connaissance de la durée de vie de l'état excité du fluorophore considéré.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le besoin de compléter l'analyse macroscopique d'un échantillon par des investigations à l'échelle microscopique a contribué ces dernières années au développement de nouvelles méthodologies d'analyse.

La grande sensibilité des techniques d'émission de fluorescence a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs, les premiers microspectrofluorimètres furent conçus.

Toutefois l'efficacité de ces instruments a longtemps été limitée par la faiblesse des signaux à détecter et l'efficacité des systèmes d'illumination et de détection jusqu'alors disponibles.

C'est pour améliorer la sensibilité et les performances de cette méthodologie d'analyse et pour en élargir le domaine d'application, qu'a été développée la microspectrofluorimétrie à excitation laser.

A partir d'un premier prototype d'appareil, développé par le G.I.P. "instrumentation et spectrochimie", nous avons montré que l'utilisation du laser en tant que source d'excitation présente de nombreux avantages tant sur le plan de la sensibilité que sur le plan de la résolution spatiale ou des mesures de polarisation.

La forte densité photonique obtenue au niveau de l'échantillon lorsque le faisceau laser est focalisé en une tache de quelques μm^2 permet de détecter de très faibles concentrations de matière fluorescente.

L'émission de fluorescence d'une solution 10^{-10} M de fluoresceine peut être détectée. Si cette concentration est du même ordre de grandeur que celles données par d'autres techniques de fluorimétrie, il est bon de souligner que, dans le cas présent, seules quelques centaines de molécules sont alors présentes dans la zone analysée. En effet, nous avons pu assimiler le volume effectivement analysé, appelé

"zone de détectibilité", à un cylindre dont les dimensions sont données par le diamètre du faisceau laser focalisé au niveau du "waist" et la profondeur de champ de l'instrument. Ces dimensions sont respectivement de 1 μm et 12 μm lorsqu'un objectif de grandissement 160X (immersion) est utilisé.

La densité photonique, au niveau de l'échantillon ne peut pas être augmentée considérablement car une forte décroissance de l'intensité de fluorescence (photoblanchiment) ou une altération du matériau analysé, notamment dans le cas de systèmes biologiques, est alors observée.

La rapidité d'acquisition des spectres, autorisée par la détection multicanale, constitue alors un avantage considérable pour l'analyse d'échantillons fragiles.

Lorsque les paramètres liés à l'exposition de l'échantillon à la radiation excitatrice (temps d'exposition, puissance d'irradiation) sont contrôlés, la microspectrofluorimétrie à excitation laser et détection multicanale se révèle être un outil remarquable pour l'étude d'émission de fluorescence peu intense issue de matériaux très sensibles et de taille microscopique.

Les dimensions de la "zone de détectibilité", parfaitement adaptée aux dimensions cellulaires, rendent possible des mesures d'émission de fluorescence au niveau de la cellule unique.

Les mesures quantitatives d'émission de fluorescence n'ont pas été abordées dans ce travail, cependant des travaux récents réalisés sur un appareil analogue [57] montrent qu'une quantification peu être envisagée.

La possibilité de réaliser des mesures en polarisation de fluorescence accroît les perspectives de cette méthodologie d'analyse. Il en est de même pour les possibilités de compléter les mesures en émission de fluorescence par des mesures, d'absorption, de réflexion ou de diffusion Raman à partir d'un appareil unique.

Les connaissances acquises lors de la conception de divers prototypes, ont permis la réalisation d'un appareil commercial : Le Compacdil.

Sa configuration de base est voisine de celle des instruments décrit dans cette thèse à savoir, excitation laser, microscope, prémonochromateur double soustractif, spectrographe et détection à barette de photodiodes intensifiée.

Cet instrument a été présenté à la "Pittsburg Conference" (Atlanta USA 1989). L'intérêt qu'a suscité cet appareil laisse entrevoir un avenir prometteur à la microspectrofluorimétrie laser et détection multicanale.

