



HAL
open science

Etude de dérivés de Bodipy à l'état solide et en matrice polymère: vers la réalisation de nanocapteurs

Sophie Badré

► **To cite this version:**

Sophie Badré. Etude de dérivés de Bodipy à l'état solide et en matrice polymère: vers la réalisation de nanocapteurs. Autre. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2007. Français. NNT : . tel-00180135

HAL Id: tel-00180135

<https://theses.hal.science/tel-00180135>

Submitted on 17 Oct 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT
DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN**

Présentée par

Mademoiselle Sophie BADRÉ

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Domaine :

SCIENCES PHYSIQUES et CHIMIQUES

Sujet de la thèse :

Étude de dérivés de Bodipy à l'état solide et en matrice polymère:

Vers la réalisation de nanocapteurs.

Thèse présentée et soutenue à Cachan le 1^o Octobre 2007 devant le jury composé de :

Raymond ZIESSEL	Directeur de recherche - CNRS	Président
Mark VAN DER AUWERAER	Professeur - KU Leuven	Rapporteur
Thierry DELAIR	Directeur de Recherche - Biomérieux	Rapporteur
Alain IBANEZ	Directeur de recherche - CNRS	Examinateur
Rachel MÉALLET-RENAULT	PRAG - ENS Cachan	Examinatrice
Robert PANSU	Directeur de recherche - CNRS	Directeur de thèse

Laboratoire Photophysique et Photochimie Supramoléculaire et Macromoléculaire
(ENS CACHAN/CNRS/UMR 8531)
61, avenue du Président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX (France)

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires de l'École normale supérieure de Cachan. Je remercie son directeur, Jacques Delaire, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir suivi mon travail de DEA puis de thèse.

Je voudrais exprimer ici ma reconnaissance envers Robert Pansu, qui a dirigé cette thèse, m'a permis d'explorer les méandres de la fluorescence à l'état solide et de l'imagerie et avec qui les échanges scientifiques ont toujours été enrichissants. Rachel Méallet-Renault a aussi suivi mon travail ; je la remercie de m'avoir fait découvrir les Bodipy et les nanolatex ainsi que d'avoir relu avec attention mon manuscrit.

Je remercie Mark Van Der Auweraer et Thierry Delair qui ont accepté de juger mon travail ainsi que Raymond Ziessel qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Enfin, Alain Ibanez a aussi participé à ce jury et je l'en remercie. J'ai beaucoup apprécié son dynamisme et ses conseils au cours de ces trois années.

Le travail sur les nanolatex n'aurait pu être réalisé sans la collaboration de Chantal Larpent. Je la remercie de l'intérêt qu'elle a montré pour mon travail, de m'avoir permis d'approfondir mes connaissances sur ces objets, ainsi que pour son aide lors de la rédaction de ce manuscrit.

Pendant ces trois années, j'ai eu l'opportunité de découvrir d'autres sujets de recherche ; Pierre Audebert m'a donné l'occasion d'étudier la fluorescence des tétrazines. Ce travail n'apparaît pas dans ce manuscrit mais j'ai aussi beaucoup appris. Grâce à Suzanne Fery-Forgues, j'ai pu étudier la fluorescence des cristaux de NBD. Je la remercie pour sa gentillesse et son dynamisme. Enfin, Rémi Métivier et Keitaro Nakatani m'ont permis de découvrir les photochromes et travailler avec eux a été un plaisir.

Je remercie toutes les personnes qui à un moment ou à un autre ont fait avancer mon travail : Jean-Jacques Vachon, indispensable pour le bon fonctionnement du laser et du QA, Carine Julien pour ses conseils toujours judicieux sur la science et le reste, Thanh Truc Vu qui va continuer l'étude des Bodipy, les stagiaires, Elliot Naidus, David Kodjabachian et Claire Rannoux qui m'ont aidé à réaliser certaines expériences, Isabelle Gautier-Luneau, de l'institut Néel de Grenoble, qui a résolu la structure cristallographique du TMB et de l'IP-BDY, Caroline Cannizzo, Emmanuel

Allard et Michel Frigoli de l'institut Lavoisier de Versailles, pour m'avoir transmis leur savoir sur les nanolatex et Émilie Dubuisson de l'institut Néel qui a toujours su répondre à mes demandes. Les discussions avec Jean-Pierre Lemaistre m'ont aidée à mieux comprendre la fluorescence à l'état solide. Je voudrais aussi exprimer ma gratitude pour les chimistes organiciens qui ont préparé tous les Bodipy que j'ai étudiés; au PPSM, Cécile Dumas-Verdes et Gilles Clavier ont toujours été disponibles pour répondre à mes questions et me donner des conseils. Les synthèses ont aussi été réalisées dans l'équipe du Professeur Boris Trofimov, en particulier par Éléna Senotrusova, et par Christine Goze et Gilles Ulrich de l'université Louis Pasteur à Strasbourg. Ce travail a été effectué dans le cadre de deux projets ANR et je souhaite ici exprimer ma reconnaissance aux personnes qui participent à ces projets, en particulier celles de la société Genewave. Ma gratitude va aussi à Oliver Mullins qui m'a fait découvrir la fluorescence il y a quelques temps déjà.

Ces années passées au PPSM ont été riches en rencontres et en bon moments. Je voudrais ici remercier Andrée pour sa disponibilité, Jacky qui a accepté de se pencher sur mon Mac, Vincent avec qui j'ai pu partager les tracas du quotidien de la thèse et de la rédaction, et, dans le désordre et de manière non exhaustive, Minh, Arnaud S, Khaled, François, Gabriel, Édouard, Arnaud B, Ludivine, Béatrice, Michel, Philippe, Émilie, Vanessa, Minako, Kuni, Zenji, Ruri, Joanne, Éléna, Valérie A., Valérie G., Serge, Fabien, Laurent, Isabelle... J'ai aussi eu la chance de faire partie de l'équipe pédagogique du département de Chimie et cette expérience a été très enrichissante.

Je ne pourrais jamais assez remercier mes proches qui m'ont accompagnée et soutenue pendant ces trois années. Un grand merci à ma famille qui m'a permis de devenir ce que je suis, Papa, Vincent, Christine, Marc et Célestin, mais aussi Martine, Marc et Martine, Bertrand et tous les autres, avec une pensée pour Mamia qui a toujours montré de l'intérêt pour les activités et les études de ses petits enfants. La famille Bergeal a aussi suivi avec intérêt mon parcours, et je les en remercie vivement, en particulier Édith qui a pris le temps de corriger ma prose. Je n'oublie pas mes amis, Florence et Vincent, Max et Hélène, Alexis, Sam, Sonia, Gaston et Oriane.

Je n'aurais pas pu réussir sans Nicolas, qui croit en moi et qui a su rester à mes côtés pendant tout ce temps.

Table des matières

Introduction générale	5
I Principes	9
1 Processus photophysiques	11
1.1 Molécule en solution	11
1.1.1 Niveaux d'énergie d'une molécule	11
1.1.2 Absorption de la lumière	13
1.1.3 Processus de désexcitation	14
1.1.4 Anisotropie de fluorescence	16
1.1.5 Utilisation de la fluorescence pour sonder l'environnement d'une molécule	17
1.2 Assemblées de fluorophores	20
1.2.1 Forces d'interaction	20
1.2.2 Transferts d'énergie	22
1.2.3 Niveaux d'énergie de l'exciton et absorption de la lumière	25
1.2.3.1 Cas de deux molécules	25
1.2.3.2 Cas de N molécules	28
1.2.4 Fluorescence	29
2 Nano-objets fluorescents	31
2.1 Quantum dots	32
2.2 Fluorescence dans une matrice solide	33
2.3 Nanocristaux moléculaires	35
3 Les dérivés de Bodipy	39
3.1 Synthèse	40
3.2 Propriétés Photophysiques	43

3.3	Exemples d'utilisation des Bodipy	46
3.4	Présentation des Bodipy utilisés au cours de cette thèse	48
3.4.1	TMB et pcp-BDY	48
3.4.2	Bodipy commerciaux	51
3.4.3	Cryptobodipy	52
3.4.3.1	Iodophényl-bodipy - IP-BDY	52
3.4.3.2	Autres molécules	54
3.5	Agrégation des dérivés de Bodipy	58
3.5.1	Augmentation de la concentration - Formation d'excimères	58
3.5.2	Formation de dimères	59
II	Fluorescence à l'état solide	63
4	Dispositif expérimental et méthodologie	65
4.1	Dispositif expérimental	66
4.1.1	Le FLIM	66
4.1.1.1	Mesure de la durée de vie	66
4.1.1.2	Imagerie	68
4.1.2	Description du montage	69
4.2	Méthodologie d'étude	72
4.2.1	Échantillons observés	72
4.2.2	Mesures réalisées	74
4.2.3	Analyse des résultats	77
4.2.4	Analyse des structures cristallographiques	78
5	Ingénierie moléculaire	81
5.1	TrimésitylBodipy - TMB	82
5.1.1	Films évaporés	82
5.1.2	Poudre	85
5.1.3	Structure cristallographique	86
5.2	ParacyclophanylBodipy - pcp-BDY	87
5.3	Bilan	91
6	Criblage d'une famille de Bodipy	93
6.1	Cryptobodipy - Série 1	93
6.1.1	Résultats	93

6.1.2	Structure cristallographique	97
6.1.3	Relation entre la structure du solide et la fluorescence	101
6.2	Cryptobodipy - Série 2	103
6.3	Bodipy commerciaux	104
6.3.1	PM597	104
6.3.2	PM567	105
6.4	Bilan	107
7	Iodophényl-Bodipy - IP-BDY	109
7.1	Poudre	109
7.1.1	Résultats	109
7.1.2	Structure cristallographique	111
7.2	Films	112
7.3	Nanocristaux en matrice sol-gel	114
7.3.1	Préparation	114
7.3.2	Propriétés spectroscopiques	116
7.3.3	Quenching par le bleu de cibacron	120
7.4	Bilan	122
III	Fluorescence en matrice polymère	125
8	Films de PMMA	127
8.1	Préparation et méthodes de caractérisation	128
8.1.1	Dépôt des films	128
8.1.2	Étude de la fluorescence	129
8.2	Propriétés spectroscopiques des Bodipy dans le PMMA	133
8.2.1	Cas $d > R_0$	134
8.2.2	Évolution des propriétés spectroscopiques avec la concentration	138
8.3	Extinction de la fluorescence	142
8.3.1	Quenching par le bleu de Cibacron	142
8.3.2	Films mixtes PM597 - Diary-6	144
8.4	Conclusion	150
9	Nanolatex	151
9.1	Introduction	151
9.1.1	Microsphères fluorescentes	151

9.1.2	Travaux antérieurs	153
9.1.3	Capteur d'ATP	154
9.1.3.1	L'Adénosine Tri Phosphate	154
9.1.3.2	Senseur d'ATP envisagé	157
9.2	Préparation	160
9.2.1	Synthèse	160
9.2.1.1	Polymérisation en microémulsion	161
9.2.1.2	Protocole expérimental	163
9.2.2	Fonctionnalisation en surface	164
9.2.2.1	Principe et échantillons préparés	164
9.2.2.2	Amélioration de la stabilité colloïdale	167
9.2.3	Dopage par un fluorophore	169
9.2.3.1	Incorporation dans la matrice polymère	170
9.2.3.2	Propriétés spectroscopiques	175
9.3	Capteur d'ATP	181
9.3.1	Dilution du bleu de cibacron dans l'eau	181
9.3.2	Cinétique d'adsorption du bleu de cibacron sur les billes	183
9.3.3	Quenching de la fluorescence des nanolatex	187
9.3.4	Tests en présence d'enzyme	193
9.4	Conclusion et perspectives	194
	Conclusion générale	195
	A Synthèse du TMB et des pcp-BDY	197
	B Structures cristallographiques	201
	C Synthèse des nanolatex	207
	Bibliographie	221

Introduction générale

Les capteurs permettent de sonder notre environnement. Ils sont utilisés pour caractériser les propriétés physico-chimiques d'un milieu ou pour détecter la présence d'une espèce donnée. Les domaines d'application sont par exemple la détection de polluants ou d'explosifs, la caractérisation de molécules en milieu biologique ou encore le suivi de processus industriels. En particulier, les *capteurs chimiques* convertissent une reconnaissance chimique de l'analyte en un signal mesurable [1]. Ils sont composés d'une partie qui reconnaît l'analyte et d'une partie qui assure la signalisation de la reconnaissance. Le signal peut être électrochimique, thermique, optique, ou il peut s'agir d'une variation de masse [2]. La fluorescence, i.e. l'émission d'un photon, dit de fluorescence, par une molécule, dépend de l'environnement de cette molécule. Ce phénomène peut donc être utilisé dans un capteur. Les *sondes fluorescentes* présentent de nombreux avantages : la sensibilité est importante, la détection du signal est assez simple à mettre en oeuvre et la réponse du système est rapide, ce qui permet un suivi en temps réel de l'analyte. En biologie par exemple, l'imagerie de fluorescence permet aussi de localiser l'analyte dans l'espace [1].

L'équipe de Robert Pansu développe des capteurs fluorescents dans lesquels la signalisation est assurée, non pas par une molécule fluorescente, mais par des nano-objets. Deux types d'objets sont utilisés : des nanocristaux fluorescents formés avec des molécules organiques et des nanolatex (NL), c'est à dire des suspensions colloïdales de particules de polystyrène de quelques dizaines de nanomètres de diamètre, dans lesquelles un fluorophore a été incorporé. L'intérêt d'utiliser des nano-objets est double. D'une part, le signal de fluorescence est plus important, puisque la signalisation est assurée par un nombre important de fluorophores, et pas par une seule molécule [3] et d'autre part, s'il existe un transfert d'énergie entre les molécules dans la particule, la variation du signal de fluorescence peut être amplifiée. Le principe de fonctionnement des nanocapteurs est schématisé figure 1. La modulation du signal de fluorescence est assurée par un transfert d'énergie non radiatif du nano-objet vers une espèce sonde placée à sa surface [4, 5]. La reconnaissance de l'analyte induit une modification du spectre d'absorption de cette sonde, par exemple un déplacement des bandes. Or, lorsqu'il y a un recouvrement entre ce spectre d'absorption et le spectre de fluorescence du nanoobjet, il peut y avoir une extinction de la fluorescence par transfert d'énergie. La reconnaissance de l'analyte peut donc conduire soit à une extinction de la fluorescence, comme cela est schématisé figure 1, soit à une augmentation de cette fluorescence, si la

reconnaissance de l'analyte induit une diminution du recouvrement entre le spectre d'absorption de la sonde et le spectre de fluorescence du nano-objet.

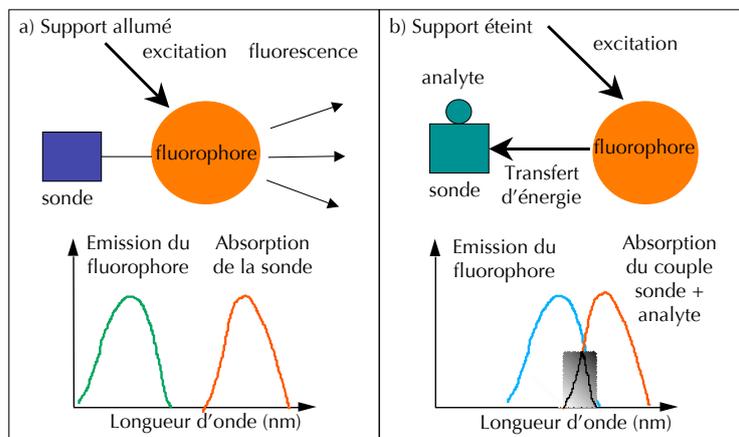


FIG. 1 – Schéma de principe des capteurs développés.

Un capteur d'ions cuivre (II), basé sur ce principe, a été développé par Rachel Méallet-Renault, en collaboration avec l'équipe du Pr. Chantal Larpent de l'Institut Lavoisier (Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines) [4]. Actuellement, le travail de l'équipe s'inscrit dans le cadre de deux projets ANR. Le premier, intitulé BRIO+, a pour maître d'oeuvre la société Genewave, et a pour but de développer des biopuces à ADN. Ces puces permettent de déterminer la séquence d'un brin d'ADN cible, par hybridation avec des brins d'ADN sonde de séquence connue qui sont fixés sur une lame de verre. Cette lame est fonctionnalisée avec des nanocristaux incorporés dans une matrice sol-gel, et l'hybridation entraîne une extinction de la fluorescence des cristaux, car un inhibiteur de la fluorescence est fixé sur l'ADN cible. Le second projet ANR, Capteurs Photomobiles, est piloté par le Pr. Chantal Larpent. Il vise à développer des capteurs à base de nanolatex, dont le déplacement peut être contrôlé au moyen de molécules photochromes. Le travail de notre équipe consiste à développer de nouveaux capteurs qui ont pour cible des ions métalliques ou des sucres.

Dans ce cadre, mon travail de thèse avait pour but d'étudier des dérivés de Bodipy (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène) afin de les incorporer dans des nanocapteurs. Ces fluorophores ont été choisis car ils possèdent des propriétés photophysiques en solution avantageuses : ils ont un rendement quantique de fluorescence élevé ($> 0,7$), leur photostabilité est bonne comparée à celle d'autres fluorophores organiques, les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont situées entre 500 et 600 nm, ce qui permet de les détecter facilement et enfin, à moins qu'ils n'aient été modifiés dans ce but, les propriétés photophysiques de ces molécules varient peu avec les propriétés du solvant [6, 7]. Une vingtaine de molécules ont été étudiées. Certaines ont été synthétisées au laboratoire, d'autres ont été fournies par Gilles Ulrich du laboratoire de Substance naturelles / Chimie Moléculaire de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg (Équipe R. Ziessel), et enfin deux

de ces molécules sont commerciales. Dans un premier temps, les propriétés spectroscopiques de ces molécules en solution ont été déterminées. J'ai ensuite étudié leur fluorescence à l'état solide, pour trouver de nouvelles molécules pouvant servir à préparer des nanocristaux. Enfin, je me suis intéressée à leur propriétés de fluorescence en matrice polymère, soit dans des films minces de PMMA, soit dans des nanolatex, afin de développer un capteur d'ATP (Adénosine Tri Phosphate).

Ce manuscrit est divisé en trois parties. La première présente les concepts utilisés au cours de ma thèse, c'est à dire les processus photophysiques qui gouvernent la fluorescence en solution et dans un solide, ainsi que les propriétés des différents types de nano-objets fluorescents décrits dans la littérature et enfin les propriétés spectroscopiques des dérivés de Bodipy. La seconde partie concerne la fluorescence à l'état solide. Après une description du dispositif d'imagerie de fluorescence et de la méthode utilisée pour étudier les solides, les résultats concernant deux familles de molécules différentes sont présentés. Enfin la troisième partie s'intéresse à la fluorescence de certains dérivés de Bodipy en matrice polymère, soit sous forme de films minces, soit dans des nanolatex . La fluorescence de ces objets a été caractérisée, puis nous avons étudié la possibilité d'éteindre cette fluorescence.

Première partie

Principes

Chapitre 1

Processus photophysiques

L'objectif de ce chapitre est de définir les notions utilisées au cours de cette thèse. Il présente les processus photophysiques qui suivent l'absorption d'un photon pour une molécule en solution mais aussi pour une assemblée de fluorophores. Ce second cas, où la densité de molécules est élevée, correspond aux nano-objets que nous voulons développer.

1.1 Molécule en solution

1.1.1 Niveaux d'énergie d'une molécule

Une molécule peut être décrite par une fonction d'onde ψ , qui correspond à une énergie E [8]. Ces deux grandeurs sont reliées par l'équation de Schrödinger :

$$\mathcal{H}\psi = E\psi \quad (1.1)$$

où \mathcal{H} est le hamiltonien du système. Dans le cadre de l'approximation de Born - Oppenheimer, qui considère que les électrons se déplacent dans le champ fixe des noyaux, la fonction d'onde peut s'écrire comme le produit des fonctions électroniques, vibrationnelles et rotationnelles, et l'énergie totale est la somme des énergies électroniques (E_{el}), vibrationnelles (E_{vib}), et rotationnelles (E_{rot}) :

$$\psi = \psi_{el}\chi_{vib}\psi_{rot} \quad (1.2)$$

$$E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad E_{el} > E_{vib} \gg E_{rot} \quad (1.3)$$

Pour une molécule en phase condensée, l'énergie rotationnelle est négligée devant l'énergie d'interaction avec la cage de solvant. Les niveaux d'énergie accessibles pour une molécule sont schématisés figure 1.1 [8, 9]. Un état électronique est dit *singulet* (S_n) si son spin total est nul ou *triplet* (T_n) si le spin total est égal à 1. Chaque état possède des sous-états vibrationnels ($v = 0, 1, 2 \dots$). À température ambiante, une molécule est dans son état électronique fondamental

S_0 , et l'agitation thermique n'est en général pas suffisante pour peupler les niveaux vibrationnels au delà de $v = 0$.

Les transitions entre ces niveaux d'énergie sont régies par deux règles de sélection [9, 10] :

- Les transitions ont lieu entre niveaux de même multiplicité de spin. Cependant, la probabilité de transition entre un état singulet et un état triplet n'est pas rigoureusement nulle à cause du couplage spin-orbite, qui permet un mélange des deux fonctions d'onde correspondantes.
- Les transitions entre états électroniques ayant la même symétrie sont interdites. Le couplage entre les niveaux électroniques et les niveaux vibrationnels, ou couplage vibronique, permet à la molécule de s'écarter de la symétrie du niveau électronique pur et la transition peut avoir lieu.

Les différents processus suivant l'absorption d'un photon par une molécule sont résumés par le diagramme de Perrin - Jablonski, qui est présenté figure 1.1. Ils sont décrits dans la suite de cette section.

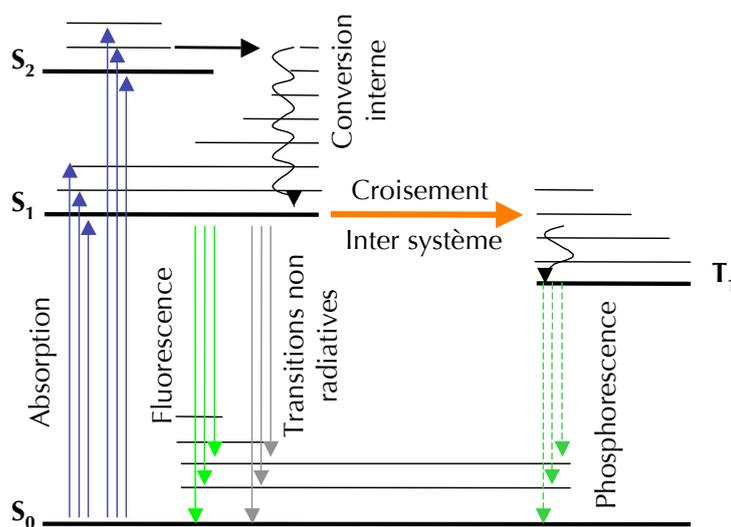


FIG. 1.1 – *Diagramme de Perrin-Jablonski*

Chaque niveau d'énergie correspond à une configuration électronique, c'est à dire au remplissage des orbitales moléculaires par les électrons de valence de la molécule. Une transition entre deux niveaux d'énergie correspond au passage d'un électron d'une orbitale à une autre. Pour les transitions correspondant à des longueurs d'onde UV ou visible, les orbitales moléculaires impliquées sont de type π , π^* et quelquefois n . En particulier, la transition de plus basse énergie, qui conduit à la fluorescence, correspond au passage d'un électron de l'orbitale moléculaire occupée d'énergie la plus élevée (HOMO) à l'orbitale moléculaire vacante d'énergie la plus basse (LUMO).

1.1.2 Absorption de la lumière

L'absorption d'un photon à la longueur d'onde λ est caractérisée par l'absorbance $A(\lambda)$ ou la transmittance $T(\lambda)$;

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right), \quad T(\lambda) = \frac{I}{I_0} \quad (1.4)$$

Où I_0 et I sont les intensités lumineuses à l'entrée et à la sortie du milieu absorbant. La quantité de lumière que peut absorber une molécule à une longueur d'onde λ dépend de son *coefficient d'absorption molaire*, $\epsilon(\lambda)$ (en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$). Cette grandeur est reliée à l'absorbance par la loi de Beer - Lambert :

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) * l * C \quad (1.5)$$

Avec l , la longueur en cm traversée par le faisceau lumineux et C , la concentration de la molécule, en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Si plusieurs molécules absorbantes sont présentes en solution, l'absorbance totale à une longueur d'onde sera la somme des absorbances de chaque molécule à cette longueur d'onde.

La *force d'oscillateur* f permet de quantifier l'intensité d'une transition. Elle est définie par [10] :

$$f = 2303 * \frac{mc_0^2}{N_a \pi e^2 n} \int \epsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} = \frac{4,32 \cdot 10^{-9}}{n} \int \epsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (1.6)$$

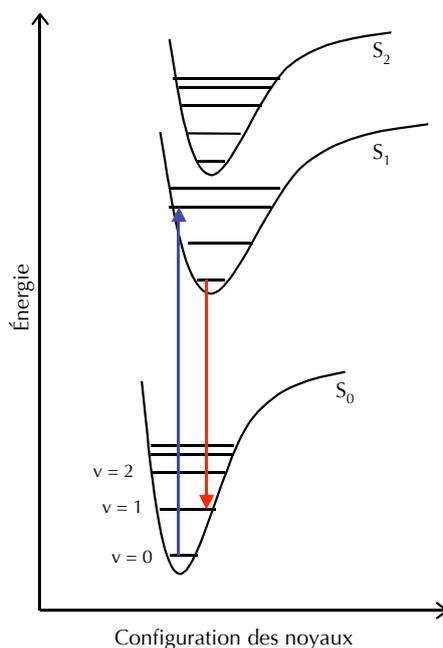
Avec N_a le nombre d'Avogadro, m la masse de l'électron, e sa charge, c_0 la vitesse de la lumière, n l'indice de réfraction du milieu et $\bar{\nu}$ le nombre d'onde en cm^{-1} . L'intégrale est réalisée sur la bande d'absorption. f est un nombre sans dimension et ne peut pas être supérieure à 1. Pour une transition d'un état i vers un état j , f peut être reliée au moment de transition M_{ij} par [10] :

$$f = \frac{8\pi^2 m c_0 \bar{\nu}}{3e^2 h} G M_{ij}^2 = 4,70 \cdot 10^{29} \bar{\nu} G M_{ij}^2 \quad (1.7)$$

Avec h la constante de Planck, $\bar{\nu}$ le nombre d'onde au maximum d'absorption en cm^{-1} , G la dégénérescence de l'état final. Avec cette formule, M_{ij} est en e.s.u. (1 e.s.u. = 10^{-18} Debye).

L'absorption d'un photon UV ou visible induit des transitions entre orbitales π et π^* ou n et π^* . Les transitions $n \rightarrow \pi^*$ sont en général interdites par symétrie. Le coefficient d'absorption molaire et la force d'oscillateur correspondants sont assez faibles ($\epsilon \approx 10^2 - 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ et $f \lesssim 10^{-3}$). Par contre pour une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ permise, on a $\epsilon \approx 10^4 - 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ et f est proche de 1 [9].

Selon le *principe de Franck - Condon*, les noyaux restent immobiles pendant la transition électronique. La figure 1.2 représente les courbes de potentiel des niveaux électroniques d'une molécule en fonction de la distance entre les noyaux [10]. La transition la plus probable a lieu à la verticale, c'est à dire à distance internucléaire fixe. Si la géométrie de l'état excité est proche de celle de l'état fondamental, la transition la plus probable sera la transition $S_0, v = 0 \rightarrow S_1, v = 0$, sinon la transition aura lieu entre les états $S_0, v = 0$ et $S_1, v \neq 0$. Des transitions vers d'autres niveaux vibrationnels de l'état S_1 sont aussi possibles. Une bande d'absorption correspondant à une transition $S_0 \rightarrow S_n$ peut donc présenter plusieurs pics. On parle alors de structure vibrationnelle.

FIG. 1.2 – *Diagramme de Morse*

À température ambiante, la largeur d'une bande d'absorption est due à deux effets [9] :

- La largeur homogène est due à la présence des sous-niveaux vibrationnels qui peuvent former un continuum d'énergie. Il est possible d'observer une structure vibrationnelle si certains de ces modes de vibration ne sont pas actifs. L'élargissement homogène est d'autant plus important que la température est élevée, puisque d'après Boltzman, quand la température augmente, la population des niveaux vibrationnels $v \neq 0$ augmente.
- L'élargissement inhomogène est provoqué par les interactions entre la molécule et son environnement. Les fluctuations de la sphère de solvatation d'une molécule induisent une distribution des énergies de transition électronique et donc un élargissement du spectre.