- **BIBLIOGRAPHIE** -

BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. M. HERCULES ; *Fluorescence and phosphorescence analysis. Principles and applications.*, J. Wiley & Sons, (1966).
- [2] G.NORDEN ; *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.*, 96,1,(1953).
- [3] M. ROUSSEAU ; *Bull. Micr. Appl.*, 7,92,(1957).
- [4] B. CHANCE, R. PERRY, B. THORREL. et L. AKERMAN ; *Biochim. Biophys. Acta.*, 39,24,(1960).
- [5] B. CHANCE and B. THORELL ; *The Journal of Biol. Chem.*, 234,3044,(1953).
- [6] R.A. OLSON ; *Rev. Sci. Instrum.*, Vol. 31, N°8,844,(1960).
- [7] E. KOHEN, C. KOHEN et B. THORELL ; *Biomedical Eng.*, 4,554,(1969).
- [8] E. KOHEN, C. KOHEN et B. THORELL ; *Biochim. Biophys. Acta.*, 234,531,(1971).
- [9] SSR Instrument Co "Model 1131A. Electronic Manual"
SSR Instruments Co Santa Moniqua, California, (1970).
- [10] E. KOHEN, M. MICHAELIS, C. KOHEN et B. THORELL ; *Experimental Cell Research.*, 77,195,(1973).
- [11] S.S. WEST, C.N. LOESER, M.D. SCHOENBERG ; *I.R.E. Trans. On Med. Elect.*, Vol. 7,138,(1960).
- [12] E. KOHEN, C. KOHEN et G. HIRSCHBERG ; *Int. J. Bio-Medical Compating.*, 11,305,(1980).
- [13] E. KOHEN, J.G. HIRSCHBERG et M. FRIED ; *Microbeam Analysis.*, (1987).
- [14] J.M. SALMON, J. VIGO, P. VIALLET ; *Innov. Tech. Biol. Med.*, Vol. 2, N°6,(1981).
- [15] J.M. SALMON ; *Thèse d'Etat Perpignan.*, (1980).
- [16] M. DELHAYE, P. DHAMELINCOURT ; *J. Raman Spectrosc.*, Vol.3,33,(1975).
- [17] P. DHAMELINCOURT ; *Thèse d'Etat Lille.*, (1979).
- [18] M. DELHAYE ; *Spectrosc. Biol. Mol.*,
Ed. Sandorfy and Theophanides., Vol. 139,587,(1984).
- [19] J. BARBILLAT ; *Thèse d'Etat Lille.*, (1983).
- [20] K. KORKIDIS, C. VIZCAINO ; *Spectra Supplément.*, Vol.14, N° 109,(1986).

- [21] J.P. CORNARD ; Thèse Lille., (1987).
- [22] AMADEO J. PESCE, CARL-GUSTAF. ROSEN et TERRY L. PASBY ;
Fluorescence Spectroscopy., Marcel DEKKER Inc. New York, (1971).
- [23] P. DHAMELINCOURT, M. DELHAYE, J. BARBILLAT, L. BOUSSEKEY,
E. DA SILVA, B. ROUSSEL ;
Spectroscopy of Biological molécules (Reims), Eds. A.J.P. Alix, L. BERNARD,
M. MANFAIT., J. Wiley & Sons, (1985).
- [24] P. DHAMELINCOURT, M. DELHAYE, E. DA SILVA, J.P. CORNARD, B. LENAIN ;
International conférence on Raman Spectroscopy, (Eugène U.S.A.),
Eds. W. PETICOLAS, B. HUDSON ; 20,29,(1986).
- [25] J. BARBILLAT, P. DHAMELINCOURT, J.P. CORNARD, B. LENAIN ;
Microbeam Analysis (Honolulu), Ed. R.H. GEISS ; San Francisco Press,
210,(1987).
- [26] Catalogue MELLES GRIOT., (1988).
- [27] Documentation Technique : "Multichannel Spectroscopy".,
Société DILOR ; (1988).
- [28] Y. TALMI, R.W. SIMPSON ; Applied Optics., Vol. 19,N°9,(1980).
- [29] NORMAN J. DOVICH, JOHN C. MARTIN, JAMES. H. JETT ;
Anal. Chem., 56,348,(1984).
- [30] B. KIRSH, E. VOIGTMAN, J.D. WINEFORDNER ; Anal. Chem., 57,2009,(1985).
- [31] B. LENAIN ; DEA LILLE., (1985).
- [32] B. DI BARTOLO ; Luminescence of inorganic Solids., Plenum Press, (1977).
- [33] M. CZERNY, AF. TURNER ; Z. Physik. Gl., 792,(1930).
- [34] T. HIRSCHFELD ; Science., Vol. 230,286,(1985).
- [35] B. GUINOT, C. BINAND & Al ;
Abstracts of Canadian Society of Forensic Science., (1988).
- [36] A.P. GAMOT, B. LENAIN, J.M. HAGUENOER ;
Abstracts of Canadian Society of Forensic Science., (1988).
- [37] A.P. GAMOT, B. LENAIN, J.M. HAGUENOER ; Chimie Magazine supplément
au N° 70,60,(1988).
- [38] B. GUINEAU, C. BINANT et B. LENAIN ;
Rapports d'étude non publiés., Lille (1988).
- [39] M. DELHAYE, P. DHAMELINCOURT, J.C. MERLIN, B. LENAIN, L. BOUSSEKEY ;
Spectroscopy of Biological Molécules (Reims),
Eds. A.J.P. ALIX, L. BERNARD, M. MANFAIT ; J. WILEY & Sons, (1985).
- [40] J.C. MERLIN, M. DELHAYE ; Laser Scattering Spectroscopy of Biological
objects (Prague), Eds. J. STEPANEK, P. ANZENBACHER, B. SEDLACEK.,
49,(1986).