1.1.3 Processus de désexcitation

Transitions non radiatives La *relaxation vibrationnelle* correspond à une transition entre niveaux vibrationnels d'un même état électronique. L'énergie correspondante est transférée au solvant par collisions. La *conversion interne* est une transition non radiative et isoénergétique entre deux niveaux électroniques de même multiplicité de spin. Après absorption d'un photon, qui a permis de porter la molécule à l'état S_n, v , celle-ci revient à l'état $S_1, v=0$ par relaxation vibrationnelle et conversion interne en 10^{-13} à 10^{-11} s, ce qui est plus rapide que les autres processus photophysiques décrits par la suite. À partir de ce niveau d'énergie, deux processus non radiatifs sont ensuite possibles ; un retour au niveau S_0 par conversion interne ou un *croisement inter-*

système, c'est à dire une transition isoénergétique de l'état S_1 vers l'état T_1 par couplage spin - orbite.

Transitions radiatives La *fluorescence* correspond à une transition radiative entre deux états singulets. L'énergie du photon émis est plus faible que celle du photon qui a induit la transition $S_0 \rightarrow S_1$ (cf figure 1.2). Le spectre de fluorescence est donc décalé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'absorption. La différence entre les maxima de ces deux spectres est le *déplacement de Stokes*. Le spectre de fluorescence est en général symétrique par rapport au spectre d'absorption.

Le retour à l'état fondamental à partir de l'état T_1 par émission d'un photon est appelé *phosphorescence*. Cette transition n'étant possible que par un couplage spin - orbite, la constante radiative correspondante est faible et la durée de vie de l'état excité peut aller jusqu'à plusieurs minutes. Cependant à température ambiante, les transitions non radiatives sont beaucoup plus probables que la transition radiative, et il faut se placer dans des conditions particulières, à très basse température ou dans un milieu rigide, pour pouvoir observer la phosphorescence.

Grandeurs caractéristiques À partir de l'état S_1 , il y a donc trois processus possibles auxquels on associe les constantes de vitesse suivantes :

- k_{ci} , pour la conversion interne.
- k_{cis} , pour le croisement intersystème.
- k_f , pour la fluorescence.

On définit aussi les constantes radiative, $k_r = k_f$ et non radiative, $k_{nr} = k_{ci} + k_{cis}$, et les durées de vie radiative τ_r et non radiative τ_{nr} qui sont égales à l'inverse de ces constantes. L'évolution temporelle de la concentration d'une molécule excitée M^* , est régie par l'équation :

$$-\frac{d[M^*]}{dt} = (k_r + k_{nr}) * [M^*] \quad (1.8)$$

En intégrant cette équation, on obtient :

$$[M^*] = [M^*]_0 \exp(t * (k_r + k_{nr})) = [M^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (1.9)$$

$\tau_s = 1/(k_r + k_{nr})$ est la durée de vie de l'état excité. Quand la transition de fluorescence est permise, ce qui est le cas de la majorité des fluorophores organiques, τ_s est de l'ordre de quelques nanosecondes.

L'émission de fluorescence par une molécule est quantifiée par le rendement quantique de fluorescence, défini comme ;

$$\phi_f = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1.10)$$

Observation expérimentale Il est possible de mesurer expérimentalement certaines grandeurs caractéristiques d'un fluorophore. La fluorescence stationnaire, c'est à dire la fluorescence émise en éclairant de manière continue l'échantillon, est mesurée grâce à un spectrofluorimètre. Il est possible d'enregistrer un spectre d'émission de fluorescence, c'est à dire l'intensité de fluorescence émise en fonction de la longueur d'onde, pour une longueur d'onde d'excitation fixe. Ces spectres ne dépendent pas de la longueur d'onde d'excitation utilisée, car la fluorescence se fait toujours à partir de l'état $S_1, v = 0$. Des spectres d'excitation de fluorescence sont aussi mesurés, il s'agit de la fluorescence à une longueur d'onde d'émission fixée en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Si l'espèce absorbant la lumière est la même que celle qui la réémet, ce spectre a la même forme que le spectre d'absorption. Le rendement quantique de fluorescence d'une molécule est en général évalué en comparant le spectre d'émission à celui d'un fluorophore de référence. Il est aussi possible de mesurer la durée de vie de l'état excité, τ_s . Pour cela, on utilise des techniques de fluorescence résolue en temps, qui sont décrites dans le chapitre 4.

1.1.4 Anisotropie de fluorescence

La probabilité de porter une molécule à l'état excité par absorption d'un photon est proportionnelle à $\cos^2(\theta)$, où θ est l'angle entre la direction du champ électrique de l'onde électromagnétique et le moment de transition de la molécule. Si la lumière utilisée pour l'excitation est polarisée linéairement, il y aura une photosélection des fluorophores, c'est à dire que la lumière ne sera absorbée que par les molécules dont la direction du moment de transition est proche de celle de la polarisation de la lumière. Comme la polarisation de la fluorescence est parallèle au moment de transition, l'émission de fluorescence sera ensuite anisotrope.

L'anisotropie de fluorescence est caractérisée en mesurant la fluorescence émise dans les directions parallèles et perpendiculaires à la polarisation d'excitation, comme illustré figure 1.3.

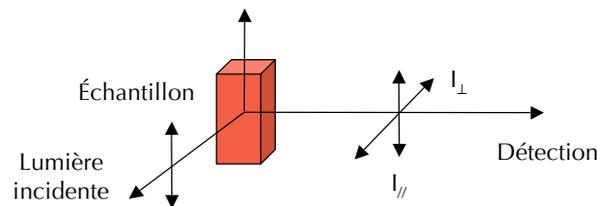


FIG. 1.3 – Principe de la mesure de l'anisotropie de fluorescence

On définit la polarisation p et l'anisotropie r par :

$$p = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}}, \quad r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}, \quad r = \frac{2p}{3 - p} \quad (1.11)$$

Dans la définition de r , le dénominateur est égal à la fluorescence émise dans toutes les directions. Il est possible de mesurer l'anisotropie stationnaire mais aussi son évolution temporelle¹.

Pour une population de molécules immobiles et orientées de manière aléatoire, l'anisotropie stationnaire a pour valeur [9] :

- $r_0 = \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} = 0,4$, si les moments de transition d'excitation et d'émission sont parallèles, où θ est l'angle entre le moment de transition d'excitation et la polarisation de la lumière.
- $r_0 = \frac{2}{5} \frac{3\cos^2\alpha - 1}{2}$, si les moments de transition d'excitation et d'émission ne sont pas parallèles, où α est l'angle entre ces moments de transition. Dans ce cas, l'anisotropie stationnaire varie entre -0,2 et 0,4, selon la valeur de α .

Si la molécule effectue un mouvement de rotation, la polarisation de la fluorescence sera différente de la polarisation de l'excitation et l'anisotropie stationnaire sera inférieure à 0,4. Si l'échelle de temps de la rotation est du même ordre de grandeur que la durée de vie de fluorescence de la molécule, la mesure de l'anisotropie de fluorescence permet de suivre ce mouvement.

1.1.5 Utilisation de la fluorescence pour sonder l'environnement d'une molécule

La fluorescence d'une molécule dépend de son environnement. Lorsque l'émission de lumière dépend des caractéristiques du solvant (polarité, proticité ...), on parle de *solvatochromisme*. Une interaction entre le fluorophore et une autre molécule peut aussi moduler la fluorescence. La détection de la lumière émise par une molécule est donc un outil de choix pour sonder les propriétés d'un milieu ou détecter la présence d'un analyte. Ce paragraphe décrit les différents processus inter- ou intramoléculaires qui induisent une modification de la fluorescence et leur utilisation dans la détection par fluorescence.

En plus des processus intrinsèques de désexcitation décrits dans la section 1.1.3, il existe des processus impliquant une autre molécule. La quantité de lumière émise est donc plus faible en présence de cette molécule, appelée quencheur, qu'en son absence. Ce phénomène est appelé extinction ou quenching² de la fluorescence.

¹En pratique, on introduit un facteur correctif $G = I_{hv}/I_{hh}$, où les indices désignent les polarisations de l'excitation et de l'émission, qui permet de tenir compte de la différence de propagation du signal selon la polarisation. L'anisotropie est alors $r = (I_{vv} - GI_{vh})/(I_{vv} + 2GI_{vh})$.

²Les termes 'Quenching' et 'quencheur' sont des anglicismes, les traductions françaises étant 'inhibition de la fluorescence' et 'inhibiteur de fluorescence', mais ils sont largement utilisés dans le langage scientifique courant, et seront donc utilisés dans ce manuscrit.

L'extinction de la fluorescence peut être due à différents phénomènes :

Rencontre avec une autre molécule Le rapprochement d'un fluorophore à l'état excité et d'un atome lourd ou une espèce paramagnétique induit une augmentation de la probabilité de croisement inter-système. L'énergie d'excitation est alors dissipée sous forme de chaleur. En particulier, le dioxygène dissous quenche la fluorescence des molécules en solution et dans certains cas, il peut être nécessaire d'éliminer l'oxygène du milieu pour observer la fluorescence.

Transfert d'électron Si les potentiels d'oxydoréduction du fluorophore et du quencheur le permettent, il peut y avoir une oxydation ou une réduction du fluorophore à l'état excité et le produit de cette réaction n'est en général pas fluorescent.

Transfert de proton Les propriétés acido-basiques d'une molécule varient quand celle-ci est portée à l'état excité. Dans certains cas, le fluorophore peut perdre ou gagner un proton à l'état excité. En particulier, la fluorescence d'une molécule peut varier en fonction du pH.

Transfert d'énergie Il peut y avoir un transfert de l'énergie d'excitation électronique du fluorophore vers un autre type de molécules. Ce transfert peut être radiatif, c'est à dire qu'il y a émission d'un photon par le donneur qui est réabsorbé par l'accepteur, ou non radiatif, i.e. sans émission d'un photon.

Formation d'exciplexe Un exciplexe est un complexe qui se forme entre le fluorophore à l'état excité et une autre molécule.

Processus homomoléculaire Deux fluorophores de la même nature peuvent interagir. À concentration élevée, il peut y avoir formation d'excimères qui quenchent la fluorescence. L'énergie d'excitation peut aussi migrer de manière radiative, c'est à dire qu'il y a une réabsorption de la fluorescence émise. La migration (aussi appelée homotransfert) non radiative ne modifie pas les propriétés de fluorescence d'une molécule.

Processus intramoléculaire Dans certains cas, le fluorophore est lié à une unité de reconnaissance d'un analyte. La signalisation de l'interaction entre cette unité et l'analyte peut être assurée par la formation ou la disparition d'un excimère, un transfert d'électron, de proton, d'énergie mais aussi de charge.

Indépendamment du mécanisme photophysique, il y a deux types cinétique possibles : le *cas statique* pour lequel le fluorophore excité et le quencheur sont suffisamment proches pour que l'interaction soit significative et le *cas dynamique*, aussi appelé *quenching limité par la diffusion*, où les deux molécules doivent s'approcher l'une de l'autre pendant la durée de vie de l'état excité.

Deux situations peuvent conduire à un quenching statique : soit il y a formation d'un complexe à l'état fondamental qui n'est pas fluorescent, soit le quencheur et le fluorophore restent immobiles pendant la durée de vie de l'état excité. Dans ce second cas, si le quencheur est dans une sphère de volume V_q centrée sur le fluorophore, appelée sphère d'action, la fluorescence est totalement

éteinte. Dans les deux situations, la cinétique de dépeuplement de l'état excité n'est pas modifiée puisque le fluorophore non quenché coexiste avec une espèce non fluorescente. En solution, si le quenching est statique, l'intensité de fluorescence diminue mais la durée de vie de fluorescence n'est pas modifiée.

Dans le cas dynamique, la cinétique de dépeuplement dépend de la concentration de quencheur, et la durée de vie du fluorophore diminue quand cette concentration augmente. La variation de l'intensité en fonction de la concentration de quencher $[Q]$ est décrite par l'équation de *Stern-Volmer* :

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1.12)$$

Pour étudier le quenching de la fluorescence, on utilise le tracé de Stern-Volmer, i.e. I_0/I en fonction de $[Q]$. En solution diluée ce tracé est en général linéaire, même pour un quenching statique. Dans des systèmes plus compliqués, par exemple s'il y a des effets transitoires ou si un quenching statique se superpose à un quenching dynamique, ce n'est plus le cas. L'étude de la fluorescence résolue en temps est complémentaire de l'observation de la fluorescence stationnaire, et elle s'avère indispensable pour caractériser le système fluorophore - quencheur de manière complète.

Un senseur, ou capteur, comporte une partie capable de reconnaître l'analyte et une partie permettant de signaler cette reconnaissance. La fluorescence est un outil de choix pour assurer la signalisation. En effet, l'émission de lumière par une molécule est facilement détectable, même si la concentration est faible, et le dispositif peut être de faible coût. Il est aussi possible de détecter la présence de l'analyte *in situ* ou de le localiser dans l'espace. La reconnaissance de l'analyte provoque une extinction ou une exaltation de la fluorescence du fluorophore. Le second cas est plus favorable, surtout en milieu biologique où il peut y avoir d'autres espèces fluorescentes. Il est possible de relier les variations de l'intensité ou de la durée de vie de fluorescence à la concentration en analyte. La sonde peut être libre en solution ou déposée sur un substrat. Dans les deux cas elle doit avoir une bonne affinité pour l'analyte, c'est à dire que la modulation de la fluorescence est suffisamment importante pour être détectée, mais aussi une bonne sélectivité, c'est à dire que la présence d'autres molécules ne perturbe pas la détection. Une sonde fluorescente peut être utilisée pour le diagnostic médical, l'analyse de produits alimentaires, la détection d'explosifs ou encore la détection de polluants [1].

La modulation de la fluorescence est assurée par les processus bimoléculaires décrits précédemment. De nombreuses sondes fluorescentes ont été développées pour la détection de cations, métalliques ou non [11, 12]. Elles peuvent être composées d'un fluorophore relié à une molécule qui forme un complexe avec un cation, comme par exemple un éther couronne. Un transfert d'électron photoinduit ou un transfert d'énergie entre le fluorophore et l'entité complexante libre, ou entre le fluorophore et le complexe métal - ligand, provoque une extinction de la fluorescence. Dans le premier cas, il y a une exaltation de la fluorescence en présence de l'analyte, et dans le second cas une extinction de la fluorescence. La formation d'excimères ou d'exciplexes est

aussi utilisée dans les senseurs fluorescents [13]. Il existe aussi des senseurs pour la détection de molécules d'intérêt biologique, comme l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate), les bases de l'ADN ou les acides aminés, ou des gaz comme l'oxygène ou le monoxyde d'azote [11]. La détection de sucres est souvent basée sur la complexation entre un acide boronique et le diol du sucre. Les senseurs fluorescents permettent aussi de caractériser les propriétés physiques d'un milieu comme le pH ou la polarité [14].

1.2 Assemblées de fluorophores

La fluorescence peut donc être mise à profit pour détecter des analytes ou les propriétés physiques d'un milieu. Cependant, les phénomènes décrits dans la section précédente concernent des molécules isolées. Or nous souhaitons développer des nano-objets fluorescents pour assurer la fonction de signalisation d'un senseur, et dans ces objets, il existe des interactions entre les fluorophores qui ont une influence sur leur fluorescence. Cette section présente les processus photophysiques qui peuvent se produire dans une assemblée de fluorophores.

1.2.1 Forces d'interaction

Les molécules organiques forment des cristaux moléculaires, c'est à dire que les interactions entre les molécules dans le solide sont des interactions faibles. Les forces d'interaction pouvant intervenir sont les suivantes [15] :

Forces de Van Der Waals Il existe plusieurs types d'interactions :

- Les *forces de dispersion de London* qui sont des forces attractives dues à l'induction d'un dipôle dans une molécule non polaire par une molécule polaire ou par un dipôle instantané dans une molécule non polaire. Elles sont de l'ordre de 0,2 eV par molécule.
- Les *forces de Keesom* qui correspondent aux interactions entre dipôles permanents. Elles sont d'environ 0,5 eV par molécule.
- Les *forces de Debye* dues à des interactions entre une molécule polaire et un dipôle induit. Ces forces évoluent proportionnellement à $1/D^6$, où D est la distance entre deux molécules.

Liaison hydrogène Il s'agit d'une interaction électrostatique entre un atome d'hydrogène lié à un donneur et une région de forte densité électronique autour d'un atome. Les liaisons hydrogène fortes, telle que OH — O ou NH — O, sont de l'ordre de 0,2 à 0,4 eV par molécule. L'intensité des liaisons hydrogène plus faibles varie de 0,02 à 0,2 eV par molécule. Dans une liaison hydrogène, la distance entre les atomes est inférieure à 0,5 nm.

Recouvrement des orbitales π Lorsque la cohésion dans le cristal est assurée par un recouvrement entre les orbitales π des molécules, l'énergie de cohésion est inférieure à 0,4 eV par molécule.

À titre de comparaison, les énergies de liaison pour une liaison ionique et une liaison covalente sont de l'ordre de 10 et 3 eV / molécule.

1.2.2 Transferts d'énergie

L'énergie d'excitation d'un fluorophore peut être transférée à une autre molécule, ce qui induit un quenching de la fluorescence. Dans des assemblées de fluorophores, l'énergie se déplace par transfert d'énergie. Si les deux molécules sont différentes, on parle de transfert d'énergie ou hétérotransfert, et si elles sont de la même nature les termes de migration de l'énergie et d'homotransfert sont utilisés.

Transfert radiatif Dans ce cas, le donneur émet un photon qui est réabsorbé par l'accepteur. Pour qu'un tel processus ait lieu, il faut que le recouvrement du spectre de fluorescence du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur soit non nul, mais aussi que la transition entre les niveaux S_0 et S_1 de l'accepteur soit permise.

Quand il y a un transfert d'énergie radiatif entre deux molécules, le spectre de fluorescence est déformé car l'intensité émise diminue dans la zone de recouvrement des spectres. Pour un hétérotransfert, la durée de vie de fluorescence du donneur n'est pas modifiée mais pour un homotransfert elle peut augmenter [10].

Transfert non radiatif Le transfert d'énergie non radiatif est un processus résonant, c'est à dire qu'il s'agit d'une transition isoénergétique entre des états vibrationnels du donneur excité et de l'accepteur. Il doit aussi y avoir un recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. Plusieurs processus peuvent conduire à un transfert d'énergie non radiatif :

- Une collision entre le donneur et l'accepteur, qui conduit à la formation d'un exciplexe (ou excimère) ou un échange d'électron. Dans ce second cas, un électron passe d'une orbitale LUMO à l'autre et un électron passe d'une orbitale HOMO à l'autre. Ces deux processus nécessitent un recouvrement des orbitales moléculaires c'est à dire que la distance entre le donneur et l'accepteur doit être faible (quelques Å). Par ailleurs le spin doit être conservé au cours du transfert [10].
- Une interaction Coulombienne qui comprend les interactions dipôle-dipôle et les interactions multipolaires. Si les transitions du donneur et de l'accepteur sont permises, ce processus est prédominant et peut se produire lorsque la distance entre le donneur et l'accepteur est grande, jusqu'à 100Å.

Une classification des mécanismes de transfert d'énergie non radiatif a été établie en comparant l'énergie d'interaction entre le donneur et l'accepteur, U , à la largeur de la bande d'absorption,

Δw , à la différence d'énergie entre les états excités du donneur et de l'accepteur ΔE et à la largeur de la bande vibronique $\Delta\epsilon$. Il y a trois cas [9, 16] :

Le couplage fort Si $U \gg \Delta E$ et $U \gg \Delta w, \Delta\epsilon$. Ce cas est décrit par le modèle de Simpson et Peterson [16, 17]. L'approximation de Born-Oppenheimer est valide. L'interaction entre les niveaux d'énergie électronique conduit à un dédoublement du spectre d'absorption, et une modification de sa structure vibrationnelle (cf. paragraphe 1.2.3). À l'état excité, l'énergie est délocalisée sur plusieurs molécules, on parle d'*exciton*. Pour un transfert entre deux molécules, la constante de vitesse est définie comme le temps nécessaire à l'excitation, initialement localisée sur le donneur, pour atteindre une densité maximale sur l'accepteur. Elle s'écrit [9] :

$$k_T \approx \frac{4|U|}{h} \quad (1.13)$$

$$U \propto \frac{|\vec{M}_D||\vec{M}_A|}{r^3} (\cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A) \quad (1.14)$$

Où h est la constante de Planck, \vec{M}_D et \vec{M}_A sont les moments de transition du donneur et de l'accepteur, r est la distance entre ces deux molécules, θ_{DA} , l'angle entre les moments de transition du donneur et de l'accepteur et θ_D et θ_A les angles entre les moments de transition et la direction $D \rightarrow A$. k_T est supérieure à 10^{12} seconde⁻¹.

Le couplage faible Si $U \gg \Delta E$ et $\Delta w \gg U \gg \Delta\epsilon$. Cette distinction est aussi faite dans le cadre du modèle de Simpson et Peterson. L'approximation de Born-Oppenheimer n'est pas valide. L'énergie électronique est localisée mais pas l'énergie vibronique. Il y a un dédoublement des bandes vibroniques qui peut conduire à une variation de l'intensité des bandes du spectres d'absorption sans que leurs positions ne soient significativement modifiées. L'exciton est localisé et se propage pas à pas, c'est à dire en passant d'une molécule à une molécule voisine de manière aléatoire. La constante de transfert est [9] :

$$k_T \approx \frac{4|U|S_{vw}^2}{h} \quad (1.15)$$

S_{vw}^2 est l'intégrale de recouvrement vibrationnel correspondant à la transition entre une molécule dans un état électronique excité à l'état vibrationnel v et une molécule à l'état fondamental dans un état vibrationnel w ($w = 0$ en général). Elle est inférieure à 1. La constante de transfert est proche de 10^{12} seconde⁻¹.

Dans le cas où $U \approx \Delta E$, on parle de *couplage intermédiaire*. La séparation des fonctions d'onde électroniques et vibrationnelles n'est pas possible, mais dans ce cas le dédoublement des bandes vibroniques est du même ordre de grandeur que l'espacement de ces bandes dans la molécule isolée, et la forme du spectre d'absorption est modifiée.

Le couplage très faible Si $U \ll \Delta\epsilon \ll \Delta w$. Ce cas correspond à la théorie développée par Förster. Il n'y a pas de modification des spectres d'absorption. L'excitation se déplace aussi pas à pas. La constante de vitesse est proportionnelle à $1/r^6$, contrairement aux cas précédents où elle est proportionnelle à $1/r^3$ [9] :

$$k_T \approx 4\pi^2 \frac{(|U|S_{vw}^2)^2}{h\Delta\epsilon} \quad (1.16)$$

Dans le cadre du modèle de Förster, la constante de vitesse du transfert k_T est donné par la relation :

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1.17)$$

Avec τ_D la durée de vie de fluorescence du donneur, r la distance entre le donneur et l'accepteur et R_0 le rayon de Förster qui correspond à la distance pour laquelle le transfert de l'énergie d'excitation vers l'accepteur et le retour à l'état fondamental du donneur par fluorescence sont équiprobables. R_0 est donné par la formule [9] :

$$R_0 = 0,2108 \left(\frac{\kappa^2 \Phi_D}{n^4} \int_0^\infty I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right)^{1/6} \quad (1.18)$$

I_D et Φ_D sont l'intensité et le rendement quantique de fluorescence du donneur, ϵ_A est le coefficient d'absorption molaire de l'accepteur et n l'indice de réfraction du solvant. κ^2 est un facteur d'orientation qui est lié à θ_{DA} , θ_D et θ_A par l'équation :

$$\kappa^2 = (\cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (1.19)$$

κ^2 varie entre 0, si les moments de transition sont perpendiculaires, et 4, s'ils sont colinéaires. S'ils sont parallèles, $\kappa^2 = 1$. Si le temps caractéristique de rotation du fluorophore est inférieur à la durée de vie de l'état excité, on est dans le cas dynamique et $\kappa^2 = 2/3$. Enfin dans un milieu rigide où les accepteurs sont orientés et répartis de manière aléatoire par rapport au donneur, $\kappa^2 = 0,476$.

Pour un homotransfert, la forme du spectre de fluorescence et la durée de vie de l'état excité restent inchangées. Par contre, l'anisotropie stationnaire diminue et le déclin d'anisotropie est plus rapide. En effet, si l'énergie d'excitation est transférée à une molécule voisine, la polarisation de la lumière réémise change, et l'anisotropie diminue.

Dans le cas d'un hétérotransfert, un quenching de la fluorescence du donneur est observé. Si cela est possible, la fluorescence de l'accepteur peut être exaltée. Le transfert d'énergie non radiatif est utilisé pour les mesures de FRET (Förster Resonant Energy Transfer), qui permettent d'étudier les interactions entre molécules, notamment en milieu biologique [18].

Si la distance entre toutes les paires donneur - accepteur est la même, le déclin de fluorescence sera monexponentiel, avec une durée de vie τ plus courte. Elle est donnée par la relation :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_D} \left(1 + \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \right) \quad (1.20)$$

Par contre, s'il y a une distribution des distances donneur - accepteur, comme c'est en général le cas dans une assemblée de fluorophores, le déclin n'est plus monoexponentiel. Klafter et Blumen ont montré que dans le cas où la géométrie est restreinte, l'évolution de l'intensité est donnée par la relation [19, 20] :

$$I_D(t, \vec{r}_0) = \exp(-t/\tau_D) * \varphi(t, \vec{r}_0) \quad (1.21)$$

φ est la probabilité de survie du donneur à l'état excité. Ce paramètre dépend de la géométrie du système et de la probabilité de transfert. Dans le cas d'un système infini de dimension d ($d = 1, 2$ ou 3), le déclin de fluorescence du donneur est de la forme [9] :

$$I(t) = I(0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_D} - 2\gamma \left(\frac{t}{\tau_D}\right)^{d/6}\right) \quad (1.22)$$

γ est proportionnel à la concentration d'accepteur dans une sphère de dimension d et de rayon R_0 . S'il y a en plus une migration de l'énergie entre les donneurs, il faut rajouter un terme de diffusion en $\exp(-t)$. Pour un système tridimensionnel le déclin de fluorescence s'écrit [21] :

$$I(t) = I(0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_D} - 4\pi D r_F n_A t - g \frac{4}{3} \pi n_A R_0^3 \left(\frac{t}{\tau_D}\right)^{1/2}\right) \quad (1.23)$$

D est un coefficient de diffusion de l'énergie, r_F est un rayon de piégeage effectif, n_A est la concentration d'accepteur, g est un facteur numérique qui dépend du facteur d'orientation κ et R_0 est le rayon de Förster.

1.2.3 Niveaux d'énergie de l'exciton et absorption de la lumière

Pour un ensemble de N molécules identiques, qui n'interagissent pas entre elles, l'énergie du système après excitation est dégénérée N fois et égale à l'énergie de la molécule isolée. La présence d'interactions, même faibles, fait que l'énergie d'excitation ne peut pas être localisée sur une seule molécule et induit une levée de dégénérescence. Cette réponse collective à l'excitation est appelée un *exciton*. Cet exciton peut se déplacer dans le cristal avant d'être dissipé de manière radiative ou non radiative.

1.2.3.1 Cas de deux molécules

Lorsque deux molécules identiques sont suffisamment proches l'une de l'autre, il peut y avoir une interaction entre leurs électrons et une modification des propriétés spectroscopiques.

On parle alors de :

dimère Si l'interaction a lieu entre deux molécules dans leur état fondamental. Le terme dimère physique est aussi utilisé pour distinguer ce cas d'un dimère 'chimique', où les deux molécules sont liées de manière covalente [8].

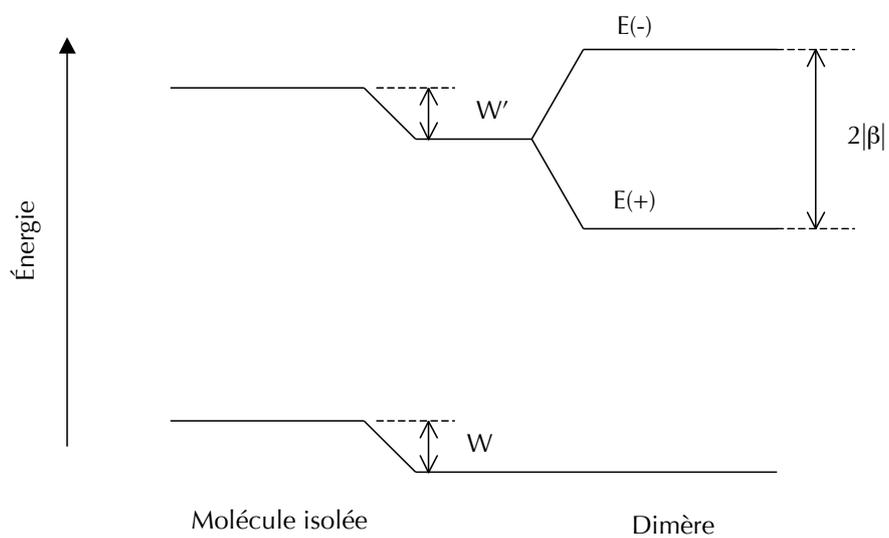


FIG. 1.4 – Niveaux d'énergie de deux molécules en présence d'interactions faibles.

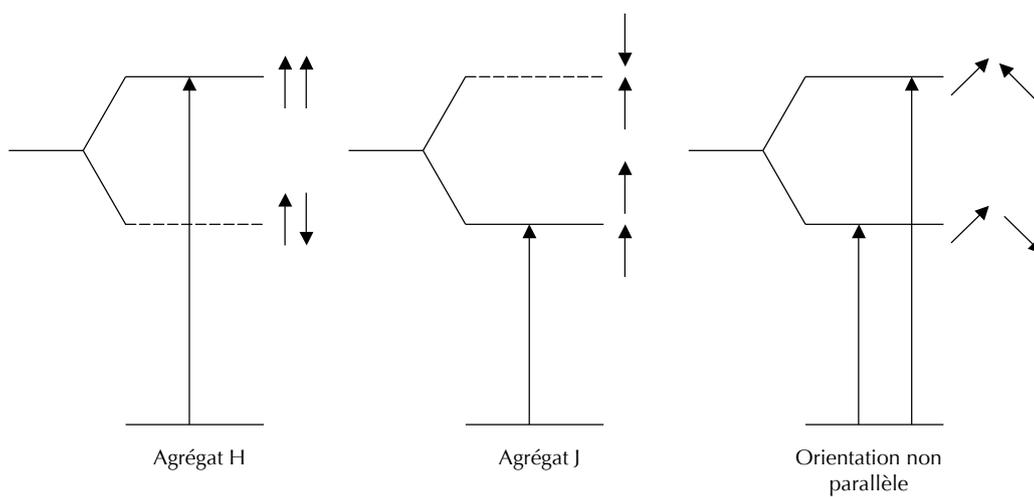


FIG. 1.5 – Transitions possibles dans un dimère en fonction des orientations relatives des molécules.

excimère Si l'interaction a lieu entre une molécule à l'état excité et une molécule à l'état fondamental. Dans les milieux où les mouvements des molécules sont contraints, Birks définit l'excimère comme un dimère qui est associé dans un état électronique excité et qui est dissociatif à l'état fondamental, c'est à dire qu'il se dissocierait sans contrainte externe [22].

La fonction d'onde de l'état fondamental du dimère est approximée par le produit des fonctions d'onde à l'état fondamental des deux molécules, soit [8] :

$$\psi_g = \psi_1 * \psi_2 \quad (1.24)$$

L'énergie correspondante est :

$$E_g = E_1 + E_2 + W = E_1 + E_2 + \langle \psi_1 \psi_2 | V_{12} | \psi_1 \psi_2 \rangle \quad (1.25)$$

où $E_{1/2}$ est l'énergie du monomère, W le terme d'interaction Coulombienne, et V_{12} le terme d'interaction intermoléculaire du Hamiltonien. Pour un dimère, W est positif et pour un excimère W est négatif. Dans la paire excitée, l'énergie électronique oscille de manière cohérente entre les deux molécules et il y a deux états décrits par les fonctions d'onde :

$$\psi_e(\pm) = \frac{1}{\sqrt{2}}(\psi_1^* \psi_2 \pm \psi_1 \psi_2^*) \quad (1.26)$$

Les énergies correspondantes sont

$$E_{\pm} = E_1^* + E_2 + W' \pm \beta = E_1 + E_2 + \langle \psi_1^* \psi_2 | V_{12} | \psi_1^* \psi_2 \rangle \pm \langle \psi_1^* \psi_2 | V_{12} | \psi_1 \psi_2^* \rangle \quad (1.27)$$

W' est l'énergie Coulombienne d'interaction entre ψ_1^* et ψ_2 et β est l'énergie d'interaction résonante. Les niveaux d'énergie du dimère, comparés à ceux de la molécule isolée sont schématisés figure 1.6.

Les transitions de l'état fondamental du dimère vers l'un ou l'autre des états excités sont dictées par le moment de transition :

$$\vec{M} = \frac{1}{\sqrt{2}}(\vec{M}_1 \pm \vec{M}_2) \quad (1.28)$$

où \vec{M}_1 et \vec{M}_2 sont les moments de transition des monomères.

Dans le cas où les directions des moments de transitions sont parallèles, $\theta_{DA} = 0$ et $\theta_D = \theta_A$. Suivant la valeur du facteur d'orientation κ (cf. equation 1.20), il y a deux type d'agrégats (cf figure 1.5) :

- Si $\kappa = 1 - \cos^2\theta > 0$, i.e. $\theta > 56^\circ$, alors c'est la transition vers le niveau d'énergie le plus élevé qui est permise. On parle d'agrégats H. Il y a un déplacement vers le bleu du spectre d'absorption.
- Si $\kappa < 0$, i.e. $\theta < 56^\circ$, alors c'est la transition vers le niveau d'énergie le plus bas qui est permise. On parle d'agrégats J. Un déplacement vers le rouge du spectre d'absorption est observé.

Pour les autres géométries, i.e. $\theta_{DA} \neq 0$, les deux transitions sont permises et on observe un dédoublement de la bande d'absorption. Cependant, c'est en général la transition vers l'état d'énergie la plus élevée qui est la plus intense.

1.2.3.2 Cas de N molécules

Pour N molécules alignées et ayant toutes la même orientation, le raisonnement appliqué au cas de deux molécules est généralisable. L'énergie d'excitation est partagée entre toutes les molécules du cristal et il y a une levée de dégénérescence qui conduit à la formation d'une bande d'énergie comportant N niveaux. L'énergie d'un niveau de la bande excitonique est [8] :

$$E(k) = E_0 + \delta\omega_0 + 2\beta \cos(kd) \quad (1.29)$$

Avec β , l'énergie d'interaction entre proches voisins, $\delta\omega_0$ la différence entre l'énergie de cohésion à l'état fondamental et l'énergie de cohésion à l'état excité, d la distance minimale entre deux molécules voisines et $k = 0, \pm \frac{2\pi}{Nd}, \dots, \pm \frac{\pi}{d}$

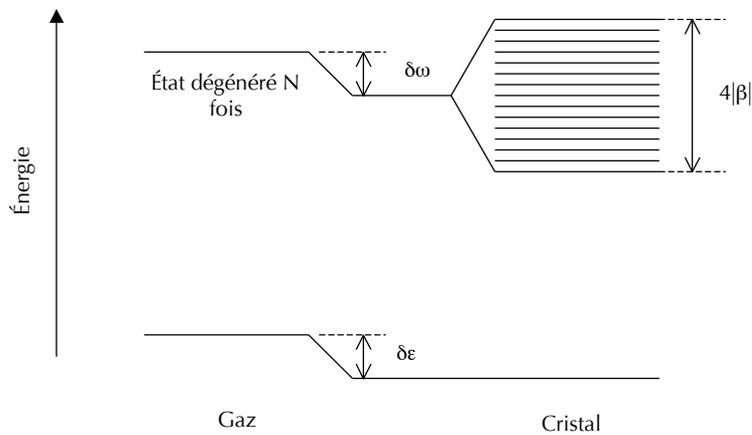


FIG. 1.6 – Niveaux d'énergie de N molécules sans interaction intermoléculaires (à gauche) et en présence d'interactions faibles (à droite).

La transition permise est celle vers l'état $k = 0$. Pour des molécules dont les moments de transition sont parallèles, la notion d'agrégats H et J peut être étendue, avec les mêmes conditions sur la valeur de θ que pour un dimère. Pour un agrégat H, c'est la transition vers l'état d'énergie la plus haute qui est permise, alors que pour un agrégat J, la transition permise est celle vers l'état d'énergie la plus basse.

Pour les structures cristallines plus complexes, plusieurs transitions de l'état fondamental vers la bande excitonique sont permises. Davidov a montré que le nombre de transitions est égal au nombre de molécules non équivalentes dans la maille cristalline.

1.2.4 Fluorescence

L'incorporation d'un fluorophore dans une matrice polymère induit en général une amélioration de ses propriétés de fluorescence, car il est protégé des interactions avec son environnement. Les molécules peuvent être suffisamment proches les unes des autres dans le solide pour qu'il y ait une migration de l'énergie d'excitation par transfert de type Förster. Si la concentration est très élevée, des agrégats peuvent se former et la fluorescence peut être différente [23].

Pour la majorité des molécules fluorescentes, l'agrégation induit une perte de la fluorescence. Dans les structures cristallines, la formation d'exciton fait que le diagramme d'énergie est modifié. Après l'excitation, le système revient à l'énergie la plus basse de la bande excitonique. Or, pour beaucoup de molécules, la transition à partir de ce niveau d'énergie est interdite et le solide n'est donc pas fluorescent. De plus, même si la structure cristalline permet une conservation de la fluorescence, la présence de défauts de structure ou d'impuretés peut éteindre la fluorescence, par piégeage de l'exciton. Pour des structures amorphes, les interactions entre molécules voisines entraînent une augmentation de la probabilité de transition non radiatives et l'excitation peut aussi être piégée par des impuretés ou la formation locale d'excimères.

Quand la molécule est fluorescente à l'état solide, soit le spectre de fluorescence est similaire à celui de la molécule en solution, soit il est différent, ce qui traduit un couplage fort entre les molécules. Dans le premier cas, on parlera de fluorescence du monomère, alors que dans le second on parlera de fluorescence d'un agrégat, qui comporte au moins deux molécules. Par exemple, dans un cristal parfait d'anthracène, l'arrangement des molécules ne permet pas la formation d'un excimère et la fluorescence est celle du monomère, alors que la fluorescence de l'excimère du pyrène est observée dans le solide [22]. L'ajout de substituants adéquats sur un fluorophore peut permettre de contrôler la fluorescence [24]. En particulier, il est possible de limiter les interactions entre les fluorophores en ajoutant des substituants encombrants [25, 26, 27]. La formation d'agrégats J produit des solides fluorescents [28, 29]. Enfin, certaines molécules qui ne sont pas fluorescentes en solution, le deviennent à l'état solide, car la molécule devient plane, ce qui diminue la probabilité de transitions non radiatives [29, 30].

Ce chapitre a présenté les processus photophysiques qui gouvernent la fluorescence des molécules en solution et dans les assemblées de fluorophores. Je vais maintenant m'intéresser aux différents types de nano-objets fluorescents qui existent déjà.

Chapitre 2

Nano-objets fluorescents

Les molécules fluorescentes sont efficaces comme marqueurs et comme senseurs mais présentent des inconvénients [31] : la dépendance des propriétés de fluorescence vis à vis des propriétés du milieu environnant peut être un désavantage, comme par exemple la sensibilité de la fluorescéine au pH, qui limite la gamme dans laquelle cette molécule est utilisable. Les fluorophores organiques ne sont en général pas très photostables et il peut y avoir une diminution de la fluorescence émise à forte concentration par auto-quenching. Le faible déplacement de Stokes de certaines molécules entraîne des contraintes expérimentales, puisqu'il faut éliminer la lumière excitatrice pour pouvoir observer la fluorescence.

Le signal de fluorescence des nano-objets fluorescents est en général plus intense que celui des molécules isolées, et leur utilisation permet de s'affranchir de certains inconvénients des fluorophores organiques. Il y a trois types d'objets :

Les nanoparticules inorganiques Elles sont formées avec des semi-conducteurs, on parle alors de *quantum dots* (QD). Leur taille varie entre quelques nm et environ 20 nm lorsqu'ils sont fonctionnalisés.

Les nanoparticules de silice ou en polymère Elles sont rendues fluorescentes par l'incorporation d'un fluorophore dans la matrice, leur diamètre varie de 20 nm à plusieurs microns.

Les nanoparticules organiques Le diamètre minimal de ces objets est de quelques dizaines de nanomètres.

Ce chapitre présente ces trois types d'objets ainsi que leurs applications. Les nano-objets utilisés au cours de cette thèse, i.e. des nanoparticules organiques en matrice sol-gel et des billes de polystyrène dopées avec un fluorophore, seront décrits de manière plus approfondie dans les chapitres 7 et 9 de ce manuscrit.

2.1 Quantum dots

Les QD sont des particules semi-conductrices de quelques nanomètres de diamètre. Ils sont très largement utilisés, notamment en biologie¹. Les QD les plus utilisés sont composés de Sélénure de Cadmium (CdSe) et recouverts d'une couche de Sulfure de Zinc (ZnS), ce qui permet un rendement quantique de photoluminescence² plus élevé, en limitant les processus non radiatifs à la surface du cristal [32]. Le confinement quantique des électrons dans le cristal permet d'accorder la position du maximum de photoluminescence en fonction de la taille du cristal. La composition du QD permet aussi de modifier cette position. Avec des QD en CdSe / ZnS, dont la taille varie de 2,3 à 5,5 nm, le maximum de photoluminescence varie entre 470 et 625 nm, et avec le couple CdTe / CdSe il passe de 650 à 850 nm, pour des tailles de 4 à 9 nm [31].

L'absorbance d'une suspension de QD augmente presque continûment entre la bande de photoluminescence et les basses longueurs d'onde [31, 32]. Le coefficient d'absorption molaire est plus important que celui des fluorophores organiques (de 10 à 100 ×). Les spectres de photoluminescence sont au contraire très fins avec une largeur à mi-hauteur de quelques dizaines de nm. De plus, le signal est symétrique par rapport au maximum, contrairement à certains fluorophores organiques dont le spectre s'étale vers les grandes longueurs d'onde. Ces propriétés permettent d'utiliser des longueurs d'onde d'excitation et de détection très différentes. Elles sont aussi mises à profit pour la détection multiplexée ; avec une seule longueur d'onde, il est possible d'exciter une population de QD de tailles différentes et la faible largeur des spectres de photoluminescence permet de bien distinguer les signaux venant de chaque type de QD [33]. Les rendements quantiques de photoluminescence sont satisfaisants (entre 0,2 et 0,7) et les durées de vie sont de l'ordre de quelques dizaines de nanosecondes. Les QD ont aussi une photostabilité bien meilleure que celle des fluorophores organiques [31].

La surface des QD peut être fonctionnalisée, ce qui permet de les solubiliser en milieu biologique ou de greffer des molécules à leur surface. Des senseurs fluorescents, ayant pour cible des molécules biologiques, ont été développés, mais le mécanisme conduisant à la modulation de la luminescence est mal compris et les systèmes n'ont pas une meilleure sensibilité que les systèmes déjà existants [31]. Par contre, la possibilité d'avoir plusieurs longueurs d'onde d'émission en parallèle a permis de mettre au point des tests immunologiques performants [31]. Les QD sont aussi utilisés pour la détection d'acides nucléiques [31]. Ils peuvent aussi être le donneur, et dans une moindre mesure l'accepteur, d'énergie dans des expériences de FRET en biologie et dans d'autres domaines [34]. Enfin, les QD peuvent servir de marqueurs pour l'imagerie *in vivo* [35]. En particulier, les QD émettant dans le proche IR permettent d'étudier des tissus profonds sur des souris vivantes. Il

¹ISI web of science recense un peu moins de 20 000 publications comportant le mot clé 'quantum dots', les plus anciennes datant de la fin des années 1980.

²L'émission d'un photon est due à une transition entre la bande de conduction et la bande de valence du semi-conducteur, ce qui correspond à des processus photophysiques différents de ceux présentés dans la section 1. Le terme photoluminescence est donc préféré à celui de fluorescence.

est cependant nécessaire de prendre en compte la toxicité de ces objets, en particulier pour la dernière application. S'il n'est pas lui-même toxique, et s'il est stable, le revêtement entourant le cristal semi-conducteur limite la cytotoxicité en empêchant le relargage d'ions lourds. Par contre, le devenir des QD dans les organismes vivants est mal connu [35].

Les QD sont donc des nano-objets luminescents qui peuvent être plus intéressants que des molécules organiques, mais l'émission de lumière n'est pas due au même phénomène physique que pour les fluorophores. Des nanoparticules métalliques (d'or ou d'argent) sont aussi utilisées en biologie, mais elles ne sont pas luminescentes. Les méthodes optiques de détection utilisent l'existence d'une bande plasmon et mesurent la lumière absorbée, diffusée ou le signal Raman [36].

Il est aussi possible d'optimiser la fluorescence des molécules organiques en les incorporant dans des matrices solides, en silice ou polymérique. Et, même si l'agrégation induit en général une extinction de la fluorescence, il existe des nanoparticules organiques fluorescentes.

2.2 Fluorescence dans une matrice solide

Cette matrice est un polymère organique, en général du polystyrène, ou en silice. Dans les deux cas, les techniques de synthèse ne permettent pas d'obtenir des particules de moins de 10 nm de diamètre. Les nanoparticules organiques, sont synthétisées par polymérisation en microémulsion (cf chapitre 9) et les particules de silice sont obtenues par une méthode adaptée du procédé Stöber [37, 38] ou dans une émulsion inverse (eau dans huile) [39, 40]. Il est possible d'obtenir des objets monodisperses en taille. Un fluorophore organique est incorporé dans la matrice, de manière covalente ou par imprégnation.

L'intérêt de ces objets est que la fluorescence est plus intense que pour les fluorophores isolés, puisqu'on concentre les molécules tout en limitant les interactions intermoléculaires grâce à la matrice. Certaines voies de désexcitation non radiative peuvent aussi être bloquées par la matrice, et une augmentation du rendement quantique de fluorescence et de la durée de vie par rapport au fluorophore en solution sont en général observées [39, 41]. La matrice protège aussi le colorant du photoblanchiment, notamment en empêchant le contact avec du dioxygène et la photostabilité des nanoparticules fluorescentes est souvent meilleure que celle du fluorophore isolé [39, 41, 42]. Des nanoparticules de silice ayant une stabilité comparable à celle des QD ont été obtenues [43]. Il est possible de fabriquer des objets fluorescents dans toute la gamme visible, en changeant le fluorophore mais aussi en incorporant plusieurs fluorophores différents dans une même particule. Il y a un transfert d'énergie entre les fluorophores et à partir d'une seule longueur d'onde d'excitation, on obtient des particules émettant à différentes longueurs d'onde en modulant la nature des fluorophores et leurs proportions relatives [37, 44]. Comme pour les QD, il est donc possible de faire des systèmes multiplexés. Enfin, la matrice peut comporter des groupements réactifs qui permettent une post-fonctionnalisation des nanoparticules. Les fonctionnalités qui peuvent être greffées sont beaucoup plus nombreuses que pour des QDs [31].

Il y a cependant des différences entre les billes polymériques et les particules de silice, qui sont dues essentiellement à la nature de la matrice : le polystyrène est hydrophobe alors que la silice est hydrophile. Les fluorophores utilisés ont donc des propriétés différentes ; dans le premier cas, les fluorophores doivent être hydrophobes et ils peuvent être imprégnés dans la matrice polymère. Ces particules étant ensuite utilisés en milieu aqueux³, le colorant reste piégé dans la matrice. Dans les nanoparticules de silice, le fluorophore est hydrophile et les problèmes de fuite du colorant sont plus critiques. Pour limiter ces fuites, des fluorophores encombrés ou des précurseurs fluorescents ont été utilisés [40, 45]. De plus, pour la porosité de la silice étant assez importante, la fluorescence des molécules proches de la surface est plus sensible à l'environnement de la bille que celle des molécules du coeur [38]. Il est possible de limiter cet effet en recouvrant la nanoparticule d'une couche de silice non dopée [42].

Les particules de polystyrène fluorescentes sont largement utilisées, notamment en biologie (cf chapitre 9). Cependant, le diamètre des particules les plus utilisées est plutôt de l'ordre du micron. Les particules de silice fluorescentes sont moins répandues et elles ne sont pas disponibles dans le commerce⁴. Elles ont été utilisées pour la détection d'objets biologiques [36]. Des nanoparticules de silice contenant de la tétraméthylrhodamine (TMR) ont été utilisées pour signaler l'hybridation de brin d'ADN [3]. Le signal est 10^4 fois plus intense qu'en marquant l'ADN avec seulement de la TMR et la limite de détection est de $0,8 \text{ femtomol.L}^{-1}$. Il a aussi été montré que des nanoparticules de silice dopées avec du tris(2'-bipyridyl)dichlororuthénium(II)hexahydrate (Rubpy) peuvent être utilisées dans des tests immunologiques, des puces à ADN ou pour détecter des protéines avec une augmentation de la sensibilité par rapport aux méthodes classiques [43].

Les nanoparticules fluorescentes peuvent aussi être utilisées comme senseurs. L'existence de deux populations de fluorophores permet de faire des senseurs ratiométriques. Ainsi, un système où de l'acide coumarine-3-carboxylique (CCA) est greffé sur des particules de polyacrylamide dopées avec du Texas Red permet de détecter le radical hydroxyde [46]. Le CCA réagit avec ce radical pour former l'acide 7-hydroxy-coumarine-3-carboxylique qui est très fluorescent. La fluorescence du Texas Red n'est pas modifiée en présence d' OH^\bullet , puisque la molécule est à l'intérieur de la matrice polymère. Le suivi du rapport de la fluorescence des deux molécules permet de mesurer la quantité d' OH^\bullet présente dans le milieu tout en s'affranchissant des variations des paramètres expérimentaux. Des senseurs ratiométriques peuvent aussi être conçus avec un seul fluorophore dont la fluorescence est constante au coeur de la bille mais modulable près de la surface [38, 47]. La sensibilité du capteur peut encore être améliorée s'il existe un effet coopératif entre les fluorophores, c'est à dire si une migration de l'énergie d'excitation amplifie l'extinction de la fluorescence. Cet effet est mis en évidence par des mesures d'anisotropie de fluorescence : le transfert d'énergie entre molécules voisines et orientées aléatoirement induit une dépolarisation de la fluorescence et

³On parle alors de nanolatex (NL)

⁴Plusieurs compagnies de biotechnologie commercialisent des particules de polystyrène fluorescentes dont le diamètre minimal est de 20 nm, mais elles ne semblent pas vendre de particules de silice fluorescentes, même de diamètre plus important.

l'anisotropie des nanoparticules sera faible. L'homotransfert permet d'amplifier le quenching de la fluorescence. Ce phénomène a été utilisé pour réaliser deux senseurs de Cu^{2+} , l'un à partir de nanolatex fonctionnalisés par des cyclames et dopés avec du mésitylbodipy [4, 48], l'autre à partir de billes de silice contenant du dansylamide et du picolineamide, qui forme un complexe avec les ions cuivre (II) [49].

2.3 Nanocristaux moléculaires

Bien que les nanoparticules formées à partir de molécules organiques soient beaucoup moins répandues que les nanoparticules inorganiques, ces objets rencontrent un certain intérêt. La majorité des recherches menées sont consacrées à leur préparation et à la compréhension de la luminescence observée, puisque les propriétés d'un nano-objet sont intermédiaires entre celles de la molécule isolée et du solide massif [50]. Des nanoparticules organiques fluorescentes sont décrites dans la littérature, principalement pour des applications en optoélectronique, c'est à dire la préparation de matériaux électroluminescents pour fabriquer des diodes ou des afficheurs, ou l'incorporation dans des cellules photovoltaïques [30, 51, 52]. Les propriétés en optique non linéaire, i.e. la génération de second harmonique et la fluorescence induite par absorption à deux photons, de particules de CMONS (1-cyano-1(4-nitrophényl)-2-(4-méthoxyphényl)éthène) [53], mais aussi les propriétés photocatalytiques de particules de tétracène [54] ont été étudiées. La possibilité d'utiliser ces particules comme senseurs fluorescents a aussi été démontrée. L'équipe du professeur Park a montré que la fluorescence de nanoparticules de 1-cyano-*trans*-1,2-bis-(4'-méthylbiphényl)éthylène (CN-MBE), déposées sur une surface, pouvait être éteinte de manière réversible par des vapeurs de dichlorométhane [28]. Des nanoparticules d'acide 1-pyrènebutyrique peuvent être utilisées pour mesurer la concentration d'une protéine, la gamma-globuline, dans le sérum sanguin [198]. Enfin, l'équipe de Robert Pansu, en collaboration avec l'équipe d'Alain Ibanez du département Matière condensée, matériaux et fonctions de l'Institut Néel de Grenoble étudie des nanoparticules organiques en matrice sol-gel. Dans le cadre de ce travail, il a été montré que la fluorescence de nanocristaux de rubrène et de tétracène peut être quenchée par transfert d'énergie [55].

L'objectif de ce paragraphe est de décrire les différentes voies de préparation ainsi que les propriétés particulières induites par la taille des particules. La fluorescence des cristaux moléculaires sera abordée de manière plus approfondie dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Les techniques de préparation de nanoparticules organiques sont les suivantes :

La re-précipitation C'est la méthode la plus répandue [30, 54, 56, 57, 58, 59]. Elle consiste à dissoudre la molécule dans un solvant organique soluble dans l'eau, puis à injecter un petit volume de cette solution, qui est en général saturée, dans un grand volume d'eau. Le solvant se dissout dans l'eau et cela entraîne une aggrégation des molécules organiques. Il est possible

d'obtenir une suspension de nanocristaux dans l'eau, mais il est en général nécessaire de raffiner la technique pour obtenir une suspension colloïdale stable. La reprecipitation peut être effectuée en homogénéisant la solution par sonication [57], plutôt que par agitation mécanique, ou en présence de tensio-actif [56], ce qui stabilise les cristaux. Suzanne Fery-Forgues (IMRCP - Toulouse) a utilisé des dendrimères, des polymères ou de l'ADN pour contrôler la reprecipitation du 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD) [59, 60, 61, 62]. Suivant le composé utilisé, la cinétique de reprecipitation change et surtout la forme des cristaux est différente. La température peut aussi être utilisée pour contrôler la taille des particules [63]. Des nano-objets amorphes ou cristallins peuvent être obtenus, et dans ce second cas il est possible de former des objets non sphériques, par exemple des bâtonnets [58].

L'ablation laser Cette méthode consiste à former les particules, non pas en assemblant des molécules, mais en divisant un cristal plus gros en lui apportant une quantité importante d'énergie avec un laser pulsé. Elle est couramment utilisée pour former des nanoparticules inorganiques [64] et a été adaptée à la préparation de nanoparticules organiques [65, 66].

La cristallisation en matrice sol-gel Le procédé sol-gel permet de préparer un gel de silice par hydrolyse et condensation d'une solution d'alkoxyde de silicium (cf. chapitre 7). En ajoutant une molécule organique dans la solution de départ, il est possible d'obtenir des nanoparticules dispersées dans le gel final. Le colorant, dissous dans un solvant organique, est introduit dans le sol au moment de l'hydrolyse et le solide peut être formé soit dans une cuve [29, 67] soit en étant déposé sur une lamelle de microscope par spin-coating [5]. Le diamètre des nanoparticules obtenues est compris entre quelques dizaines de nanomètres et un micron.

La cristallisation sur support solide Il est aussi possible de former directement des nanoparticules sur un substrat solide, par sublimation [68] ou en déposant une goutte de solution contenant le fluorophore sur une lamelle de verre [52].