- [41] A. SEIGNEUR ; Thèse Orsay., (1987).
- [42] KAUFMAN, NESTER, WASSERMAN ; *J. of histochem. Cytochem.*, Vol. 19, N°8,469,(1971).
- [43] H. S. BENNETT and G. J. ROSASCO ; *J. Appl. Phys.*, 49,2,(1978).
- [44] G. DELFINO and E. CASALE ; *Applied optics.*, Vol. 22, N° 17,(1983).
- [45] G. DELFINO and E. CASALE ; *Applied optics.*, Vol. 20, N°6,(1981).
- [46] M. GOLDMAN ; *Exp. Parasitol.*, 9,25,(1960).
- [47] A.P.M. JONGSMA, W. HIJMANS and J.S. PLOEM ; *Histochemic.*, 25,329,(1971).
- [48] F. HERZOG, B. ALBINI and G. WICK ; *J. Immunol. Methods.*, 43,349,(1973).
- [49] L. ENERBACK and K.A. JOHANSSON ; *Histochem. J.*, 5,351,(1973).
- [50] G.D. JOHNSON, R.S. DAVIDSON, K.C. Mc NAMEE, G. RUSSEL ; *Journal of Immunological Methods.*, 55,231,(1982).
- [51] G.J. ROSASCO ; *Advances in Infrared and Raman Spectroc.*, Vol. 7 ; Eds. R.J.H. CLARK et R.E. HESTER ; HEYDEN, (1980).
- [52] J.J. BARETT, N.C. ADAMS ; *J. Opt. Soc. Amer.*, 58,3,(1968).
- [53] Y.C. KIANY and R.W. LANY ; *Applied optics.*, Vol. 22,N°9,(1983).
- [54] S. BROERSMA ; *J. Chem. Phys.*, 32,1632,(1960).
- [55] ALISTER E. Mc GRATH et CHRISTOPHER G. MORGAN ; *Biochimica Biophysica Acta.*, 426,173,(1976).
- [56] EM. SHIM WU, KENNETH JACOBSON, DEMETRIOS PAPAHAJIOPOULOS ; *Biochemistry.*, Vol. 16, N°17,(1977).
- [57] M. MANFAIT, M. GIGLI, J. MILLOT ; *Spectroscopy of Biological Molecules.*, Vol. 2 Ed. E.D. SCHIMD ; John WILEY & Sons, (1987).
- [58] J.C. ANDRE, M. BOUCHY, M. DONNER, A. SAMOUN ; *Spectra 2000.*, Vol.6, N° 46,(1978).
- [59] J.F. STOLTZ, M. DONNER ; *Innov. Tech. Biol. Med.*, Vol. 6, N°4,(1985).
- [60] D.A. LONG ; *Raman Spectroscopy.*, Ed. Mac Graw Hill, (1977).
- [61] J. LAUREYNS ; Thèse d'Etat Lille., (1987).
- [62] BIW. COOK, G.D. OGILVIE ; *Microbeam Analysis.*, 294,(1982).