Les propriétés optiques des nanoparticules organiques, i.e. la position des maxima d'absorption et de fluorescence et le rendement quantique, peuvent varier avec la taille des particules [51, 58, 63, 69, 70, 71]. Contrairement aux nanoparticules semi-conductrices, où l'exciton est délocalisé sur toute la particule, ces variations ne peuvent pas être dues à un confinement quantique de l'exciton, puisque celui-ci ne se déplace que sur quelques molécules dans un cristal moléculaire. Fu et Yao ont étudié des nanoparticules préparées avec des dérivés de pyrazoline et montrent que la variation des propriétés observées est due à une augmentation des interactions entre les molécules [51, 63]. Lorsque la taille diminue, il y a un ramollissement du réseau car le rapport surface / volume augmente, et les interactions Coulombiennes sont moins fortes. Patra *et al.* ont supposé que, pour les objets de petite taille, seules les interactions les plus fortes existent et que les interactions plus faibles apparaissent quand les particules grandissent. Ce modèle a été appliqué à un dérivé de diamino-dicyano-quinone-diméthane [70]. Pour des particules cylindriques de pyrène, la fluorescence de la bande de l'excimère augmente avec la longueur de la particule [58]. Ici aussi, l'évolution des propriétés photophysiques avec la taille est expliquée par le fait que l'arrangement des molécules

est meilleur quand la taille des cristaux augmente. La morphologie du cristal peut aussi modifier les propriétés de fluorescence des particules, comme cela a été observé pour des nanoparticules d'un dérivé de pérylène diimide [69]. Deux populations de tailles différentes ont été obtenues. L'une a une fluorescence de monomère et l'autre une fluorescence d'excimère. La différence peut-être due à l'existence de deux formes cristallines pour ce type de molécules, ou la formation de particules amorphes et de particules cristallines. Pour des hydrocarbures aromatiques, l'existence de deux centres fluorescents a été montrée ; il s'agit des molécules du centre de la particule et de celles situées près de la surface [71]. Le rapport des fluorescences varie avec la taille des particules.

Il est donc possible de former des nanoparticules organiques qui ont des propriétés de fluorescence intermédiaires entre la molécule isolée et le cristal massif. Bien que les mécanismes gouvernant l'évolution de la fluorescence en fonction de la taille ne soient pas complètement compris, ce sont des nano-objets fluorescents prometteurs.

Nous avons choisi de développer des senseurs fluorescents contenant des nano-objets. Pendant ma thèse, je me suis intéressée à des molécules de type Bodipy (4,4)-difluoro-4-bora-3a,4a-diazas-indacène. Le chapitre qui suit présente les propriétés spectroscopiques des molécules de cette famille ainsi que les fluorophores que j'ai étudiés.

Chapitre 3

Les dérivés de Bodipy

Les Bodipy sont des dérivés du 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène. Le terme Pyrrométhène (PM), pour les colorants laser, et l'appellation Dipyrrométhène de Bore¹ sont aussi utilisés. Dans la littérature, c'est le nom de Bodipy qui est le plus répandu. La structure du Bodipy est représentée figure 3.1.

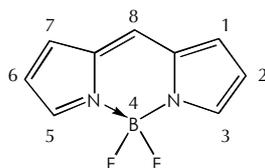


FIG. 3.1 – Structure du 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène

Les Bodipy absorbent la lumière visible ($\lambda_{abs}^{max} \approx 500$ nm) et leurs coefficients d'absorption molaire sont élevés, (de 5 à $9 \cdot 10^4$ $\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$). Ils sont fluorescents; les longueurs d'onde d'émission varient entre 500 et 700 nanomètres et, dans la plupart des cas, le rendement quantique de fluorescence est élevé ($>0,7$). Ils sont utilisés principalement pour le marquage en milieu biologique, comme colorants laser et comme senseurs fluorescents, notamment pour la détection de cations. Sauf fonctionnalisation spécifique, leurs propriétés photophysiques dépendent peu de l'environnement de la molécule. Ces fluorophores sont stables et résistent bien au photoblanchiment. Cette famille de molécules a donc des propriétés photophysiques intéressantes et elle est étudiée depuis plusieurs années au PPSM, en particulier par Rachel Méallet-Renault. Ce chapitre aborde les méthodes de synthèse des Bodipy, leurs propriétés photophysiques ainsi que quelques exemples d'utilisation. Les propriétés photophysiques en solution des molécules utilisées au cours de cette thèse sont aussi évoquées. Ce chapitre finit par une présentation de la fluorescence des agrégats de Bodipy.

¹Boron dipyrromethene en anglais

3.1 Synthèse

La première synthèse de Dipyrrométhène de Bore a été publiée en 1968 par Treibs et Kreuzer [72], quelques molécules ont été publiées dans la décennie 1970 et les brevets protégeant les molécules commercialisées par Molecular Probes et Exciton ont été déposés à la fin des années 1980 [73, 74, 75]. La synthèse de nouveaux dérivés de Bodipy rencontre un intérêt croissant depuis le début des années 2000.

Il y a deux voies de synthèse [76] :

- Deux pyrroles sont condensés avec un aldéhyde en milieu acide, ce qui permet de former le dipyrrométhane, qui est ensuite oxydé en dipyrrométhène par de la DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone). Le Bodipy est formé en ajoutant de l'éther de trifluorure de Bore, en milieu basique, dans le mélange réactionnel. Cette synthèse est réalisée sans isolation des produits intermédiaires. La structure de ceux-ci est présentée figure 3.3.
- Il est aussi possible de former directement le sel chloré du dipyrrométhène à partir du pyrrole et d'un chlorure d'acyle. Cet intermédiaire peut être isolé. Le Bodipy est aussi formé à partir de l'éther de trifluorure de Bore en présence d'un excès de base.

La purification du Bodipy obtenu est ensuite adaptée à la molécule synthétisée. Le fluorophore est en général isolé du mélange réactionnel par chromatographie sur colonne de silice et dans certains cas recristallisé.

Il y a trois possibilités pour ajouter un groupe fonctionnel sur le noyau Bodipy :

- Il peut être greffé en position 8 (cf. figure 3.1), c'est à dire que le Bodipy est formé à partir de l'aldéhyde ou du chlorure d'acyle fonctionnalisé. Il existe des Bodipy fonctionnalisés en position 8 par des entités complexantes de cations ou sensibles au pH, ce qui permet de réaliser des senseurs fluorescents [77]. L'ajout de groupements polymérisables sur cette position a permis de préparer des analogues du colorant laser PM567 qui peuvent être incorporés dans une matrice polymère et être utilisés pour préparer des laser solides [6]. La fonctionnalisation des autres atomes de carbone du cycle doit être faite sur le pyrrole de départ. L'ajout d'une fonction réactive sur un pyrrole étant moins aisé que la préparation d'un aldéhyde, c'est souvent la position 8 qui est privilégiée pour la fonctionnalisation et le Bodipy est construit à partir du cryptopyrrole (2,4-diméthyl-3-éthyl-pyrrole) ou du 2,4-diméthyl-pyrrole.
- Il existe des Bodipy commerciaux portant des groupes fonctionnels ou réactifs sur les carbones du cycle différents du carbone C₈. En particulier, dans les phospholipides marqués par un Bodipy, la chaîne lipidique est en général fixée sur le carbone C₃ du fluorophore [78]. L'utilisation d'un pyrrole modifié peut aussi être indispensable pour obtenir les propriétés désirées, notamment pour déplacer vers le rouge les positions des maxima d'absorption et d'émission du Bodipy. Certains Bodipy utilisés dans cette thèse portent des substituants encombrants, synthétisés à partir de pyrroles préparés grâce à la réaction de Trofimov [79].

- Les fluors liés à l'atome de Bore peuvent aussi être remplacés par un autre groupement. Cette chimie a été développée récemment dans l'équipe de Raymond Ziessel (Strasbourg), au cours de la thèse de Christine Goze [80, 81]. Le Bodipy est d'abord synthétisé, puis les atomes de fluor sont remplacés par des carbones. Des molécules où le Bore est lié à des oxygènes ont aussi été préparées [82, 83].

Au cours de cette thèse, dix-huit Bodipy ont été étudiés, de manière plus ou moins approfondie. Deux de ces molécules sont commerciales, le PM567 et le PM597, douze ont été synthétisées à Strasbourg par Gilles Ulrich et Christine Goze à partir du cryptopyrrole. Ces molécules seront donc désignées par le terme cryptobodipy dans la suite de ce manuscrit. Enfin 4 ont été synthétisées au PPSM. Il s'agit du TriMésitylBodipy (TMB) et de trois ParacyclophanylBodipy (pcp - BDY). La structure de ces quatre dernières molécules est présentée figure 3.2.

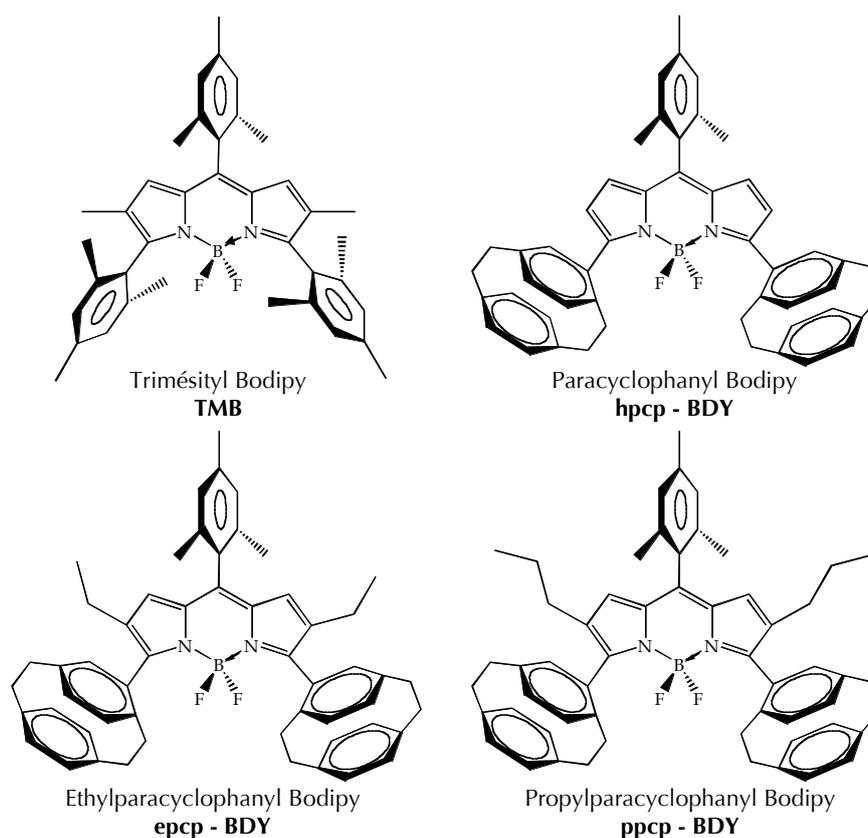


FIG. 3.2 – Structures chimiques des Bodipy encombrés

Ce travail s'inclut dans une collaboration plus large avec l'équipe du Professeur Trofimov de l'Institut de Chimie d'Irkoustk en Russie. La synthèse des pyrroles correspondants a été réalisée dans ce laboratoire [79, 84] et celle des Bodipy par Cécile Dumas - Verdes et Elena Senotrusova au PPSM. Les pyrroles ont été condensés avec le mésitylaldéhyde. Les étapes de la synthèse sont

résumées figure 3.3.

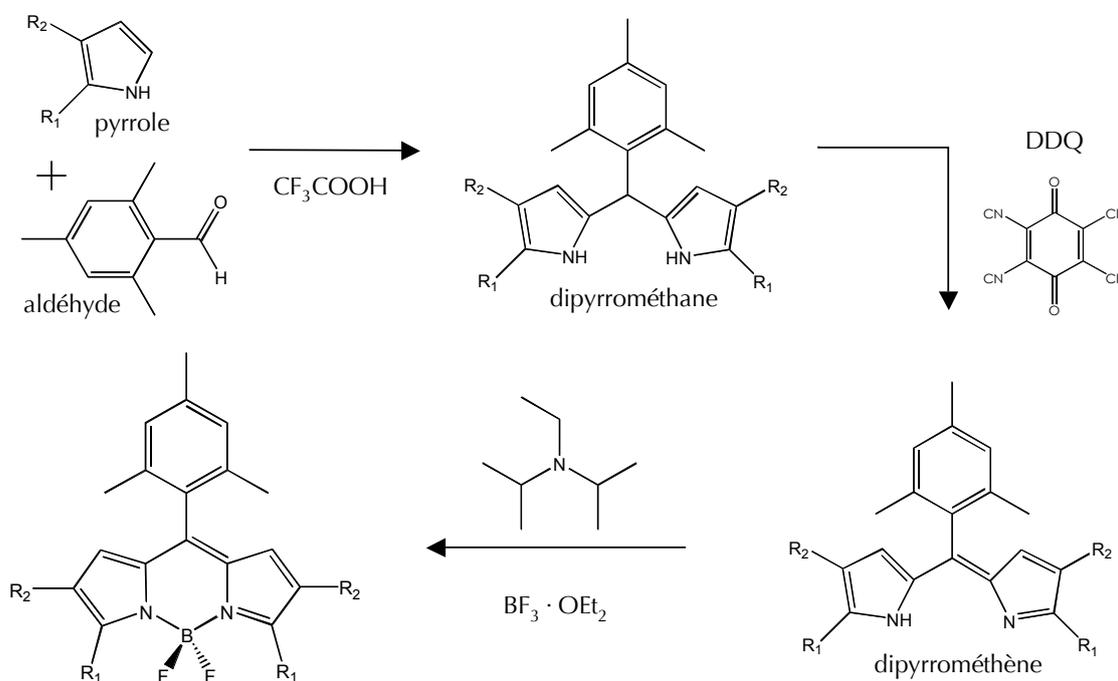


FIG. 3.3 – Principe de la synthèse des Bodipy réalisée au PPSM

Le TMB a été purifié par chromatographie flash sur colonne de silice (solvant : CH₂Cl₂ / Éther de pétrole 1 :3). Le rendement de la réaction était de 45% [79, 85]. La structure cristallographique de cette molécule a été résolue par le Pr. Isabelle Gautier - Luneau (Institut Néel - département MCMF - Grenoble).

Deux synthèses de pcp - BDY ont été réalisées. La purification du produit final est compliquée car pour chaque molécule deux diastéréoisomères sont formés. Comme le montre la figure 3.4, lorsqu'un paracyclophane est placé sur le noyau bodipy, qui est plan, il y a deux possibilités non équivalentes dans l'espace de placer le second. Lors de la synthèse, deux isomères, qui sont séparables par chromatographie, sont obtenus. À l'issue de la première synthèse, les Bodipy ont été séparés par chromatographie préparative sur plaques de silice (solvant éther de pétrole / CH₂Cl₂), car la quantité de pyrrole de départ était faible. Il n'a pu être obtenu que quelques milligrammes de chaque fraction. Lors de la deuxième synthèse, une quantité plus importante de produit a été obtenue mais il n'a pas été possible de séparer de manière satisfaisante les deux fractions, que ce soit par chromatographie sur plaques de silice préparatives ou sur colonne. La pureté des produits obtenus à l'issue des deux synthèses n'est pas très bonne, et chaque fraction contient un mélange des deux isomères. Elles peuvent aussi contenir un troisième produit qui semble être le Bodipy hydrolysé au niveau du Bore.

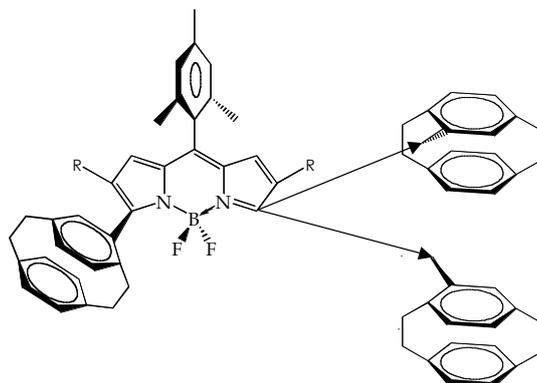


FIG. 3.4 – Possibilités de placer le second paracyclophane par rapport au plan contenant le cycle Bodipy. Il y a deux options qui conduisent à la formation de diastéréoisomères ; soit les deux paracyclophanes sont du même côté par rapport à ce plan, soit ils sont répartis de part et d'autre.

3.2 Propriétés Photophysiques

Le pyrrométhène est une molécule de la famille des merrocyanines. Un équilibre tautomérique entre les deux azotes fait que la molécule est plane mais favorise les voies de déséxcitation non radiatives. Ces molécules ne sont donc en général pas fluorescentes [2]. Au contraire, le noyau Bodipy non substitué, formé par complexation avec le BF_2 est une cyanine et cette molécules est très fluorescente ($\Phi_F > 0,7$).

Processus photophysiques Les propriétés photophysiques des molécules de la série des PM ont été largement étudiées au département de Chimie Physique de l'Université du Pays Basque à Bilbao [6]. Des calculs théoriques ainsi que des mesures spectroscopiques dans un grand nombre de solvants ont été réalisés. La figure 3.5 présente les densités électroniques de l'orbitale occupée la plus haute en énergie (HOMO) et de l'orbitale vacante la plus basse en énergie (LUMO) ainsi que les formes résonantes du PM546 (le Bodipy comportant un méthyl en position C_8). Le moment dipolaire est orienté selon l'axe court de la molécule (l'axe $B - C_8$) et il est plus élevé à l'état fondamental qu'à l'état excité. La molécule est globalement neutre mais elle possède une charge négative localisée sur le Bore et une charge positive délocalisée sur les atomes qui forment le système π .

Le spectre d'absorption des Bodipy présente une bande autour de 500 nm qui correspond à la transition $S_0 \rightarrow S_1$. Cette transition est permise par symétrie et le coefficient d'absorption molaire est de 5 à $9 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$. Le moment de transition correspondant est orienté selon l'axe long de la molécule (l'axe $C_2 - C_6$). Cette bande comporte un rebond vibrationnel qui est dû aux vibrations du squelette C - H hors du plan de la molécule. Une deuxième bande d'intensité

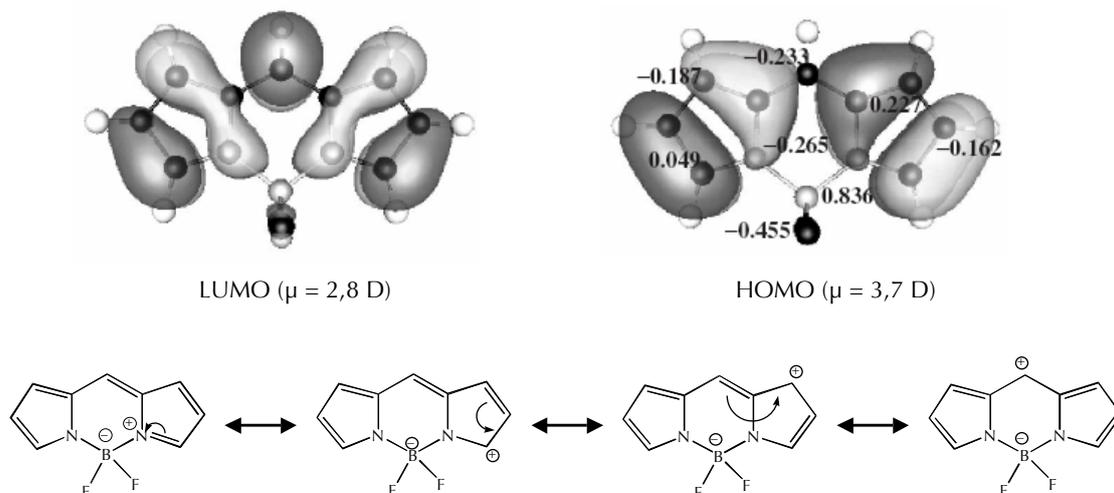


FIG. 3.5 – En haut : orbitale occupée de plus haute énergie (HOMO) et orbitale vacante la plus basse en énergie (LUMO), du PM546. En bas : répartition des charges. (d'après [6])

beaucoup plus faible, correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_2$, est observée vers 350 nm. Le spectre de fluorescence est symétrique du spectre d'absorption et le déplacement de Stokes est en général faible (500 cm^{-1}) car les géométries de l'état excité et de l'état fondamental sont proches. Le rendement quantique de fluorescence est élevé ($> 0,7$). Le déclin de fluorescence en solution peut être ajusté par une fonction monoexponentielle et la durée de vie est de l'ordre de 6 à 7 ns.

Le peuplement de l'état T_1 est peu probable que ce soit à partir d'un état triplet d'énergie plus élevé ou par croisement intersystème. Cette propriété fait que les Bodipy sont de bons colorants laser. Il a été montré que pour le PM567, la probabilité de croisement intersystème est augmentée en présence d'oxygène [86]. Les dérivés de Bodipy ont aussi été utilisés comme colorants dans des expériences faisant intervenir l'absorption à deux photons [87, 88]. Dans la plupart des cas, ces molécules ne se dégradent pas lorsqu'elles sont irradiées. La stabilité des Bodipy de Molecular Probes est comparable à celle de la Rhodamine 6G et meilleure que celle de la Fluorescéine [41].

Influence des substituants L'ajout d'un substituant aromatique en position 8 du Bodipy ne modifie pas la position des maxima d'absorption et de fluorescence, car le plan de ce groupement aromatique forme un angle avec celui du Bodipy, ce qui empêche la conjugaison. Par contre, dans le cas où la rotation de ce groupement est libre, celle-ci induit une augmentation des processus non radiatifs et une diminution du rendement quantique. Si la rotation est gênée, par exemple par la présence de méthyles sur les carbones du noyau Bodipy, le rendement quantique et la durée de vie sont similaires à ceux des Bodipy non substitués [89].

Il y a plusieurs façons d'induire un déplacement vers les grandes longueurs d'onde de la fluorescence des Bodipy (cf figure 3.6) ; des groupements styryls ont été ajoutés en position 3 et / ou en position 5. Les molécules obtenues émettent autour de 610 ou 680 nm [90, 91, 92]. Il est possible d'induire une conjugaison entre un substituant aromatique et le noyau Bodipy en forçant ces deux groupements à être dans le même plan par encombrement stérique ou cyclisation. La conjugaison avec un phényle permet d'obtenir des molécules émettant à plus de 620 nm avec un rendement quantique satisfaisant [93]. Une autre stratégie consiste à utiliser un dérivé d'isoindeole, plutôt qu'un pyrrole, pour former le complexe bore - diindométhène correspondant. Le maximum de fluorescence de cette molécule est de l'ordre de 600 nm [94, 95]. À partir de ces molécules, la substitution des positions 3 et 5 par des groupements anisole ou éthylthiophène permet de déplacer encore la fluorescence vers les grandes longueurs d'onde, au delà de 700 nm [7]. Enfin, les aza-Bodipy, pour lesquels le carbone C₈ est remplacé par un azote, émettent dans le proche infra-rouge, jusqu'à 800 nm [96].

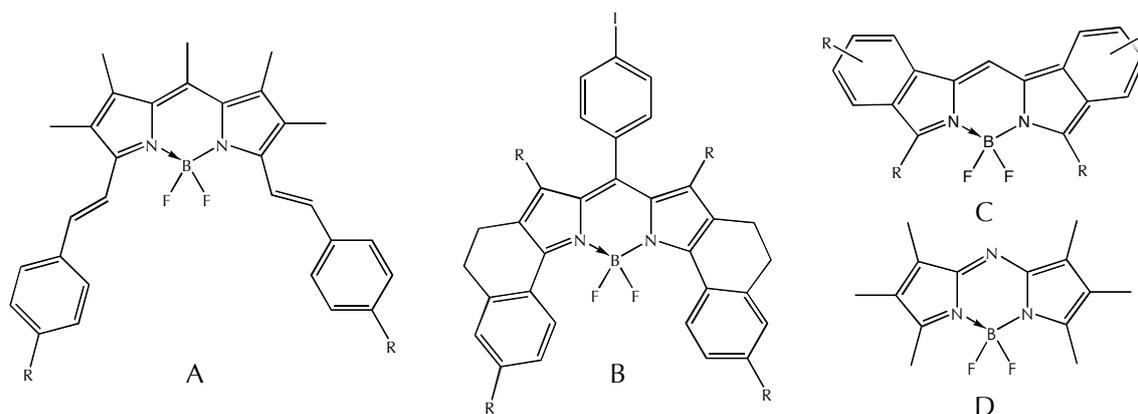


FIG. 3.6 – Dérivés de Bodipy émettant au delà de 600 nm ; A : Bodipy fonctionnalisé par un styryle ; B : Blocage de la rotation du phényle qui permet une conjugaison entre les deux systèmes π ; C : Boron diindométhène ; D : Azabodipy

Solvatochromisme Les positions des maxima d'absorption et de fluorescence varient peu (10 nm au maximum) avec la nature du solvant utilisé [6]. Les variations observées sont cohérentes avec la diminution du moment dipolaire lors de l'excitation prévue par les calculs théoriques ; un déplacement vers le bleu est observé lorsque la polarité et la polarisabilité du solvant augmentent. Lorsque la basicité du solvant augmente, les spectres se déplacent vers le bleu alors que l'acidité n'a presque aucun effet sur la position des maxima. Cette faible sensibilité de la fluorescence des Bodipy à leur environnement permet de conserver ces propriétés lors d'un marquage biologique ou de l'incorporation dans une matrice polymère.

Cependant la fonctionnalisation par certains groupements permet de rendre un Bodipy sensible à son environnement. En effet, si un substituant accepteur ou donneur d'électrons est greffé sur le noyau Bodipy, alors il peut y avoir formation d'un état excité à transfert de charge (CT) [6, 77]. L'énergie de cet état CT est très sensible à la polarité du solvant. Des études photophysiques montrent que l'état à transfert de charge est formé à partir de l'état localement excité (LE) par un processus rapide [77]. Le spectre d'absorption est donc similaire à celui des Bodipy, mais la bande de fluorescence est déplacée vers les grandes longueurs d'onde. Le retour à l'état fondamental à partir de l'état CT est interdit par symétrie et la bande CT, quand elle existe, est de faible intensité. La formation d'un état CT conduit donc à l'extinction de la fluorescence de la molécule, mais l'émission peut être modulée en modifiant le caractère donneur (ou accepteur) des substituants.

Les dérivés de Bodipy sont donc des fluorophores qui absorbent la lumière visible, qui ont des sections efficaces d'absorption et des rendements quantiques élevés et qui résistent en général bien au photoblanchiment. Les propriétés de fluorescence du noyau Bodipy sont peu sensibles à son environnement et il est possible de les modifier en ajoutant des substituants adéquats. En particulier, les maxima d'absorption et de fluorescence peuvent être déplacés vers les grandes longueurs d'onde, ce qui est une propriété recherchée pour des applications en biologie. La fluorescence de ces molécule peut aussi être modulée par la présence d'un groupement donneur ou accepteur d'électrons.

3.3 Exemples d'utilisation des Bodipy

Cette section présente quelques applications pour lesquelles les Bodipy sont fréquemment utilisés.

Colorants laser Les molécules de la série des PM sont de bons colorants laser [6]. Ces molécules ont été incorporées dans des matrices polymères, ce qui permet de concevoir des lasers à colorant solides. Il est possible de relier l'efficacité du laser à la structure de la molécule et à son environnement.

Nanolatex fluorescents Les Bodipy sont utilisés pour préparer des nanolatex fluorescents, i.e. des suspensions colloïdales de particules de polystyrène dans lesquelles le fluorophore est incorporé au coeur de la matrice [41, 4]. Les propriétés de ces objets sont détaillées dans la troisième partie de ce manuscrit.

Senseurs fluorescents Le quenching de la fluorescence des Bodipy en présence d'un groupement accepteur ou donneur d'électron est utilisé pour concevoir des senseurs fluorescents. Si le caractère donneur ou accepteur du groupement lié au Bodipy est modulé par une espèce ou une propriété physico-chimique, alors il peut y avoir une exaltation ou un quenching de la fluorescence

importants. De telles molécules sont utilisées comme sonde de pH [97] ou de polarité [14], pour la détection de monoxyde d'azote [98], ou de cations [77, 91, 99, 100, 101, 102]. En modulant les propriétés du substituant, on peut moduler la sensibilité du Bodipy. Ainsi, en plaçant différents dérivés de phénol ou de naphthol en position 8, on obtient des sondes de pH de pK_a variable [97]. De la même manière, Sunahara *et al.* [14] ont préparé une bibliothèque de molécules pour lesquelles la fluorescence est allumée ou éteinte selon la polarité du solvant. Le seuil dépend du substituant. Ces molécules ont été utilisées pour évaluer la polarité à la surface d'une protéine ou dans la membrane d'une cellule vivante. Les senseurs de cations réalisés à partir du noyau Bodipy ont en général une bonne sélectivité pour la cible. Elle est due à la spécificité du substituant pour le cation. Les entités complexantes sont souvent des molécules cages type éther couronne [77, 91], où les oxygènes peuvent être substitués par des azotes, ou calixarène [99] ; le groupement 8-hydroxyquinoline a aussi été utilisé [100, 101]. Les molécules cibles sont, entre autres, les ions Calcium, Potassium, Zinc, Mercure et Cuivre. Selon les cas, la complexation avec le métal induit l'apparition de la fluorescence, ce qui est facile à détecter, ou l'apparition d'une nouvelle bande de fluorescence, ce qui permet de faire un senseur ratiométrique.

Marqueurs membranaires Des molécules présentes dans la membrane cellulaire ont été marquées par des Bodipy [103]. Il s'agit de phospholipides, d'acides gras, de triglycérides, de glycolipides ou de cholestérol. Le caractère hydrophobe du noyau Bodipy permet une bonne incorporation des molécules modifiées dans les vésicules lipidiques [104] et les membranes cellulaires. Pour ces études, il est indispensable que le greffage d'un fluorophore sur une molécule ne modifie pas le comportement de cette dernière dans la membrane afin que les résultats obtenus soient significatifs. Par ailleurs, à forte concentration, les noyaux Bodipy interagissent pour former des excimères, ce qui permet d'étudier la concentration des phospholipides dans une membrane [78]. Ces molécules servent à étudier la répartition des molécules dans les membranes [105] mais aussi à suivre l'évolution de vésicules dans une cellule après l'endocytose [106].

Utilisation de l'extinction de la fluorescence La fluorescence des Bodipy peut être quenchée, soit par une autre espèce soit par formation d'agrégats non fluorescents. Si le fluorophore est éloigné de son quencheur, alors la fluorescence est restaurée. Ce processus est utilisé en biologie pour mettre en évidence la toxine du choléra [107], pour étudier l'incorporation d'un virus dans une cellule [108], pour suivre l'activité enzymatique [109, 110, 111] ou pour mettre en évidence la fin d'un cycle de PCR² [112]. Les études sont réalisées *ex-vivo* ou directement dans des cellules vivantes.

²La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode qui permet de répliquer une séquence d'ADN et d'obtenir un grand nombre de copies (10^6) en quelques heures.

3.4 Présentation des Bodipy utilisés au cours de cette thèse

Cette section rassemble les propriétés spectroscopiques dans le dichlorométhane des molécules utilisées au cours de ma thèse. Elles sont réparties en trois groupes : les molécules synthétisées au PPSM, les Bodipy commerciaux, le PM567 et le PM597 de la société Exciton, et enfin les cryptobodipy qui ont été fournis par Gilles Ulrich. Les propriétés de fluorescence à l'état solide de toutes ces molécules ont été explorées afin de trouver des fluorophores pouvant être utilisés pour préparer des nanocristaux. Les molécules synthétisées à Cachan portent des groupements encombrants, ce qui pourrait limiter les interactions entre fluorophores à l'état solide [25]. Nous avons aussi cherché à relier l'organisation des molécules dans le solide à la fluorescence observée. Pour cela nous avons utilisé des molécules dont la structure cristallographique est connue, i.e. certains cryptobodipy et le TMB. Le TMB, le PM567, le PM597 et l' IP-BDY ont aussi été incorporés dans des films minces de PMMA et des nanolatex.

Les propriétés spectroscopiques de ces molécules sont rassemblées table 3.3, à la fin de cette section. Les valeurs mesurées sont cohérentes avec les valeurs publiées pour des molécules de la même famille ; le coefficient d'absorption molaire est élevé ($7.10^4 < \epsilon < 9.10^4 \text{ cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}.\text{L}$) et correspond à une force d'oscillateur de l'ordre de 0,3. Les durées de vie radiatives ont été calculées à partir des forces d'oscillateur et des positions du maximum d'absorption avec la formule $1/\tau_r = \bar{\nu}^2 * f$. Elles varient de 7,5 à 10 ns. Les rendements quantiques de fluorescence sont élevés ($\phi > 0,5$). Les déclin de fluorescence peuvent être ajustés avec une fonction monoexponentielle et les durées de vie de l'état excité varient entre 4,5 et 9 ns.

3.4.1 TMB et pcp-BDY

Les spectres d'absorption, d'émission et d'excitation de fluorescence du TMB dans le dichlorométhane sont présentés figure 3.7. Ils sont caractéristiques des Bodipy. Le maximum d'absorption à 543 nm correspond à la transition $S_0 \rightarrow S_1$. La seconde transition autour de 350 nm correspond à la transition $S_0 \rightarrow S_2$. Les spectres d'absorption et de fluorescence sont symétriques avec un déplacement de Stokes faible. Les spectres d'absorption et d'excitation de fluorescence sont superposés. Le déplacement vers le rouge des maxima d'absorption et de fluorescence par rapport au Bodipy non substitué peut être attribué à un effet inductif des mésityles. D'après la structure cristallographique (cf figure 3.9), ces groupements sont perpendiculaires au plan du noyau Bodipy, il n'y a donc pas de conjugaison entre le noyau benzénique des mésityles et le système π du Bodipy.

Le rendement quantique de fluorescence du TMB est proche de 1, ce qui peut s'expliquer par la rigidification du noyau Bodipy due aux groupements mésityles qui sont perpendiculaires au plan du noyau. En effet, il a été démontré que pour des Bodipy possédant des groupements aromatiques sur les pyrroles, le rendement quantique est meilleur quand la rotation de ces groupements est contrainte [113]. Ainsi, un bodipy portant des phényles en positions 3 et 5 a un rendement quantique relativement faible (0,2 dans CHCl_3), ce qui est attribué à une désactivation non radiative

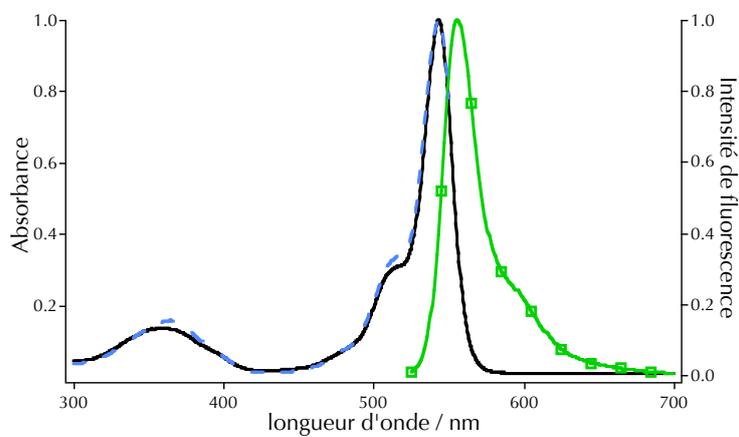


FIG. 3.7 – Spectres d'absorption (—), de fluorescence (□) et d'excitation de fluorescence (- -) du trimésitylbodipy dans le dichlorométhane.

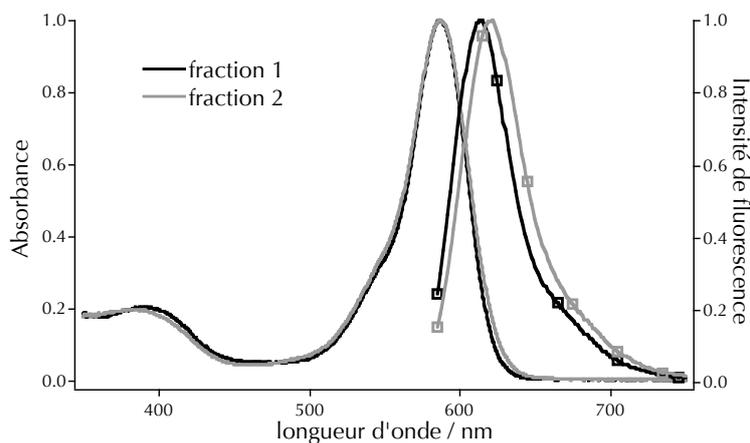


FIG. 3.8 – Spectres d'absorption (—), et de fluorescence (□) des deux fraction du epcp-BDY dans le dichlorométhane.

importante due à la rotation du phényle autour de l'axe C - phényle. Par contre, si la rotation du groupement aryle est bloquée par encombrement stérique ou par la formation d'une liaison avec le Bore, alors le rendement quantique est plus important. Dans le cas du TMB, la structure cristallographique montre que les trois groupements mésityles sont perpendiculaires au plan du noyau bodipy. Ceci est dû à l'encombrement stérique des méthyles. Ces groupements empêchent aussi la rotation du noyau benzénique autour de l'axe C - phényle. La fonctionnalisation du Bodipy par des groupements mésityles a donc permis d'améliorer le rendement quantique.

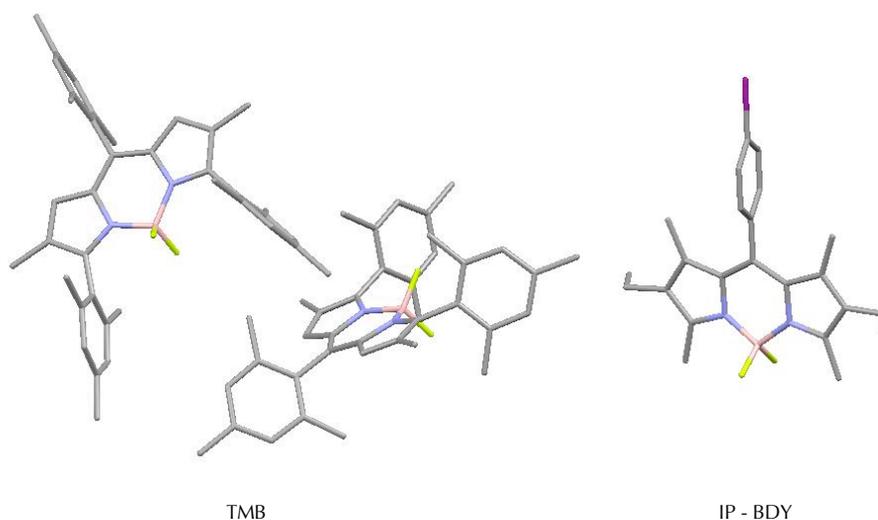


FIG. 3.9 – Structures du TMB et de l'IP-BDY, obtenues par cristallographie. Pour le TMB, il y a deux molécules de géométries légèrement différentes par maille.

La forme des spectres des pcp-BDY est similaire à ceux du TMB, le rebond vibrationnel de la transition de plus basse énergie étant cependant moins marqué (cf figure 3.8). Les maxima d'absorption sont déplacés vers le rouge par rapport au TMB, probablement à cause d'une conjugaison entre le noyau dipyrrométhène et le benzène du paracyclophane. Pour chaque type de molécule, les spectres d'absorption des deux fractions isolées sont superposés mais il y a une différence de 5 nm entre les maxima de fluorescence. Les valeurs des maxima des spectres et les durées de vie sont rassemblées table 3.1. Bien que correspondant au mélange des deux fractions, les données mesurées en 2007 sont cohérentes avec les premières mesures. Pour le ppcp-BDY, il a été possible d'obtenir deux fractions comportant majoritairement l'un des isomères. Les positions des maxima de fluorescence sont proches de celles mesurées en 2005 (614 nm pour la fraction 1 et 620 nm pour la fraction 2).

	$\lambda_{abs}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	$\lambda_{exc}(nm)$	ϕ_F	$\tau(ns)$
synthèse 1 (2005)					
pcp-BDY f1	550	592	549	0,8	5,47
pcp-BDY f2	551	600	550	0,8	5,52
epcp-BDY f1	588	615	589		6,27
epcp-BDY f2	588	622	587		6,38
ppcp-BDY f1	589	616	589		6,20
ppcp-BDY f2	589	622	587		6,42
synthèse 2 (2007)					
epcp-BDY	589	618		0,87	6,47
ppcp-BDY	589	619		0,86	6,37

TAB. 3.1 – Propriétés spectroscopiques des pcp-BDY dans le dichlorométhane. λ_{abs} : maximum du spectre d'absorption, λ_{em} : maximum du spectre d'émission de fluorescence, λ_{exc} : maximum du spectre d'excitation de fluorescence, ϕ_F : rendement quantique de fluorescence, τ : durée de vie de l'état excité.

3.4.2 Bodipy commerciaux

Au cours de cette thèse deux Bodipy commercialisés par Exciton ont été utilisés, le PM567 et le PM597. Ces molécules sont vendues comme colorants laser. Elles ont été largement étudiées par le groupe de F. Lopez-Arbeloa du département de Chimie Physique de l'Université du Pays Basque (Espagne) [6]. La structure des deux molécules est présentée figure 3.10.

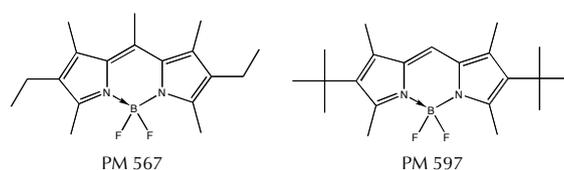


FIG. 3.10 – Structures chimiques du PM567 et du PM597

Les spectres d'absorption et de fluorescence dans le dichlorométhane, mesurés au PPSM, sont présentés figure 3.11. Les valeurs correspondantes sont rassemblées table 3.3. Elles sont en accord avec les valeurs déjà publiées. Ces spectres sont déplacés vers les basses énergies par rapport au Bodipy non substitué. Ceci est attribué à un effet inductif des groupements alkyles. De plus le PM597 a un déplacement de Stokes plus important, 40 nm au lieu de 10 à 15 nm pour les autres Bodipy, et un rendement quantique plus faible par rapport au PM567. Ceci est dû à la géométrie de la molécule. L'encombrement stérique des groupements tert-butyles provoque une diminution de la planéité de la molécule à l'état excité, ce qui augmente les possibilités de transition non radiative par conversion interne et implique un déplacement vers le rouge du spectre de fluorescence.

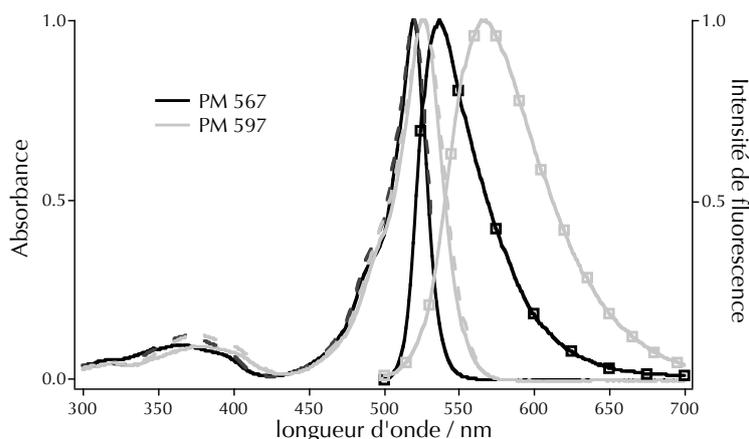


FIG. 3.11 – Spectres d'absorption (—), de fluorescence (□) et d'excitation de fluorescence (- -) du PM 567 et du PM 597 dans le dichlorométhane.

3.4.3 Cryptobodipy

Douze molécules synthétisées dans l'équipe de Raymond Ziessel (Strasbourg) ont été étudiées. Leurs structures sont présentées figure 3.12. Nous avons reçu deux séries de molécules : les molécules BDY-1 à BDY-5 dont la structure cristallographique est disponible et les molécules BDY-A à BDY-E et l'IP-BDY. Il s'agit de molécules synthétisées dans le cadre de la thèse de Christine Goze, soutenue en octobre 2005 [80]. Certaines de ces molécules portent des groupements alkyles sur le Bore. Cette section rassemble les principaux résultats concernant la fluorescence en solution de ces molécules.

3.4.3.1 Iodophényl-bodipy - IP-BDY

Cette molécule possède un groupement para-iodophényle en position 8. Sa synthèse a été publiée par plusieurs groupes [113]. Le protocole est celui décrit précédemment. Il s'agit en général d'un intermédiaire de synthèse, l'iode servant à greffer un autre groupement sur la molécule par substitution.

Ses propriétés spectroscopiques en solution ont déjà été publiées [113]. Les spectres d'absorption et de fluorescence sont présentés figure 3.13. Par rapport au Bodipy possédant seulement un méthyle en position 8, le PM 567, les maxima d'absorption et de fluorescence sont peu déplacés, ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'interaction entre le phényle et le noyau Bodipy. Ceci a déjà été observé dans la littérature et vient du fait que les méthyles en position 1 et 7 bloquent le noyau benzénique hors du plan du Bodipy. La structure cristallographique, réalisée à Grenoble, montre qu'il y a un angle de 76° entre le phényle et le plan du Bodipy. Par contre, le rendement quantique de l'IP-BDY est plus faible que celui du PM 567. Comme les durées de vie radiatives de ces

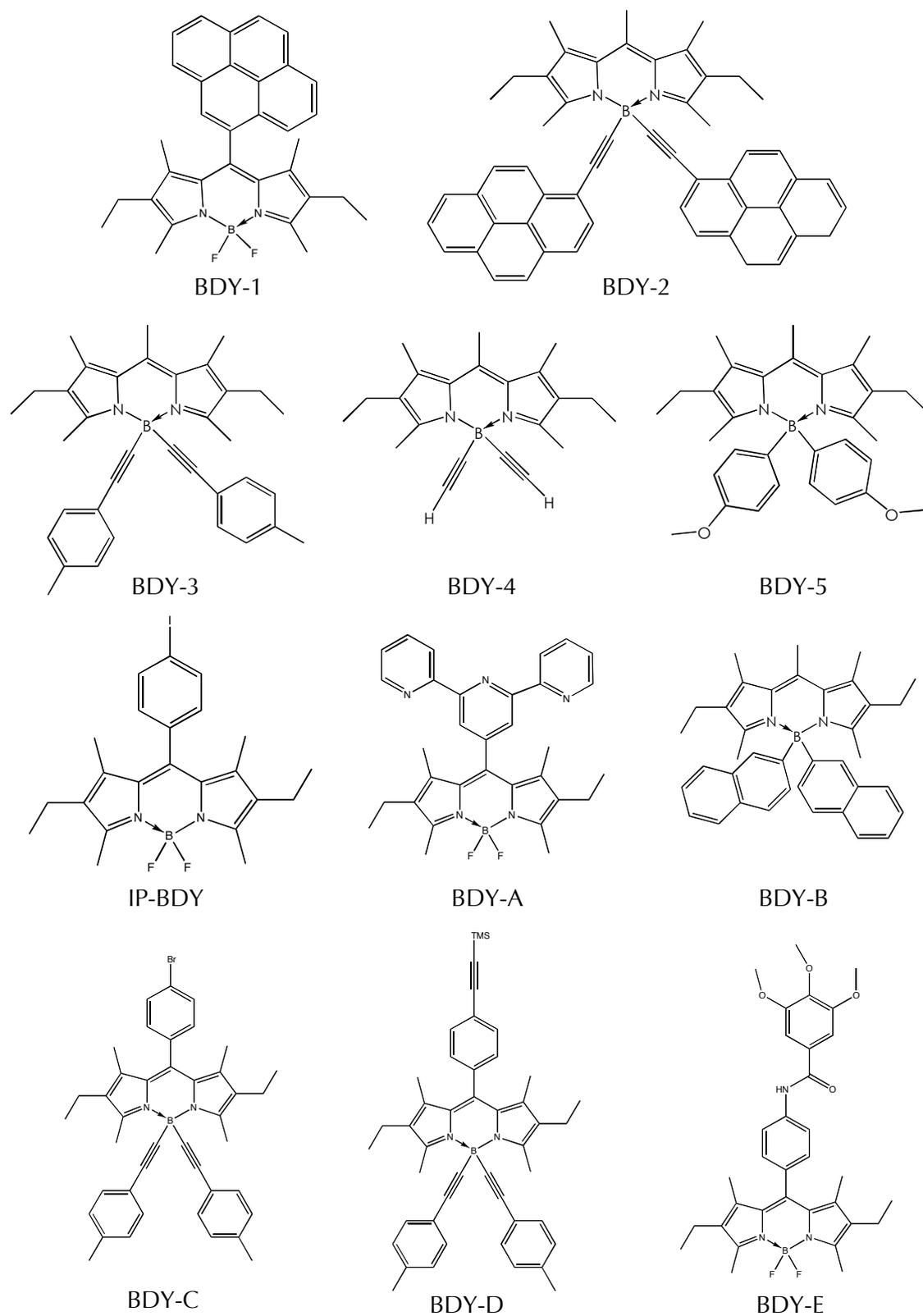


FIG. 3.12 – Structures chimique des Bodipy synthétisés à Strasbourg

deux molécules sont similaires, cela traduit une augmentation des transitions non radiatives, qui pourrait être due à un croisement intersystème induit par l'iode, c'est à dire à une extinction de la fluorescence par effet d'atome lourd [9]. Les données spectroscopiques publiées et celles mesurées dans le dichlorométhane pour cette molécule sont rassemblées table 3.2.

Solvant	$\lambda_{abs}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	$\lambda_{exc}(nm)$	$\varepsilon(cm^{-1}.mol^{-1}.L)$	ϕ	$\tau(ns)$
Ethanol	528	541		75 800	0,75	5,0
Chloroforme	524	537		75 900	0,78	4,8
Dichlorométhane	527	541	527	75 000	0,65	4,85

TAB. 3.2 – Propriétés spectroscopiques de l'IP-BDY dans différents solvants. λ_{abs} : maximum du spectre d'absorption, λ_{em} : maximum du spectre d'émission de fluorescence, λ_{exc} : maximum du spectre d'excitation de fluorescence, ϕ_F : rendement quantique de fluorescence, ε : coefficient d'extinction molaire, τ : durée de vie de l'état excité.

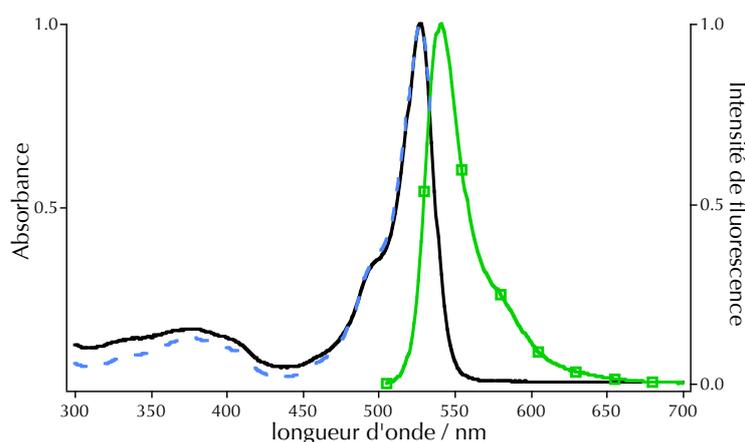


FIG. 3.13 – Spectres d'absorption (—), de fluorescence (□) et d'excitation de fluorescence (- -) de l'IP-BDY dans le dichlorométhane.

3.4.3.2 Autres molécules

Dans le dichlorométhane, les spectres de ces molécules sont caractéristiques de la fluorescence des Bodipy. Ils sont présentés figures 3.14 et 3.15. Les propriétés spectroscopiques de certaines de ces molécules ont été étudiées par Christine Goze au cours de sa thèse. La fluorescence est en général similaire à celle d'un Bodipy, même quand les fluors ont été remplacés par des carbones. Les valeurs obtenues sont rassemblées table 3.3. Les principaux résultats sont les suivants [80] :

BDY-A [114] Les propriétés de complexation de cations monovalents et divalents par cette molécule ont été testées. En présence de cations monovalents aucune modification du spectre

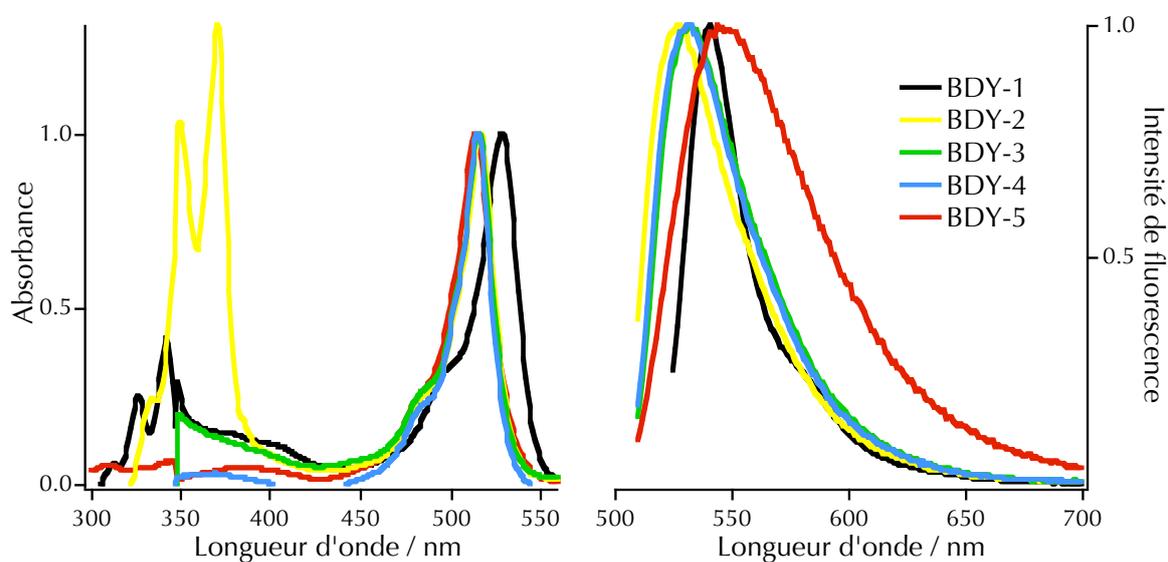


FIG. 3.14 – Spectres d'absorption et de fluorescence des molécules BDY-1 à 5 dans le dichlorométhane.

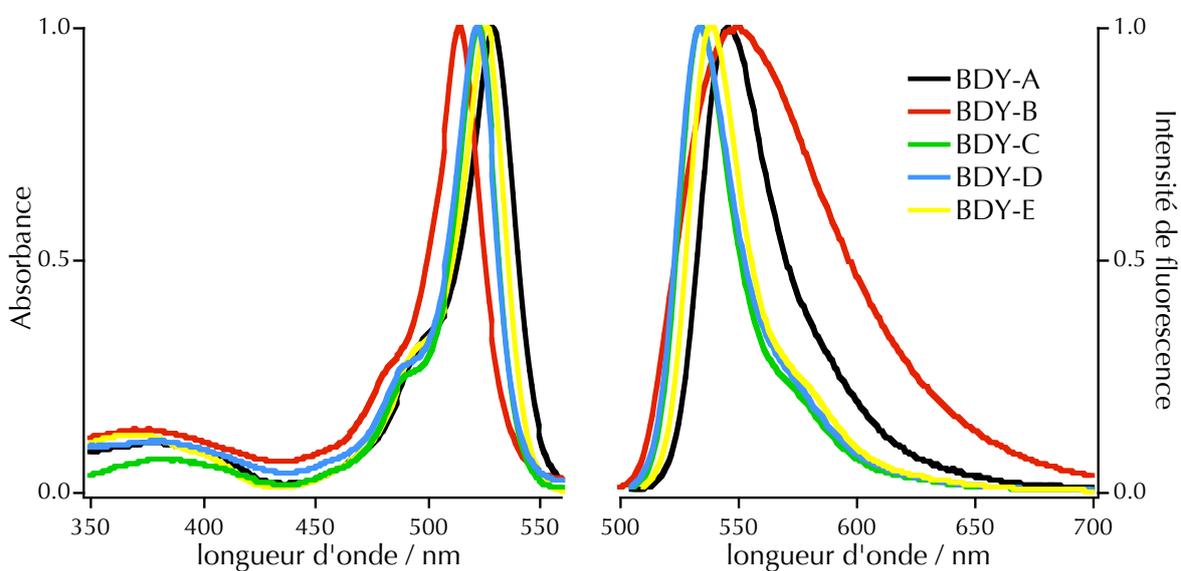


FIG. 3.15 – Spectres d'absorption et de fluorescence des molécules BDY-A à E dans le dichlorométhane.

d'absorption n'a été observée, par contre avec des cations divalents, un effet bathochrome est observé pour les bandes d'absorption du groupement terpyridine et du bodipy, ainsi que l'apparition d'une nouvelle bande dans l'UV. Ces changements sont dus à la complexation du métal par le groupement terpyridine. Les complexes ML et ML₂ ont été observés. Dans le cas du zinc, la constante d'affinité est plus élevée que pour les autres ions et ce système a été étudié de manière plus approfondie. En présence de Zn²⁺, la fluorescence diminue de manière importante et la complexation est réversible si du triéthylènetétraamine est ajouté dans le milieu. La complexation du zinc par le BDY-A et la réversibilité ont aussi été observées dans une matrice polymère (PMMA). Cependant ce système n'est pas très sélectif, ce qui limite les applications, notamment en biologie.