- [63] A. BOIVIN, E. WOLF ; *Physical Review.*, 138,B,1561,(1965).
- [64] C. BREMARD, J. LAUREYNS, J.C. MERLIN, G. TURREL ;
J. Raman Spectrosc., 18,305,(1987).
- [65] F. PERRIN ; *Ann. Phys., Paris*, 12,169,(1929).
- [66] B. ARRIO, F. RODIER, J. LAVOREL, C. VERNOTTE ;
Biochimie., 54,161,(1972).
- [67] A. DIMARCO, M. GAETANI et B. SCARPINATO ; *Cancer. Chem. ther. Rep.*, 53,33,(1969).
- [68] S. NEIFLE ; *Prog. Med. Chem.*, 16,151,(1979).
- [69] F. DELPLACE-DELHAYE ; *Thèse d'Etat Lille.*, (1988).
- [70] E.R. LOCHMANN and A. MICHELER ;
Physicochemical properties of Nucleic Acids., Ed. J. Duchesne ;
Academic Press, London, 223,(1973).
- [71] T.W. PLUMBRIDGE, J.R. BROWN ; *Biochim. Biophys. Acta.*, 479,441,(1977).
- [72] M. MANFAIT ; *Thèse d'Etat Reims.*, (1981).
- [73] L. GINOT ; *Thèse Reims.*, (1985).
- [74] M. MARVIN, N. and R. BLACKBURN ; *J. Biol. Chem.*, 230,1051,(1958).
- [75] D.N. KRAMER, G.G. GUILBAULT ; *Analytical Chemistry.*, Vol. 35, N°4,(1963).
- [76] R. SALVAYRE, A. NEGRE, J. RADOM, L. DOUSTE-BLAZY ;
Clinical Chemistry., Vol. 32, N°8,(1986).
- [77] M. FLEISHER, M.K. SCHWARTZ ; *Clinical Chemistry.*, Vol. 17, N°5,(1971).
- [78] R. SALVAYRE, A. NEGRE, A. MARET ; *Ann. Biol. Clin.*, 43,493,517(1985).
- [79] T.J. JACKS, H.W. KIRCHER ; *Analytical Biochemistry.*, 21,279,(1967).
- [80] WANG et al ; *J. Biol. Chem.*, 258,9197,(1983).
- [81] PATTON ; *Lipids.*, 10,562,(1975).
- [82] J.C. FRUCHART, G. SEZILLE, H. GHISLAIN ; *La Nouvelle Presse Médicale.*,
9, N°8,(1980).
- [83] P.L. ARZOGLOU, J.M. LESSINGER, G. FERARD ; *Clinical Chemistry.*,
Vol. 32,N°1,(1986).
- [84] G.G. GUILBAULT, J. HIESERMAN ; *Analytical Chemistry.*, Vol. 41, N°14,(1969).
- [85] G.G. GUILBAULT, D.N. KRAMER ; *Analytical Biochemistry.*, 14,28,(1966).
- [86] E. FRITSCH, G.R. ROSSMAN ; *Gems and Gemology Fall.*, (1987).

- [87] G.F. IMBUSCH, A.L. SCHAWLOW, A.D. MEY and S. SUGANO ; *Phys. Rev.*, A140,830,(1965).
- [88] G.F. IMBUSCH ; *Physical Review.*, Vol. 153, N°2,(1966).
- [89] D.F. NELSON, M.D. STURGE ; *Physical Review.*, Vol. 137, N°4A,(1964).
- [90] R.B. BARTHEM, T. ABRITTA, J.P.F. EICHLER ; *Journal of Luminescence.*, 27,321,(1982).
- [91] U. ROTHAMEL, J. HEBER, W. GRILL ; *Condensed Matter.*, 50,297,(1983).
- [92] A.A. KAPLYANSKII, A.K. PRZHEWSKII ; *Proceedings of the International Conference on luminescence.*, 1380,(1966).
- [93] A. MONTEIL and E. DUVAL ; *J. Phys. C. Solid State Phys.*, 17,5219,(1984).
- [94] S. YAMAOKA, O. SHIMOMURA, O. FUKUNAGA ; *Proc. Japan Acad.*, 56,Ser.B N°3,(1980).
- [95] D. CURIE ; *Champ Cristallin et Luminescence.*, Ed. Gauthier Villars ; (1968).
- [96] J. DUBOIS ; *Mémoire de Gemmologie Nancy.*, (1989).