BDY-1 [115] Cette molécule a été synthétisée de manière à avoir un grand déplacement de Stokes. Ceci permet de séparer la longueur d'onde d'excitation de la détection de la fluorescence pour une application en biologie. Un transfert de 100% de l'énergie d'excitation du pyrène vers le bodipy a été observé. Il est dû à un transfert d'énergie de type Förster entre la fluorescence du pyrène et la transition S₀ → S₂ du bodipy.

BDY-B et BDY-5 [81] Ces deux molécules font partie d'une série dans laquelle des fluorophores ont été fixés directement sur le Bore. L'objectif était toujours de former des molécules à grand déplacement de Stokes. Cependant, le spectre de fluorescence de ces molécules est élargi et déplacé vers le rouge et le rendement quantique est faible. Un solvatochromisme important a été mesuré sur la molécule BDY-5 ce qui peut être dû à la formation d'un état excité à transfert de charge. Pour la molécule BDY-B, un transfert d'énergie du naphthalène vers le bodipy a été mesuré, mais l'efficacité de ce transfert n'est que de 25%.

BDY-2 et BDY-3 [116] Toujours dans la même optique, les chromophores ont ensuite été greffés sur le bore au moyen d'un groupement éthynique, ce qui permet de les éloigner du bodipy. Pour la molécule BDY-3, un transfert d'énergie du pyrène vers le Bodipy d'une efficacité de 96% a été mesuré. L'intérêt de cette molécule est que la fonctionnalisation en position 8 du bodipy est possible, ce qui n'est pas le cas pour la molécule BDY-1. La molécule BDY-3 a été fonctionnalisée en position 8 et les molécules obtenues ont été utilisées pour marquer des protéines. L'observation de la fluorescence a été faite en excitant la molécule dans l'UV et en collectant la fluorescence dans le visible. Ce marquage s'est avéré plus efficace qu'un marquage avec de la fluorescéine.

	$\lambda_{abs}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	$\lambda_{exc}(nm)$	$\varepsilon(cm^{-1}.mol^{-1}.L)$	ϕ_{exp}	$\tau_{exp}(ns)$	f	$\bar{\nu}_{max}(cm^{-1})$	$\tau_{rad}(ns)$	ϕ_{calc}
TMB	543	556	543	80 000	0,95	6,3	0,297	18 416	9,91	0,64
PM 567	520	537	520	69 000	0,90	6,08	0,274	19 231	9,87	0,62
PM 597	526	565	527	93 000	0,50	4,57	0,273	19 011	10,13	0,45
IP-BDY	527	541	527	75 000	0,65	4,85	0,303	18 975	9,16	0,53
BDY-1	343 - 529	541	528	83 000	0,9	7,0	0,337	18 904	8,30	0,84
BDY-2	371 - 517	528	516	73 000	0,94	6,2	0,337	19 342	7,92	0,78
BDY-3	516	532	515	67 100	0,95	9,0	0,340	19 380	7,82	1,15
BDY-4	515	531	515	80 000	0,92	8,0	0,347	19 418	7,64	1,05
BDY-5	514	544	513	91 400	0,78	6,0	0,343	19 455	7,70	0,78
BDY-A	529	546	529	72 000	0,87	5,3				
BDY-B	514	546	514	74 500	0,5	5,7				
BDY-C	522	535	523							
BDY-D	522	534	522							
BDY-E	526	539	526							

TAB. 3.3 – Propriétés spectroscopiques des Bodipy dans le dichlorométhane. λ_{abs} : maximum du spectre d'absorption, λ_{em} : maximum du spectre d'émission de fluorescence, λ_{exc} : maximum du spectre d'excitation de fluorescence, ϕ_{exp} : rendement quantique de fluorescence mesuré, ε : coefficient d'extinction molaire, τ_{exp} : durée de vie de l'état excité mesurée, f : force d'oscillateur calculée à partir du spectre d'absorption, $\bar{\nu}_{max}$: position du maximum de fluorescence, $\tau_{rad} = 1/(\bar{\nu}_{max} * f)$ durée de vie radiative, $\phi_{calc} = \tau_{rad}/\tau_{exp}$: rendement quantique de fluorescence théorique

3.5 Agrégation des dérivés de Bodipy

La fluorescence à l'état solide des Bodipy n'a pas été étudiée de manière extensive. Cependant des interactions entre noyaux Bodipy a été mises en évidence dans des milieux confinés ou dans des molécules comportant plusieurs fluorophores. Les Bodipy peuvent former des dimères, qui peuvent être fluorescents ou non, ainsi que des excimères dont la fluorescence est déplacée vers le rouge par rapport à celle du monomère.

3.5.1 Augmentation de la concentration - Formation d'excimères

La spectroscopie des Bodipy de la série PM en solution concentrée montre que la formation d'agrégats est difficile [6]. En effet, l'augmentation de la concentration d'une solution jusqu'à 10^{-3} mol.L⁻¹ ne provoque pas de modification du spectre d'absorption. Un déplacement vers le rouge et une diminution de l'intensité des spectres de fluorescence ainsi qu'une augmentation de la durée de vie sont observés mais cela est attribué à des effets de réabsorption / réémission de la fluorescence.

Il est possible d'augmenter encore plus la concentration de Bodipy en utilisant des molécules capables de s'autoassembler. Dans ce cas des excimères peuvent se former. Des lipides marqués avec des Bodipy sont utilisés en biologie comme marqueurs membranaires. La capacité du Bodipy à former des excimères permet de faire des études en fonction de la densité de lipide dans la couche. Par exemple, le groupe de H. Brockman a étudié la fluorescence d'un Bodipy-Phosphatidylcholine (PBPC) dans des couches PBPC / SOPC en fonction de la quantité de PBPC dans la couche³ [78]. Lorsque la concentration augmente, la fluorescence du monomère, vers 515 nm, diminue et un pic large au delà de 600 nm apparaît. La forme du spectre d'absorption ne varie pas. La fluorescence au delà de 600 nm est celle d'un excimère. Les maxima d'absorption et de fluorescence du monomère et de l'excimère se déplacent linéairement vers le rouge quand la concentration en PBPC augmente. Ceci est attribué à une modification des propriétés de la molécule à l'état fondamental et est cohérent avec une diminution de la distance entre les chromophores. Cependant, l'évolution est linéaire, ce qui montre que les interactions entre les Bodipy sont faibles. Cette étude met en évidence deux distances caractéristiques entre les molécules de PBPC :

- Le rayon R_m ($\approx 25,9$ Å) qui est la distance critique entre deux fluorophores en dessous de laquelle il se forme une paire statistique qui piège l'excitation. Si la distance entre deux fluorophore est inférieure à R_m , il y a un quenching de la fluorescence du monomère par transfert d'énergie qui augmente avec la concentration en PBPC. La formation de dimère n'intervient pas dans ce quenching.
- Le rayon R_e ($\approx 13,7$ Å) qui est la distance critique de formation de l'excimère. Ici R_e correspond à une distance intermoléculaire où la fluorescence du monomère est quasiment

³PBPC : 1-palmitoyl-2-(4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-3-pentanoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine, SOPC : 1-stéroyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

totalemment éteinte.

Le PBPC est une molécule intéressante pour l'étude de la densité de couches lipidiques. Comme le fluorophore est un Bodipy, la fluorescence de cette molécule est peu sensible aux facteurs environnementaux tels que le pH, la polarité ou le potentiel membranaire. Par ailleurs, elle se mélange bien avec d'autres lipides, contrairement à des molécules marquées par un pyrène ou un anthracène qui ont tendance à former des agrégats à forte concentration, ce qui modifie la structure de la membrane étudiée.

La formation d'excimère de Bodipy quand la densité de marqueurs membranaires est élevée a été aussi utilisée pour étudier le mécanisme d'endocytose de glucosphingolipides [106, 117]. Il s'agit de molécules composées d'une chaîne alkyle et d'un groupement lactosyl (cf. figure 3.16). Le Bodipy est fixé entre la chaîne alkyle et le lactosyl. Dans un premier article, les auteurs suivent l'évolution du fluorophore dans la cellule pendant et après l'endocytose [106]. Ils mettent en évidence une voie d'incorporation spécifique pour cette molécule. Deux types d'endosomes sont identifiés, l'un où la fluorescence du Bodipy est celle d'un monomère, l'autre où la fluorescence d'un excimère est observée. Il y a donc une distribution de la densité de glucosphingolipide dans les endosomes, qui influe sur leur évolution dans la cellule. Dans un second article, l'influence de la stéréochimie du glucosphingolipide sur sa capacité à former des arrangements compacts est mise en évidence [117].

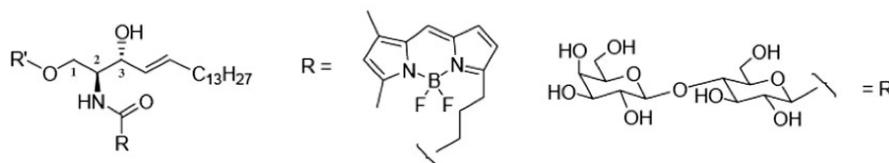


FIG. 3.16 – *Sphingosyl 1 β D lactoside fonctionnalisé par un Bodipy. D'après [117].*

3.5.2 Formation de dimères

La formation d'agrégats de Bodipy en solution à faible concentration a été observée. Un Bodipy de type PM567, sur lequel on a greffé un groupement alkoxydiacylamido avec un spacer phénylamide en position 8 a été étudié dans le dichlorométhane et dans le nonane (cf. figure 3.17) [118]. L'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à plus faible longueur d'onde est observée quand on passe du dichlorométhane au nonane. À très forte dilution, le spectre d'absorption est similaire à celui mesuré dans le dichlorométhane. Cette nouvelle bande est attribuée à la formation d'agrégats de Bodipy. Le nombre de molécule dans l'agrégat peut être déterminé à partir du spectre d'absorption. Ici $n = 2,1 \pm 0,3$. La formation d'agrégat est observée à partir de $6 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. De la même manière, le spectre de fluorescence dans le nonane comporte deux bandes : l'une correspondant à la fluorescence du monomère, l'autre déplacée vers le rouge, qui est due à la

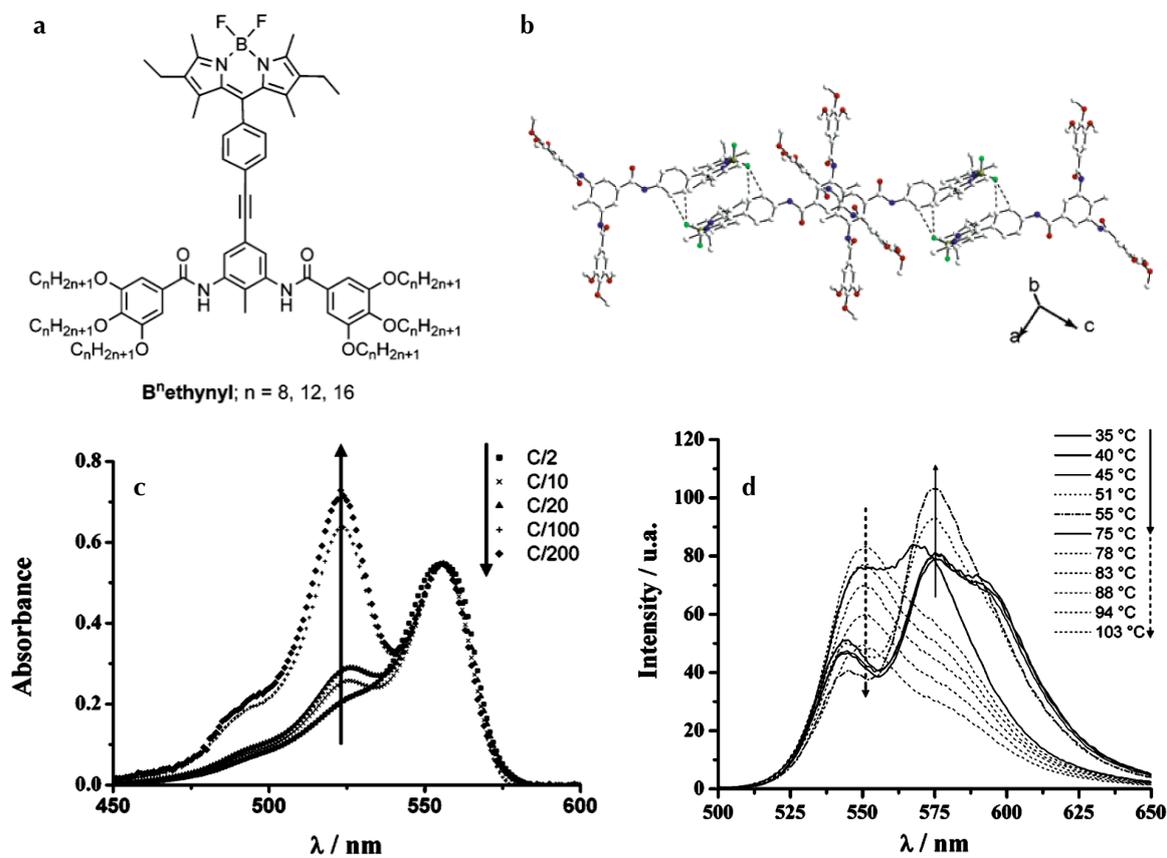


FIG. 3.17 – a) Structure des molécules B^n amide, b) Empilement des molécules, c) Spectres d'absorption du B^{16} amide dans le nonane à différentes concentration, d) Spectres de fluorescence du B^{16} amide dans le nonane en fonction de la température, il y a formation d'un organogel. D'après [118]

formation d'un agrégat de type J. Si la concentration diminue, l'intensité de la bande de l'agrégat diminue par rapport à celle du monomère. Enfin, il est possible de former un organogel à partir de cette molécule et d'un solvant de type C₉ à C₁₂. En plus des deux bandes précédemment citées, une troisième bande à longueur d'onde encore plus grande est observée dans le gel. Cette fluorescence est attribuée à la formation d'agrégats impliquant plus de deux molécules.

Quand les Bodipy sont utilisés comme marqueurs fluorescents en milieu biologique il a été montré que, si la concentration de fluorophore est élevée par rapport à celle de protéine, deux noyaux Bodipy peuvent interagir. Un quenching de la fluorescence ou l'apparition d'une bande déplacée vers le rouge peuvent alors être observés. Ces interactions ont été étudiées par l'équipe de Lehnart Johansson [119, 120, 121]. La molécule modèle comporte deux noyaux Bodipy qui sont reliés à une pince propyonyl 1,2 cis diaminocyclohexane (b-BACH). Dans cette molécule plusieurs positions relatives des Bodipy sont possibles. L'étude de ses propriétés spectroscopiques dans différents solvants ainsi que dans des micelles a montré que deux dimères peuvent se former :

- Un dimère dont le spectre d'absorption est déplacé vers le bleu et qui est non fluorescent.
- Un dimère dont le spectre d'absorption est déplacé vers le rouge et qui est fluorescent.

Un transfert d'énergie a été mis en évidence entre le monomère et chacun de ces dimères [120]. Pour les molécules de type b-BACH, la formation d'un dimère de type H est observé. Il y a un déplacement vers le bleu du spectre d'absorption, et le dimère formé n'est pas fluorescent. Il est possible de calculer le spectre d'absorption de ce dimère et de déterminer sa géométrie. Le dimère fluorescent est observé dans des couches lipidiques, où l'environnement permet à la molécule d'atteindre la configuration correspondant à la formation d'un agrégat J.

La formation d'agrégats H dans une matrice sol-gel a été étudiée par le groupe de John Brennan [122]. Lors de la formation du gel, une bande d'absorption à 468 nm apparaît tandis que l'absorbance du monomère vers 500 nm diminue. Une étude cinétique montre que le monomère est d'abord immobilisé sur la matrice, ce qui est l'étape limitante, puis qu'un dimère de type H se forme. La distance entre les deux noyaux Bodipy est de 7,63 Å et ce dimère n'est pas fluorescent ($\phi < 10^{-4}$). Un quenching de la fluorescence des monomères piégés dans les pores de la matrice sol-gel par les dimères est mis en évidence. La mesure de l'évolution de la durée de vie du monomère en fonction du temps permet de mesurer la distance monomère - dimère, ce qui reflète la taille des pores.

Saki et Akkaya ont synthétisé une molécule dans laquelle deux groupements Bodipy sont fixés, au niveau du carbone C₈, sur un xanthène, ce qui permet de placer les Bodipy face à face avec une distance entre les noyaux aromatiques de 4,5 Å (cf. figure 3.18, molécule n°4) [123]. Un groupement p-diméthylaminobenzaldéhyde a aussi été additionné en position C₃ de l'un des Bodipy (molécule 5). Les propriétés spectroscopiques du xanthène ne portant qu'un Bodipy sont celles d'un Bodipy. Par contre dans le dimère, le spectre d'absorption est déplacé vers le bleu. Ceci est cohérent avec l'orientation relative des molécules, qui correspond à un agrégat H. Le spectre de fluorescence présente deux pics, l'un à 505 nm correspondant à la fluorescence du monomère, l'autre très élargi

et centré à 590 nm, est attribué à la formation d'un excimère. L'intensité de fluorescence est dix fois plus faible que celle du monomère. Enfin, pour la molécule portant un noyau Bodipy ainsi qu'un fluorophore plus conjugué, il y a deux pics d'absorption, correspondant à chaque type de chromophore. Lorsque le noyau Bodipy est excité, il y a un transfert d'énergie efficace vers le groupement accepteur. Ce transfert d'énergie peut être modulé en protonant la fonction amine, ce qui diminue l'efficacité du transfert de charge intramoléculaire, et donc déplace vers le bleu la bande d'absorption du chromophore.

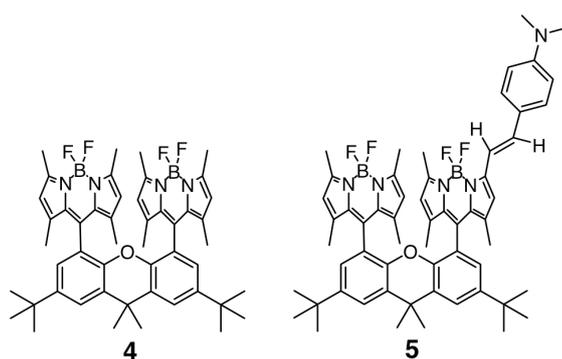


FIG. 3.18 – Structure des molécules synthétisées par Akkaya. D'après [123].

Les Bodipy ont de bonnes propriétés de fluorescence, car les longueurs d'onde d'émission sont au delà de 500 nm, les coefficients d'absorption molaires et les rendements quantiques de fluorescence sont élevés et le solvatochromisme est faible. La formation d'excimères ou d'agrégats fluorescents a été observée. Quand le monomère coexiste avec ces espèces, un transfert d'énergie du monomère vers ces dernière a été observé.

Les molécules qui ont été décrite dans la section 2.4 ont été étudié sous forme de solide mais aussi dans des matrices polymère. Les résultats obtenus sont présentés dans les deux parties qui suivent.

Deuxième partie

Fluorescence à l'état solide

Chapitre 4

Dispositif expérimental et méthodologie

L'objectif de l'étude des Bodipy était de trouver des molécules fluorescentes à l'état solide afin de préparer des capteurs à base de nanoparticules. Deux approches ont été utilisées :

L'ingénierie moléculaire Des molécules avec des groupements spécifiques apportant la ou les propriétés désirées ont été synthétisées. Ici, il s'agit de Bodipy portant des groupements encombrés afin de limiter les interactions entre les fluorophores à l'état solide [25].

L'exploration d'une bibliothèque de molécules Les propriétés de fluorescence à l'état solide de Bodipy synthétisés pour d'autres applications, mais disponibles en plus grand nombre et en plus grande quantité ont été étudiées.

La première approche concerne le TMB et les pcp-BDY. Le facteur limitant dans l'obtention de ces molécules est la synthèse du pyrrole, qui nécessite un travail d'optimisation important. Par ailleurs, il faut purifier et isoler une faible quantité de matière, typiquement quelques dizaines de mg. La deuxième approche concerne les crypto-Bodipy et les Bodipy commerciaux, qui ont permis de cribler un grand nombre de fluorophores de la même famille.

En parallèle, nous avons cherché à comprendre les paramètres gouvernant la fluorescence des Bodipy à l'état solide. Une étude détaillée des molécules dont la structure cristalline est connue a été réalisée de manière à corrélérer les propriétés spectroscopiques observées et l'organisation relative des fluorophores dans le solide.

Ce chapitre présente le dispositif d'imagerie d'intensité et de durée de vie de fluorescence utilisé pour l'étude de la fluorescence à l'état solide ainsi que la méthodologie adoptée pour cette étude et l'analyse des résultats. Les résultats concernant l'ingénierie moléculaire puis le criblage d'une famille de Bodipy sont rassemblés dans les deux chapitres suivants. Enfin, le dernier chapitre de cette partie est consacré à l'iodophényl-Bodipy (IP-BDY), qui s'est révélé avoir des propriétés de fluorescence à l'état solide intéressantes.

4.1 Dispositif expérimental

La fluorescence des Bodipy à l'état solide a été étudiée avec le montage d'imagerie d'intensité et de durée de vie de fluorescence de l'équipe de Robert Pansu. Les échantillons sont observés avec un microscope et la détection est assurée par un photomultiplicateur permettant le comptage de photons uniques corrélés dans l'espace et dans le temps, le QA (Quadrant Anode Detector). La source lumineuse est un laser pulsé Titane - Saphir. Cette section présente brièvement les différentes méthodes d'imagerie de durée de vie, le *FLIM*, ou *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, puis le montage utilisé au PPSM et enfin la méthodologie adoptée pour observer et analyser la fluorescence des Bodipy à l'état solide.

4.1.1 Le FLIM

4.1.1.1 Mesure de la durée de vie

Il existe deux méthodes pour mesurer le déclin de fluorescence d'une molécule : la fluorimétrie de phase et la méthode impulsionnelle [9, 124]. Dans les deux cas, le signal enregistré $R(t)$ est le produit de convolution entre le signal de fluorescence émis par la molécule $I(t)$ et la réponse du système à l'excitation $E(t)$, soit :

$$R(t) = E(t) \otimes I(t) = \int_{-\infty}^t E(t')I(t-t')dt' \quad (4.1)$$

En fluorimétrie de phase, on se place dans le domaine des fréquences alors que pour la méthode impulsionnelle, on est dans le domaine temporel.

Fluorimétrie de phase Dans ce cas, la source lumineuse émet un signal sinusoïdal de la forme $E(t) = A + B \cos(\omega t)$. Le signal de fluorescence est aussi sinusoïdal et il s'écrit : $I(t) = a + b \cos(\omega t + \Phi)$. La phase Φ et la modulation M sont reliées à la durée de vie τ par les équations :

$$\tau_{\Phi} = \frac{\tan \Phi}{\omega} \quad (4.2)$$

$$\tau_M = \frac{\sqrt{1/M^2 - 1}}{\omega}, \quad M = \frac{B/A}{b/a} \quad (4.3)$$

En pratique, la mesure est réalisée sur plusieurs fréquences ω . Pour un déclin monoexponentiel $\tau_{\Phi} = \tau_M$ pour toutes les fréquences. Par contre, s'il y a plusieurs durées de vie ces valeurs sont différentes et un ajustement par la méthode des moindres carrés permet de déterminer les durées de vie de fluorescence du système étudié. Avec cette technique, la prise en compte de la fonction d'appareil ne nécessite pas une déconvolution du signal mais une division, puisqu'on est dans le domaine des fréquences.

Méthode impulsionnelle L'excitation des molécules est assurée par un laser pulsé. L'impulsion doit être courte devant la durée de vie de fluorescence des molécules. En général, la durée de ces impulsions est inférieure à la picoseconde, et la relaxation complète du fluorophore doit avoir lieu entre deux impulsions. On mesure directement la décroissance du signal de fluorescence après l'excitation. Comme celle-ci se produit sur une échelle de temps trop courte (quelques nanosecondes) pour pouvoir être mesurée en une seule fois, il faut utiliser une méthode détournée. Le comptage de photon unique est la méthode la plus répandue. Son principe est présenté figure 4.1.

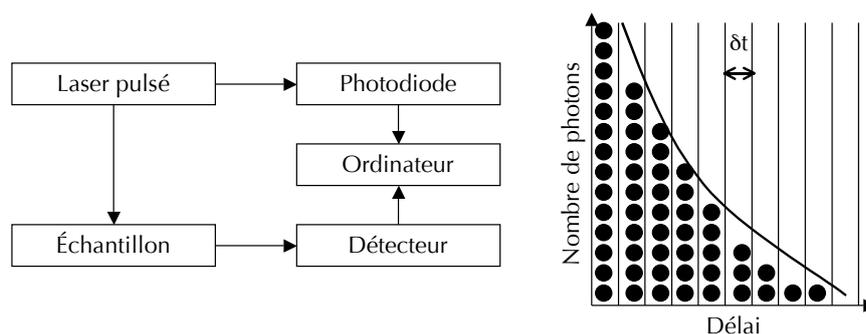


FIG. 4.1 – Principe de la mesure du déclin de fluorescence par comptage de photon unique. À gauche : schéma simplifié du dispositif expérimental. L'impulsion laser induit l'excitation d'une molécule, qui réémet un photon avec un retard, ou un délai, t . À droite : chaque photon est placé dans un canal correspondant au délai entre l'impulsion laser et le moment où il arrive sur le détecteur. La statistique du nombre de photons permet de déterminer $I(t)$.

La détection des photons est assurée par un photomultiplicateur très sensible. Une partie du faisceau laser est envoyée sur une photodiode. L'arrivée de l'impulsion laser sur cette photodiode déclenche une rampe de tension qui est interrompue à l'arrivée d'un photon de fluorescence sur le détecteur. La valeur de la tension à cet instant permet de déterminer le délai, ou retard, entre le temps zéro, fixé par l'impulsion, et l'émission du photon. La fenêtre temporelle utilisée, de largeur ΔT est divisée en un nombre fini de canaux N , qui ont une largeur de $\delta t = \Delta T/N$. Le photon détecté est placé dans un de ces canaux, correspondant au délai mesuré, et le déclin final correspond à la statistique du nombre de photons placé chaque canal. En effet, si cette opération est répétée un nombre de fois suffisamment grand (plusieurs millions), le nombre de photons par canal est proportionnel à la probabilité de trouver la molécule à l'état excité au délai correspondant après l'excitation [125]. En pratique, pour déterminer le déclin de manière précise, il faut qu'il y ait moins d'un photon émis entre deux impulsions laser, i.e. que l'intensité de fluorescence soit beaucoup plus faible que l'intensité du laser.

Cette méthode permet de mesurer la réponse temporelle du système à l'excitation, et il faut en toute rigueur déconvoluer le signal de fluorescence de la réponse impulsionnelle, c'est à dire du signal mesuré en présence d'un échantillon diffusant. Cependant, si cette réponse est suffisamment

rapide par rapport au déclin mesuré, il est possible de négliger sa contribution. Dans un dispositif de comptage de photon unique, la résolution temporelle est imposée par le détecteur. La résolution temporelle du photomultiplicateur¹ utilisé pour les mesures en solution est de 50 picosecondes, celle du QA est de 150 nanosecondes. Dans les deux cas, pour une durée de vie de quelques nanosecondes, le résultats obtenu sans déconvolution est très proche du résultat réel.

4.1.1.2 Imagerie

Les deux techniques de détection présentées ci-dessus sont utilisées dans les dispositifs d'imagerie de fluorescence résolue en temps (FLIM) [126]. Il y a deux méthodes pour acquérir des images : soit par microscopie confocale ou par excitation à deux photons, où l'image est mesurée pixel par pixel avec un détecteur classique, soit en illumination plein champ où l'image est enregistrée par une caméra qui permet de localiser les photons dans l'espace.

Plusieurs types de dispositifs expérimentaux ont été développés, chacun présentant des avantages et des inconvénients. Le dispositif idéal permettrait d'enregistrer l'image rapidement, tout en ayant une bonne résolution spatiale et temporelle, ce qui est en général incompatible. Avec un microscope confocal, un volume limité de l'échantillon est excité, ce qui permet une résolution en profondeur de l'image. Mais le balayage est lent et l'intensité du faisceau est importante, ce qui peut perturber la mesure. La durée d'acquisition peut être diminuée en faisant la mesure sur plusieurs points simultanément [127]. Avec un dispositif en plein champ, l'intensité lumineuse de l'excitation est plus faible et il est possible de détecter des événements brefs et localisés dans l'espace. Le comptage de photons nécessitant des durées d'acquisition importantes, d'autres méthodes permettant de mesurer le déclin de fluorescence dans le domaine temporel sont utilisées. Elles consistent à ne regarder qu'une portion du signal ayant un retard donné par rapport à l'impulsion laser : après chaque impulsion, le détecteur ne mesure l'intensité qu'entre les délais t et $t + \delta t$. Cette méthode est plus rapide, puisqu'on peut mesurer la fluorescence de plusieurs molécules en même temps, mais elle est en général moins précise que le comptage de photons.

Le FLIM est principalement utilisé en biologie [126, 18]. L'application la plus courante est l'étude du FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Cette technique est basée sur l'étude du transfert d'énergie non radiatif entre un donneur et un accepteur, qui peut être fluorescent ou non. Elle permet de caractériser les interactions entre biomolécules ou d'observer le clivage ou les changements conformationnels d'une protéine [18]. La mesure des durées de vie de fluorescence permet de distinguer une variation de l'intensité de fluorescence due à des effets de concentration d'une variation due au FRET. Une cellule vivante constitue un environnement complexe et pour des mesures d'intensité de fluorescence, il est en général préférable d'utiliser des sondes ratiométriques qui permettent de s'affranchir des effets de variation de l'illumination ou de la concentration de sonde. La durée de vie d'un fluorophore est beaucoup moins sensible à ces paramètres. Des sondes

¹Hamamatsu Multi Channel Plate R3809U

ont donc été développées pour étudier la concentration de calcium intracellulaire, d'oxygène ou le pH par FLIM [126, 128]. Dans certains cas, le FLIM peut permettre de distinguer deux fluorophores qui ont le même spectre d'émission mais des durées de vie différentes.

4.1.2 Description du montage

Pour le dispositif d'imagerie de fluorescence résolue dans le temps que nous utilisons l'éclairage est plein champ et la détection du déclin de fluorescence est impulsionnelle. Il est schématisé figure 4.2. La source lumineuse est un laser Titane Saphir, pompé par un laser Argon. Il délivre des impulsions de 1,3 ps, à une fréquence de 82 MHz. Un sélecteur d'impulsions permet de diminuer la cadence de répétition, jusqu'à 4 MHz, ce qui correspond à une durée de 250 ns entre deux impulsions. La longueur d'onde du fondamental peut être réglée entre 720 et 1 000 nm. Des cristaux doubleur et tripleur de fréquence permettent d'utiliser des longueurs d'onde d'excitation dans le visible et l'UV. Les expériences présentées dans ce manuscrit ont été réalisées avec une longueur d'onde d'excitation de 495 nm.

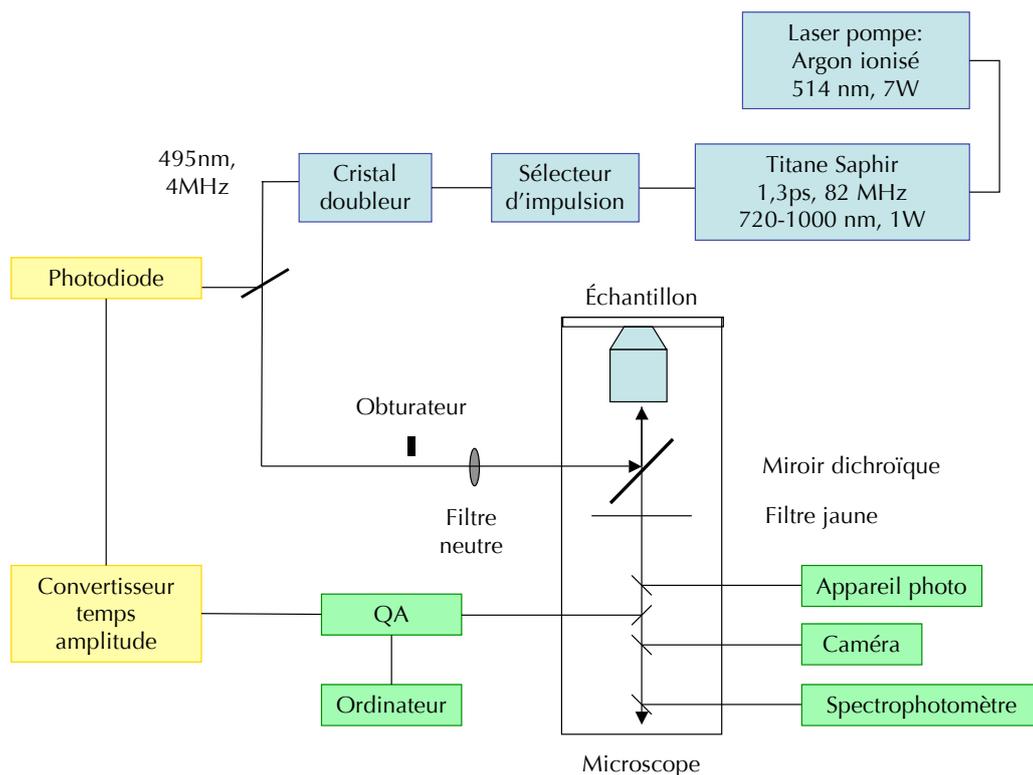


FIG. 4.2 – Schéma du dispositif expérimental.

La détection est assurée par un photomultiplicateur permettant le comptage de photons uniques corrélés dans l'espace et dans le temps, le QA. Il a été mis au point par la société Europhoton [129, 130]. Il s'agit d'un photomultiplicateur à galettes de microcanaux dont l'anode est divisée en quatre quadrants. Ce détecteur est schématisé figure 4.3.

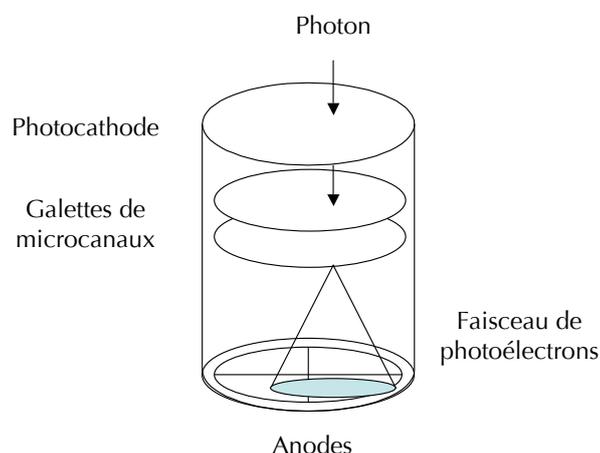


FIG. 4.3 – Schéma du Photomultiplicateur utilisé pour le FLIM, le QA.

Quand les photons traversent la cathode du QA, ils sont convertis en photoélectrons, avec un rendement de 0,1 à 20 %, selon la longueur d'onde, puis ces derniers traversent deux galettes de microcanaux qui permettent de les amplifier et de les accélérer. Le faisceau généré traverse ensuite le détecteur et arrive sur l'anode qui est divisée en quatre quadrants. Le barycentre des charges reçues par chaque partie de l'anode permet de remonter à la position initiale du photon sur la cathode. Il y a une cinquième anode à la périphérie du détecteur qui améliore la résolution spatiale sur les bords de l'image. Le QA est relié à une chaîne de comptage de photon unique, qui permet de connaître, pour chaque photon, le retard par rapport à l'impulsion laser. Pour chaque photon détecté, l'ordinateur enregistre sa position d'arrivée sur le détecteur et le délai par rapport à l'impulsion.

Plusieurs résultats sont déduits des données brutes. Le nombre de photons reçus par pixel donne une image d'intensité de fluorescence. Le délai moyen des photons d'un pixel τ , défini par :

$$\tau = \frac{1}{N} \sum_1^N \tau_i \quad (4.4)$$

où N est le nombre de photons reçus sur le pixel considéré et τ_i le délai entre l'impulsion laser et l'émission d'un photon, permet de construire une image de durée de vie moyenne. L'histogramme du nombre de photons reçus en fonction du délai par rapport à l'impulsion laser donne le déclin de fluorescence. Il peut être calculé sur toute l'image ou sur une zone d'intérêt, notée ROI². Enfin, le signal total reçu par le détecteur en fonction du temps écoulé depuis le début de la mesure

²Region Of Interest

est enregistré, ce qui permet de suivre l'évolution de l'intensité de fluorescence stationnaire. En particulier, en comparant celle-ci à la puissance du laser, qui est mesurée par ailleurs, il est possible de savoir si l'échantillon a blanchi pendant l'acquisition.

La caractérisation de ce montage a été réalisée par J-A Spitz au cours de sa thèse [131, 132]. Il est tout d'abord nécessaire de corriger les différences de temps de transit à travers les galettes de microcanaux selon la position initiale du photon. La carte des temps de transit a été déterminée grâce à une solution de Rhodamine 6G dans l'eau, dont l'image de FLIM est en théorie homogène. Cette carte permet de corriger les images de FLIM et les déclinés de fluorescence calculés. De la même manière on peut corriger les variations de gain sur le détecteur. Une fois ces corrections appliquées, la résolution temporelle du montage, imposée par le détecteur, est de 150 ps, et la résolution spatiale de 400 nm, ce qui correspond à la résolution imposée par la diffraction de la lumière.

Le dispositif expérimental permet aussi de faire de l'imagerie d'anisotropie de fluorescence (cf. figure 4.4). Pour cela, une moitié de l'image est masquée à la sortie du microscope et l'autre moitié traverse un cube polarisant (prisme de Glan) qui permet de séparer la lumière polarisée parallèlement à la polarisation d'excitation de la lumière polarisée perpendiculairement. L'image correspondant à la lumière polarisée parallèlement est ensuite retournée par un pentaprisme. L'image formée sur le QA est composée de deux moitiés symétriques qui correspondent aux deux polarisations.

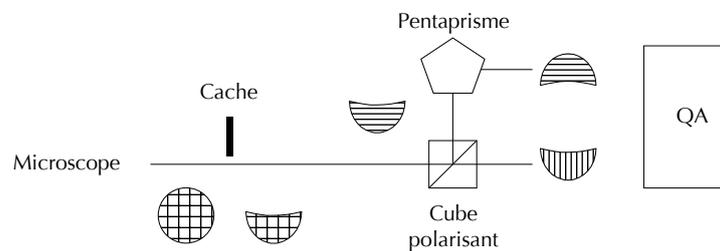


FIG. 4.4 – Schéma du dispositif permettant de mesurer l'anisotropie de fluorescence.

Le microscope possède plusieurs sorties. Outre le QA, un appareil photographique numérique et un spectrophotomètre (Ocean Optics S2000), relié au microscope par une fibre optique, sont disponibles. L'appareil photo permet de prendre des images des échantillons en lumière blanche mais aussi en fluorescence. Le spectrophotomètre permet de mesurer les spectres de fluorescence et des spectres d'absorption en transmission en utilisant la lampe blanche du microscope comme source lumineuse.

Ce dispositif expérimental a été utilisé pour mesurer l'anisotropie de fluorescence de filaments d'actine, qui est une protéine polymérisable du cytosquelette [133, 132], ainsi que l'évolution de la concentration de calcium intracellulaire. Le FLIM permet aussi d'étudier la fluorescence à

l'état solide de molécules organiques. Depuis plusieurs années, l'équipe de Robert Pansu étudie la fluorescence de particules de rubrène et de pérylène diimide [55, 134]. Il a été montré que la fluorescence de ces objets pouvait être éteinte par transfert d'énergie. En particulier, V. Monnier a étudié la fluorescence de nanocristaux organiques en matrice sol-gel et a mis en évidence la possibilité de réaliser des capteurs chimiques à partir de nanocristaux de rubrène et de tétracène [55, 5].

Au cours de ma thèse, j'ai étudié la fluorescence de microcristaux de 4-*n*-octalamino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD-C8) préparés par réprécipitation dans l'eau en présence d'ADN [60]. Ce travail a été réalisé en collaboration avec S. Fery-Forgues (IMRCP - Toulouse). Ces cristaux ont une durée de vie trop courte pour notre montage mais l'imagerie d'intensité de fluorescence a permis de compléter les mesures effectuées sur la suspension. Ces cristaux sont bicolores, jaunes au milieu et rouges aux bords. Les expériences réalisées au PPSM ont montré que la fluorescence aux bords est due à une propagation du signal à travers le cristal, dont la composante bleue est réabsorbée, et non pas à une différence d'environnement des molécules.

Enfin, mon travail a porté sur l'étude de la fluorescence des Bodipy à l'état solide. Le protocole utilisé est décrit dans le paragraphe suivant.

4.2 Méthodologie d'étude

4.2.1 Échantillons observés

Plusieurs types de solides ont été étudiés : la poudre brute, c'est à dire des cristaux de taille variant entre quelques dizaines de microns et le millimètre. Il s'agit en général de la poudre obtenue après la synthèse de la molécule. L'objectif étant au final d'utiliser des objets nanométriques, des films ont été préparés, soit en laissant sécher une goutte de solution contenant le Bodipy sur une lamelle de microscope ou en étalant une goutte de cette même solution entre deux lamelles. Dans le premier cas on parlera de *films évaporés* et dans le second cas de *films étirés*.

La figure 4.5 montre des photos des différents types d'échantillons étudiés. La forme des cristaux dépend de la molécule considérée. Dans le cas des films évaporés une grande variété de structures est observée. Deux solvants ont été utilisés, le dichlorométhane (CH_2Cl_2) et le *p*-dichlorobenzène ($\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$). Le premier s'évapore rapidement, en quelques dizaines de minutes alors que le second s'évapore lentement, en plusieurs heures. Les structures formées sont des objets allant de quelques microns à plusieurs dizaines de microns de diamètre mais dont l'épaisseur est inférieure au micron. Les films étirés ont été obtenus à partir d'une solution de Bodipy dans le dichlorométhane. En appliquant une force de cisaillement sur la solution, on contrôle mieux l'évaporation du solvant et des particules en forme de lentille sont formées. Le diamètre de ces objets est de quelques centaines de nanomètres à quelques microns. Des mesures d'AFM, réalisées sur des films étirés de Rubrène ont montré que plus le diamètre est important, plus la particule est

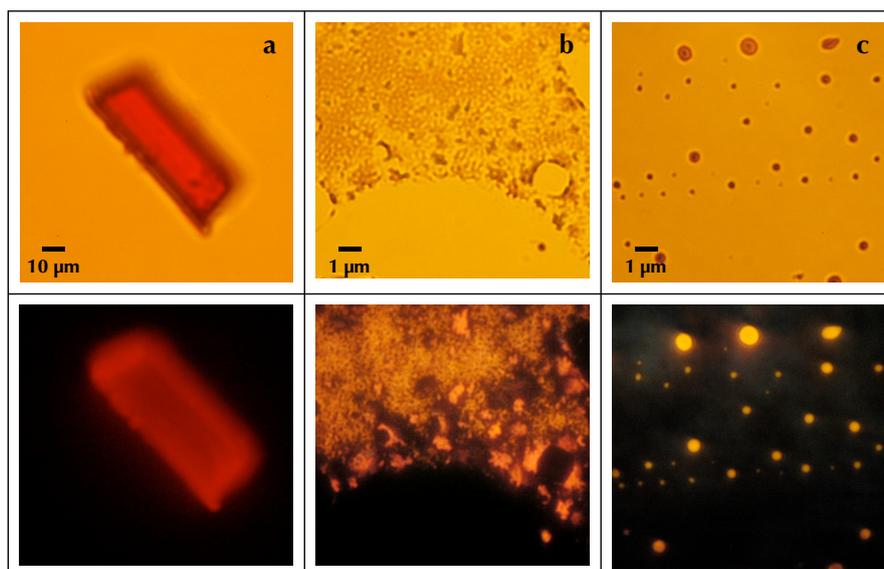


FIG. 4.5 – Photographies en transmission (en haut) et en fluorescence (en bas) des différents types d'échantillons étudiés. **a** : microcristal, **b** : film évaporé, **c** : film étiré.

épaisse³. Pour ce dernier type d'échantillon, un fond de fluorescence autour des particules est en général observé. Les résultats expérimentaux indiquent qu'il s'agit de la fluorescence de molécules isolées adsorbées sur la lamelle.

Le taux de cristallinité des objets étudiés est difficile à évaluer. La méthode la plus fiable consiste à utiliser la diffraction des rayons X, mais elle est lourde à mettre en œuvre, en particulier pour les films. Les structures cristallines de la majorité des Bodipy étudiés sont disponibles et les poudres observées en fluorescence correspondent à celles qui ont été utilisées pour la diffraction des rayons X. La spectroscopie Raman permet aussi de déterminer si un solide est cristallin ou amorphe. Des mesures de spectre Raman sous microscope ont été réalisées sur de la poudre et des films évaporés de TMB à l'ITODYS (Université Paris VII) en collaboration avec le Dr G.Levi et G. Laurent. Les spectres sont présentés figure 4.6. Le déplacement Raman est centré à $1\,200\text{ cm}^{-1}$ et le spectre est mesuré entre 970 et $1\,375\text{ cm}^{-1}$. Pour la poudre, le spectre présente trois pics à 1002 , 1172 et 1259 cm^{-1} . Ces pics sont bien résolus, ce qui indique que le solide est cristallin. Par contre, pour les films étirés, ces pics sont beaucoup moins intenses, voire invisibles. Quand le taux de cristallinité d'un solide diminue, les pics du spectre Raman s'élargissent et la valeur au maximum est moins élevée. Ces spectres confirment que la poudre est cristalline et montrent que les films évaporés sont majoritairement amorphes. Ces résultats ne sont, en théorie, valables que pour le TMB mais pour d'autres molécules, les mêmes structures sont observées sur les films

³Cette étude a été menée par Arnaud Brosseau, ingénieur au PPSM et Ryohei Yasukuni, qui a effectué un séjour d'un an au laboratoire dans le cadre de sa thèse.

évaporés et il semble que ces films soient aussi au moins partiellement amorphes.

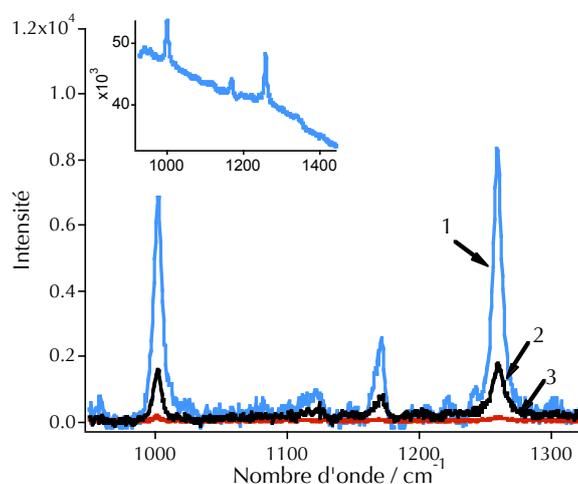


FIG. 4.6 – Spectres Raman du TMB; **1** : poudre; **2** et **3** : film évaporé. Encart : spectre brut de la poudre, le fond est dû à la fluorescence du cristal. Il a été éliminé des spectres présentés par une méthode de soustraction de ligne de base.

4.2.2 Mesures réalisées

Mesure des déclins Les différents types d'échantillons ont été observés en microscopie. Sauf mention contraire, la longueur d'onde d'excitation est de 495 nm. Les déclins correspondent à toutes les longueurs d'onde émises au delà de 500 nm, mais il est possible de sélectionner une gamme de longueur d'onde en plaçant un filtre à la sortie du microscope. La figure 4.7 montre une image d'intensité de fluorescence de cristaux de PM597. La figure 4.8 présente le FLIM correspondant. Les ROI qui ont été utilisées pour reconstruire les déclins de fluorescence sont dessinées sur cette image. Enfin la figure 4.9 est une aquarelle, c'est à dire une combinaison de l'image d'intensité et de l'image de FLIM. L'échelle de couleur correspond à la durée de vie et la luminosité à l'intensité de fluorescence.

Le FLIM montre que la durée de vie moyenne n'est pas homogène sur un cristal, et d'un cristal à l'autre. Dans ce cas, le déclin global, correspondant à tous les photons de l'image n'est pas pertinent, car il contient des informations correspondant à des objets différents. Il est préférable de considérer le déclin de chaque cristal. Les ROI sont dessinées sur des zones où la durée de vie moyenne est homogène. Les déclins correspondant aux ROI dessinées figure 4.8 sont présentés figure 4.10. Cette figure montre l'intérêt de reconstruire les déclins de fluorescence, puisque ceux-ci sont multiexponentiels, même pour une zone où la durée de vie moyenne est homogène. Le déclin apporte des informations supplémentaires.

L'exemples présenté ici montre qu'il y a une grande variation des propriétés observées sur

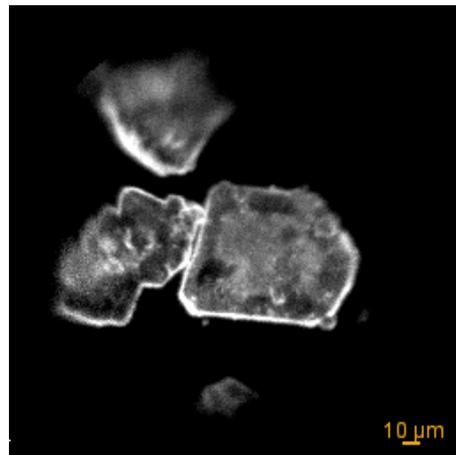


FIG. 4.7 – Image d'intensité de fluorescence de cristaux de PM597.

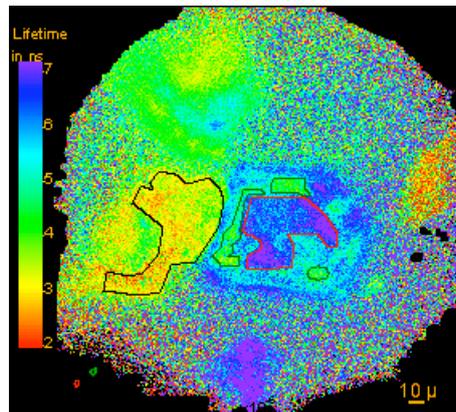


FIG. 4.8 – Image de durée de vie de fluorescence de cristaux de PM597. Les ROI représentées ont servis à reconstruire les déclinés de la figure 4.10.

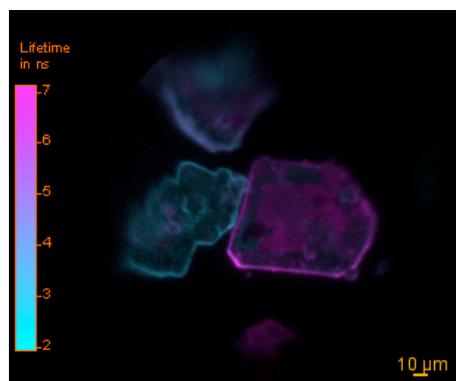


FIG. 4.9 – Aquarelle de cristaux de PM597.

un échantillon solide. Elle se retrouve pour les autres Bodipy étudiés. Elle a au moins deux origines : d'une part, en étudiant la fluorescence sous microscope, on sonde les propriétés locales de l'échantillon alors qu'avec les méthodes classiques, notamment en cuve, on mesure des propriétés moyennes sur un grand volume ; d'autre part, la fluorescence à l'état solide est sensible aux paramètres environnementaux tels que les défauts de structure et la présence d'impuretés.

Pour prendre en compte la variation des résultats, plusieurs images ont été enregistrées pour chaque molécule et les propriétés présentées dans ce manuscrit sont en général des valeurs moyennes.

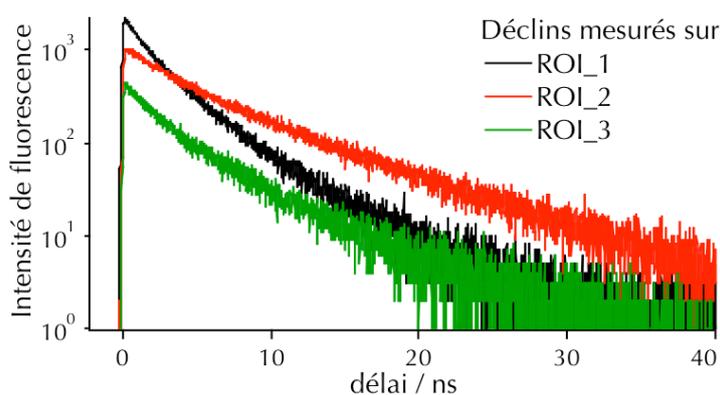


FIG. 4.10 – Déclinés de fluorescence reconstruits sur les ROI représentées figure 4.8, les couleurs des courbes correspondent aux couleurs des ROI représentées sur le FLIM.

Spectres Les spectres d'absorption et de fluorescence ont aussi été mesurés soit sous microscope avec un spectrophotomètre Ocean Optics S2000, soit avec des appareils classiques. Dans le premier cas, la lumière est amenée sur le spectrophotomètre par une fibre optique. Elle est ensuite dispersée par un réseau et détectée par une barrette CCD. La position sur cette barrette correspond à une longueur d'onde. Les spectres d'absorption sont mesurés en comparant le spectre de l'échantillon éclairé par la lampe blanche du microscope à celui de cette lampe. Pour des échantillons trop épais, l'absorption est rapidement saturée et il est difficile de mesurer un spectre pour les poudres avec ce dispositif. Il n'est actuellement pas possible de mesurer des spectres d'excitation sous microscope avec ce montage, car la longueur d'onde du laser ne peut pas être modifiée rapidement.

Les spectres d'absorption des films ont aussi été mesurés avec un CARY 500 (Varian). La lamelle de microscope est placée perpendiculairement au faisceau sur un support spécial, et il n'y a pas de référence. Les spectres de fluorescence ont été mesurés avec un SPEX - FLUOROLOG (Horiba - Jobin - Yvon) en position 'front - face', c'est à dire que l'angle entre le faisceau d'excitation et la direction de la lumière récoltée est d'une dizaine de degrés, ce qui permet de n'observer que la lumière émise près de la surface de l'échantillon. Pour les films, on évite ainsi les

perturbations dues à la diffraction de la lumière dans une couche mince. L'échantillon est placé de manière à ce que la lumière excitatrice réfléchiée par la lame ne soit pas dirigée vers le détecteur. Dans les deux cas, les propriétés mesurées sont des propriétés moyennes sur une zone de quelques millimètres carrés, ce qui est bien plus grand que la taille des objets formés sur la lamelle. Le SPEX permet aussi de mesurer des spectres d'excitation de fluorescence.

Enfin, les spectres d'absorption des poudres et de certains films ont été mesurés avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer équipé d'une sphère d'intégration. Ces mesures ont été faites à l'Institut Lavoisier de l'Université de Versailles Saint-Quentin en Yvelines. Dans ce cas, la poudre est placée entre deux lames de quartz et on prend deux lames similaires comme référence. La sphère d'intégration permet de collecter la lumière dans toutes les directions de l'espace. Il s'agit de la lumière diffusée par l'échantillon, qui donne une idée du spectre d'absorption.

4.2.3 Analyse des résultats

Les déclinés expérimentaux ont été ajustés par la méthode des moindres carrés grâce au logiciel Igor Pro, qui utilise l'algorithme de Levenberg-Marquardt [135]. Cette méthode minimise le paramètre χ^2 , qui permet d'évaluer la différence entre les données expérimentales et l'ajustement [124].

$$\chi^2 = \frac{1}{\nu} \sum_{i=1}^N \left[\frac{R(t_i) - R_c(t_i)}{\sigma(i)} \right]^2 \quad (4.5)$$

Avec $R(t)$ la mesure expérimentale, $R_c(t)$ l'ajustement, $\sigma(i)$, la déviation standard et ν le nombre de degrés de liberté, qui est égal au nombre de points, N , moins le nombre de paramètres de l'ajustement. Dans le cas du comptage de photon unique, ν est élevé et χ^2 est en théorie proche de 1. La statistique du nombre de photon par canal obéit à une distribution de type Poisson. Si le nombre de photon par canal est supérieur à 50, ce type de distribution coïncide avec une gaussienne et dans ce cas la déviation standard est égale à la racine carrée de l'ajustement. Pour déterminer χ^2 , on calcule donc la variance de la fonction :

$$\chi = \frac{R(t) - R_c(t)}{\sqrt{R_c(t)}} = \frac{\text{résidus}}{\sqrt{\text{ajustement}}} \quad (4.6)$$

Un ajustement est considéré comme correct si χ^2 est inférieur à 1,2 [124].

Plusieurs fonctions peuvent être utilisées pour l'ajustement :

Déclin monoexponentiel : $I(t) = A \exp(-t/\tau) + B$, A est la valeur de l'intensité à délai nul et B est égal au bruit de la mesure. Ce paramètre est proche de zéro. Il s'agit de l'évolution théorique du déclin de fluorescence d'une seule espèce.

Déclin biexponentiel : $I(t) = A \exp(-t/\tau_1) + B \exp(-t/\tau_2) + C$. Comme précédemment C correspond au bruit de la mesure. Ici, on considère qu'il y a deux espèces fluorescentes.

Déclin en racine de t : $I(t) = A \exp(-t/\tau_f - \sqrt{t/\tau_{1/2}}) + B$. Ce modèle décrit le cas où il y a un transfert d'énergie entre le fluorophore et ses voisins dans les trois dimensions de l'espace [136].

Si l'ajustement par les fonctions définies ci-dessus n'est pas possible, la durée de vie l'état excitée peut être estimée en calculant la durée de vie moyenne, c'est à dire :

$$\langle \tau \rangle = \frac{1}{N} \sum_1^N \tau_i \quad (4.7)$$

Cette grandeur a été déterminée pour tous les déclinés mesurés.

Les fonctions décrites ici correspondent à des modèles simples, où il n'y a qu'une ou deux populations de fluorophores. Or il y a une dispersion non négligeable des résultats. Afin d'évaluer l'ampleur de cette dispersion, une *décomposition en composantes principales*⁴ des spectres et des déclinés de fluorescence a été réalisée [128, 125]. Une famille de déclinés, ou de spectres, correspondant à la même molécule peut être décomposée sur une base de vecteurs orthonormés. Cette base contient autant de vecteurs que de courbes expérimentales, mais en général, seuls les premiers vecteurs de la base suffisent pour décrire l'ensemble des courbes. Une première analyse avec Igor Pro, permet de déterminer la contribution de chaque composante. On choisit ensuite de faire une décomposition des courbes sur les composantes ayant une contribution significative. Le calcul des résidus permet d'évaluer la pertinence de la décomposition. La base utilisée pour décrire les courbes n'a pas de signification physique, mais cette méthode permet quand même d'estimer le nombre d'espèces différentes contribuant à la fluorescence. Si ces espèces sont identifiées et que leurs déclinés, ou leurs spectres de fluorescence, sont connus on peut effectuer une décomposition de la famille de courbes sur cette base. On parle alors de *décomposition en composantes connues*. Cette analyse n'a pas pu être effectuée sur les données expérimentales recueillies au cours de ma thèse.

4.2.4 Analyse des structures cristallographiques

Les structures cristallographiques disponibles ont été visualisées avec le logiciel Mercury. Celui-ci permet de déterminer quels sont les plus proches voisins d'une molécule en étudiant les distances entre les atomes. La géométrie relative de deux molécules voisines peut être déterminée.

Quand les moments de transitions sont approximés par des dipôles ponctuels, l'énergie d'interaction Coulombienne U entre deux chromophores est donnée par la relation [120, 137] :

$$U = \frac{1}{4\pi\epsilon_0 n^2} \frac{\vec{M}_D \vec{M}_A}{R^3} \kappa, \quad \kappa = \cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A \quad (4.8)$$

Avec \vec{M} les moments de transition du donneur et de l'accepteur, R la norme du vecteur reliant ces deux moments de transition, n l'indice de réfraction du milieu, et κ le facteur d'orientation.

⁴Cette méthode est aussi connue sous le nom d'analyse de variance.

θ_{DA} est l'angle entre les moments de transition, θ_D , θ_A sont les angles entre \vec{M} et \vec{R} . Dans le cas d'un couplage excitonique fort, U est proportionnel au dédoublement de la bande d'absorption selon la relation $U = hc\Delta\nu$ (h est la constante de Planck et c la vitesse de la lumière).

Les paramètres de cette formule peuvent être évalués pour les Bodipy étudiés. À part pour le TMB, les moments de transition des molécules voisines dans le solide sont colinéaires. On a donc $\theta_{DA}=0$, $\theta_D = \theta_A$ et $\kappa = 1 - 3\cos^2\theta_D$. Ces moments de transition sont dirigés selon l'axe $C_2 \rightarrow C_6$ (cf. figure 4.11). Si les vecteurs $C_2\vec{C}_6$ et $C'_2\vec{C}'_6$ pointent dans la même direction, la distance $C_8C'_8$ correspond à R et $\theta_D = \widehat{C_2C_6C'_6}$. Dans le cas contraire on prend la distance C_8B' et l'angle $\widehat{C_2C_6C'_2}$. La valeur du moment de transition est évaluée à partir de la force d'oscillateur de la molécule en solution. Dans chaque structure, plusieurs paires de molécules ont été identifiées et l'énergie U a été calculée pour chaque paire.

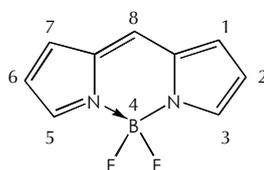


FIG. 4.11 – Structure du 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène

La formule qui a été utilisée ici est loin de donner des valeurs fiables pour des molécules dans un solide car les agrégats comportent alors plus de deux molécules et les interactions conduisant à un déplacement des spectres impliquent plusieurs molécules [138]. De plus, l'approximation des dipôles ponctuels n'est valable que si la distance intermoléculaire est grande devant les dimensions de la molécule. Or ici, les distances intermoléculaires les plus faibles sont d'environ 5 Å alors que la distance $C_2 - C_6$ est proche de 6 Å. Pour un solide, le modèle du dipôle est plus approprié pour décrire les interactions. Cependant, le calcul correspondant doit être fait en simulation numérique. Un tel calcul est en cours de réalisation par Jean-Pierre Lemaître (INSP - Paris).

Le calcul de U permet quand même une approche qualitative. En particulier, le facteur d'orientation κ détermine le signe de l'énergie d'interaction. Il est possible de généraliser la notion d'agrégat H et J, qui a été exposée dans le chapitre 1, en considérant qu'on a un agrégat H pour $\kappa > 0$ et un agrégat J pour $\kappa < 0$. Si $\theta_{DA} = 0$, soit $\kappa = 1 - 3\cos^2\theta_D$, la limite entre les deux types d'agrégats correspond à $\theta_D = 56^\circ$.

Chapitre 5

Ingénierie moléculaire

Il a été démontré que, dans certains cas, si les fluorophores sont suffisamment éloignés les uns des autres dans le cristal alors la fluorescence du solide est proche de celle de la molécule en solution [25, 27]. Un arrangement particulier des molécules dans le cristal peut conduire à une fluorescence efficace. Par exemple, le pérylène diimide S9, sur lequel sont greffées des chaînes alkyles branchées, a de bonnes propriétés de fluorescence à l'état solide, car ces chaînes induisent une configuration favorable des fluorophores [26]. Lewis et Yang ont étudié la fluorescence de cristaux de dicarboxamides aromatiques [24]. Dans le cristal, les molécules sont liées entre elles par des liaisons hydrogène intermoléculaires entre les fonctions amides. Selon la nature du groupe aromatique placé entre les deux amides, les molécules s'organisent sous forme de colonnes ou sous forme de feuillets. Dans ce second cas, les fluorophores sont éloignés les uns des autres et la fluorescence du cristal est celle d'un monomère, alors que si la structure permet un empilement des chromophores, la formation de dimères est observée. Il a aussi été démontré que la fonctionnalisation d'un fluorophore par différents types de groupements fonctionnels peut permettre de moduler la fluorescence à l'état solide [139, 27].

Dans ce cadre, une collaboration avec l'équipe du Pr. Boris Trofimov de l'institut de Chimie d'Irkoutsk a été initiée afin de synthétiser des Bodipy à partir de pyrroles encombrés [84, 79]. Plusieurs groupements, qui sont placés en position C₃ et C₅ du Bodipy ont été choisis et à chaque fois plusieurs pyrroles, avec des chaînes alkyles plus ou moins longues sur le carbone voisin du carbone fonctionnalisé, ont été envisagés. Cette synthèse peut prendre plusieurs mois et les pyrroles prévus n'ont pas tous pu être préparés. Ce travail est toujours en cours. Au cours de ma thèse j'ai étudié deux types de molécules : le TMB et les pcp-BDY.

5.1 TrimésitylBodipy - TMB

Cette molécule a été étudiée sous deux formes : des films évaporés et des poudres. Les films ont été préparés à partir de solutions de dichlorobenzène et de dichlorométhane. La poudre issue de la synthèse ainsi que les cristaux préparés à Grenoble pour déterminer la structure cristallographique ont été observés. Les spectres d'absorption et de fluorescence de ces échantillons sont présentés figure 5.1, et les déclins obtenus à partir des images de FLIM sont présentés figure 5.2. Les données expérimentales sont rassemblées table 5.2.

5.1.1 Films évaporés

Les spectres d'absorption et de fluorescence des films évaporés préparés à partir du TMB dissous dans le dichlorobenzène ont été mesurés avec le CARY et le SPEX. Ils sont présentés figure 5.1 **a** et **b**. Les spectres d'absorption sont similaires à ceux de la molécule en solution, mais ils sont plus larges. La largeur à mi-hauteur est d'environ 1250 cm^{-1} , alors qu'elle est de 918 cm^{-1} pour le TMB dans le dichlorobenzène. Le maximum d'absorption se situe à 550 nm, contre 544 nm dans le dichlorobenzène, soit $\Delta\nu \approx 200 \text{ cm}^{-1}$. Deux spectres d'excitation de fluorescence ont été mesurés, et leur forme est similaire à celle des spectres d'absorption. Les spectres de fluorescence possèdent une bande de faible largeur, centrée à 564 nm, et des bandes plus larges à plus grandes longueurs d'onde. Plusieurs maxima ont été identifiés vers 600, 620 et 650 nm.

Ces films ont aussi été étudiés en microscopie. Des spectres d'absorption ont été mesurés. Deux types de spectres ont été observés : les premiers, dont l'absorbance maximale est faible, ont une forme similaire à celle des spectres mesurés sur une zone plus large, par contre, les spectres plus intenses, semblent présenter plus de bandes, à plus faible mais aussi à plus grande longueur d'onde par rapport au TMB en solution. Les spectres de fluorescence ont la même forme que les spectres mesurés avec le SPEX, mais une variation de la position de la première bande est observée.

Les déclins de fluorescence sont multiexponentiels, avec une durée de vie moyenne de 1 ns environ. Des images ont été réalisées en plaçant des filtres passe-bande devant le QA. Elles sont présentées figure 5.3. Ceci permet de mesurer le déclin de fluorescence correspondant à chaque bande du spectre. Trois filtres ont été utilisés : le premier est un filtre passe-bande centré à 560 nm, le second un filtre passe-bande centré à 619 nm et le troisième un filtre passe-haut éliminant les longueurs d'onde inférieures à 645 nm. Le déclin correspondant à la fluorescence à 560 nm est plus court que celui mesuré sans filtre, et ceux mesurés avec les deux autres filtres sont plus longs. De plus, l'intensité de fluorescence est homogène sur le solide dans le premier cas, alors que des zones où la fluorescence est plus intense apparaissent avec les deux autres filtres.

Dans les films évaporés de TMB, préparés à partir d'une solution de dichlorobenzène, on observe donc la fluorescence du monomère, autour de 560 nm et des bandes correspondant à la

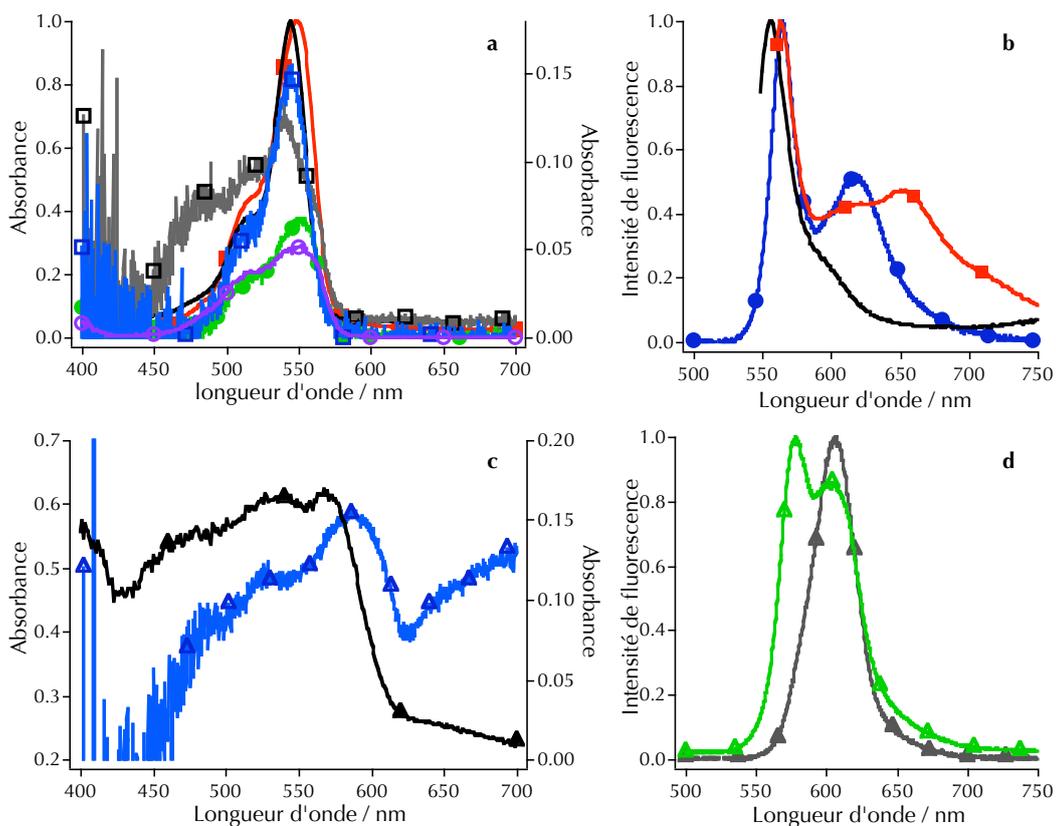


FIG. 5.1 – Spectres d'absorption (à gauche) et de fluorescence (à droite) du TMB sous différentes formes; — molécule en solution; ■, □ : film évaporé - dichlorobenzène; ●, ○ : film évaporé - dichlorométhane; ▲, △ : poudre.

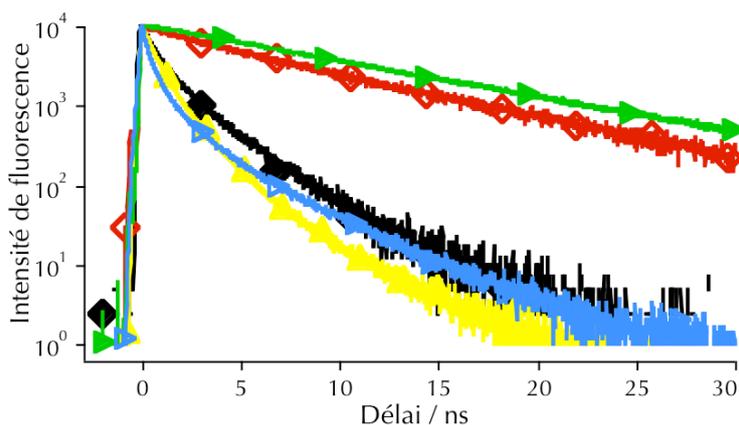


FIG. 5.2 – Déclins de fluorescence du TMB; ▲ : film évaporé - dichlorométhane; ► : cristaux obtenus après la synthèse; ▷ : cristaux obtenus après la synthèse et écrasés sur la lamelle de microscope; ◆ : cristaux préparés à Grenoble, exemple 1; ◇ : cristaux préparés à Grenoble, exemple 2.

formation d'agrégats. L'imagerie de fluorescence montre que le monomère est présent dans tout le solide, alors que la répartition des agrégats est inhomogène. Les déclin de fluorescence indiquent qu'il y a un quenching de la fluorescence du monomère par ces agrégats.

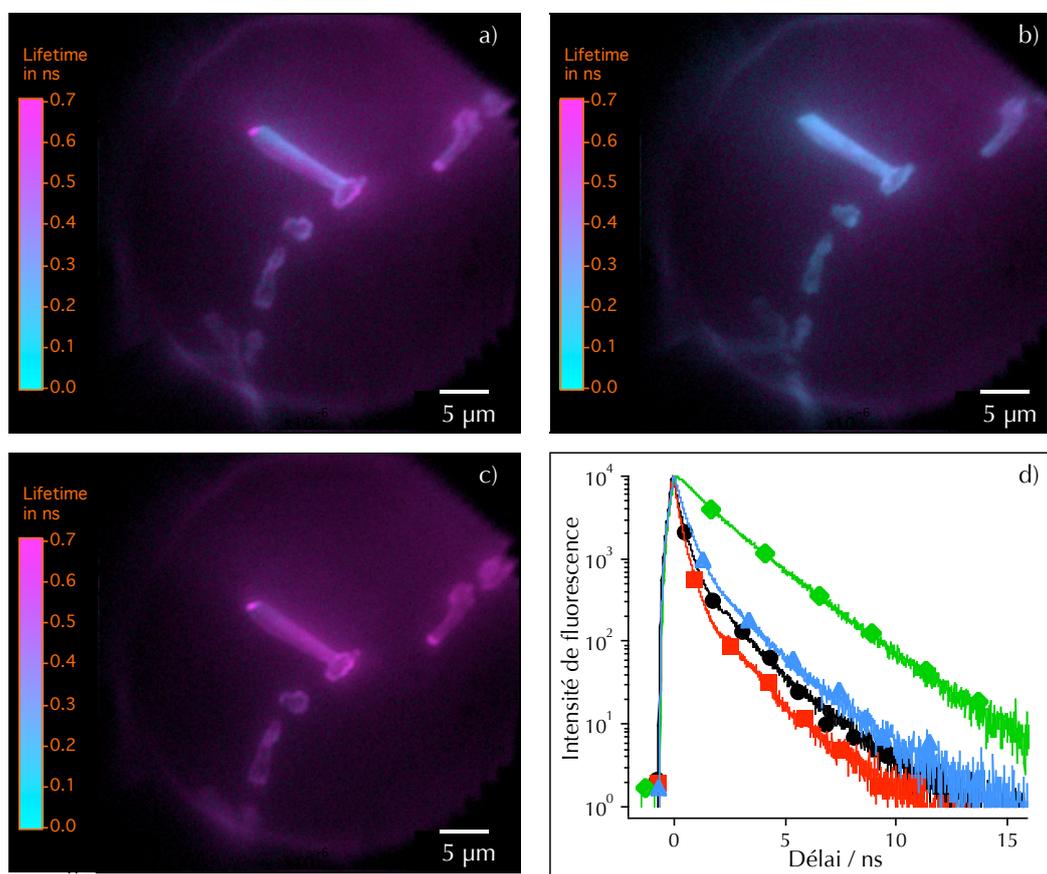


FIG. 5.3 – Aquarelles d'un film préparé par évaporation d'une solution de TMB dans le dichlorobenzène. **a** : image sans filtre ; **b** : image avec un filtre passe-bande centré à 560 nm ; **c** : image avec un filtre passe-bande centré à 619 nm, l'image mesurée avec le filtre passe-bande centré à 645 nm est similaire ; **d** : déclin de fluorescence correspondants, ● : sans filtre, ■ : filtre passe bande centré à 560 nm, ▲ : filtre passe-bande centré à 619 nm, ◆ : filtre passe-haut coupant à 645 nm. Le premier filtre correspond à la fluorescence du monomère, les deux autres à la fluorescence des agrégats.

Les films évaporés de TMB préparés à partir d'une solution de dichlorométhane n'ont été étudiés que sous microscope et un spectre d'absorption a été enregistré avec le spectrophotomètre équipé d'une sphère intégratrice. Dans les deux cas, la forme du spectre d'absorption est similaire à celle des premiers films étudiés, c'est à dire qu'il est élargi par rapport au spectre en solution et légèrement déplacé vers les grandes longueurs d'onde. La maximum est à 552 cm^{-1} , soit $\Delta\nu \approx 300 \text{ cm}^{-1}$ par rapport au spectre mesuré en solution. En fluorescence, on observe toujours la

bande du monomère vers 569 nm, mais il n'y a qu'une seule bande correspondant à la formation d'agrégats, centrée autour de 620 nm. Les déclin sont multiexponentiels avec une durée de vie moyenne de 1,5 ns environ. La présence d'un seul type d'agrégat fluorescent peut être due au fait que le dichlorométhane s'évapore plus vite que le dichlorobenzène : les molécules ont moins de temps pour s'organiser et seuls les agrégats les plus stables sont formés.

Dans les deux types de films étudiés, il y a donc coexistence du monomère, dont les propriétés spectroscopiques sont similaires à celles de la molécule en solution, et d'agrégats fluorescents. Les spectres d'absorption sont peu modifiés par rapport aux spectres mesurés en solution, ce qui indique que l'espèce majoritaire est une molécule interagissant peu avec ses voisines, soit le monomère. L'imagerie de fluorescence montre que ce monomère est réparti de manière homogène dans le solide. Sa fluorescence est quenchée avec la même efficacité dans tout le film, alors que les agrégats fluorescents sont plutôt localisés à la périphérie des dépôts. La fluorescence du monomère est donc éteinte par les agrégats fluorescents, mais aussi par des espèces non fluorescentes, qui peuvent être des agrégats de TMB ou des impuretés.

5.1.2 Poudre

Dans un premier temps, la poudre issue de la purification du mélange réactionnel a été observée. Un spectre d'absorption a été mesuré avec la sphère intégratrice. La bande correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est dédoublée, avec un maximum à 565 nm et un autre vers 540 nm, soit $\Delta\nu \approx 820 \text{ cm}^{-1}$ entre ces deux bandes (cf. figure 5.1-c). Quatre images ont été réalisées. Les spectres de fluorescence présentent deux bandes, l'une à environ 570 nm et l'autre autour de 605 nm (cf. figure 5.1-d). Les déclin de fluorescence sont un peu plus longs que pour les films évaporés, avec des durées de vie moyennes entre 1 et 2,85 ns.

Des cristaux obtenus par réprécipitation dans un mélange dichlorométhane - cyclohexane ont ensuite été étudiés. Les spectres de fluorescence comportent une seule bande centrée à 608 ± 3 nm, et la durée de vie moyenne de l'état excité est de $8,15 \pm 2,02$ ns. Il a été possible de réaliser un ajustement par une fonction monoexponentielle du déclin correspondant à un cristal d'environ 50 microns. La durée de vie obtenue est de 9,5 ns et la durée de vie moyenne est homogène sur le cristal. Le spectre d'absorption d'un autre cristal a été mesuré sous microscope. Il comporte deux maxima, le premier à 527 nm et le second à 587 nm, soit $\Delta\nu \approx 1940 \text{ cm}^{-1}$. Enfin, si on écrase ces cristaux, les spectres d'absorption et de fluorescence sont similaires à ceux du monomère et le déclin est multiexponentiel et court (cf. figure 5.2).

Une recristallisation a aussi été réalisée à Grenoble, par Isabelle Gauthier-Luneau. Ces cristaux ont permis de déterminer la structure cristallographique du TMB par diffraction des rayons X. Ils ont ensuite été étudiés en imagerie de fluorescence. Les spectres de fluorescence présentent deux maxima, à $577 \pm 2,6$ nm et à $605 \pm 2,6$ nm. 45 déclin ont été reconstruits à partir de ces images. Il y a une variation importante des durées de vie moyennes : la moyenne est de $5,03 \pm 2,25$ ns,

soit une variation de 45 %. Les cristaux sont plus sombres que ceux formés juste après la synthèse, ce qui pourrait être dû à une altération des molécules à la surface. Un cristal de 2 millimètres de diamètre a été écrasé entre deux lamelles de microscope afin de former des cristaux plus petits. Ceux-ci sont plus clairs, et la durée de vie moyenne est de $5,65 \pm 2,13$ ns (38 %). Dans certains cas, la durée de vie est assez longue, autour de 8 ns. Il est aussi possible d'ajuster le déclin de fluorescence de certains cristaux par une fonction monoexponentielle. La durée de vie est de $6,59 \pm 1,39$ ns. Par contre, la durée de vie correspondant à des cristaux entiers est de $3,90 \pm 2,04$ ns (52 %). Il y a donc une espèce qui éteint la fluorescence des cristaux.

À l'état cristallin, le TMB forme un agrégat fluorescent, dont le maximum de fluorescence est situé à 605 nm. La durée de vie de fluorescence de cette espèce est d'environ 8 ns, ce qui est supérieur à la durée de vie mesurée en solution. Cependant, la fluorescence de cette espèce est sensible à la présence d'impuretés.

5.1.3 Structure cristallographique

La structure cristallographique du TMB a été difficile à résoudre car l'organisation des molécules dans le solide est compliquée. Il existe deux molécules de géométrie légèrement différente dans le solide (cf. figure 3.9). Les plans contenant les noyaux Bodipy de deux molécules voisines ne sont pas parallèles. Pour les autres structures qui ont été étudiées, c'est en général le cas (cf. chapitres suivants). Il semble donc que les groupements mésityles empêchent l'empilement des molécules.

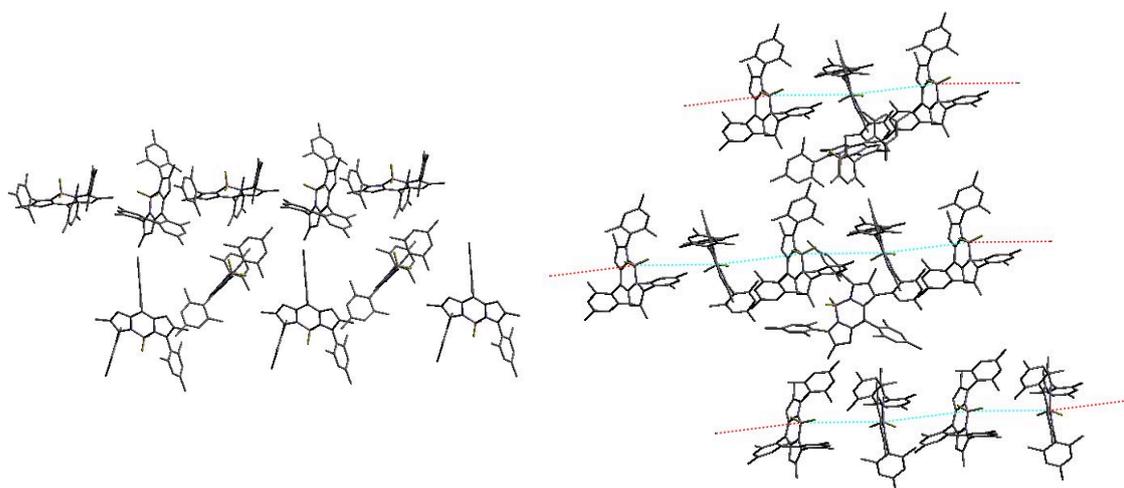


FIG. 5.4 – Empilement des molécules de TMB dans le cristal.

Si on considère les molécules les plus proches dans le solide, il est possible de former un alignement de molécules où les noyaux Bodipy sont parallèles, comme cela est montré à gauche sur la figure 5.4. Cependant la distance entre deux molécules est de 15,644 Å ou de 17,152 Å,

selon les cas, et le calcul de l'énergie d'interaction conduit à un dédoublement de bande l'ordre de quelques dizaines de cm^{-1} , ce qui ne correspond pas à ce qui est observé sur les spectres d'absorption des poudres. Par contre, si on considère la distance B - B', qui pour des molécules non parallèles est une estimation de la distance intermoléculaire, il y a une molécule à $d_{B-B'} = 7,870 \text{ \AA}$ et $d_{C_8-C'_8} = 9,138 \text{ \AA}$, avec $\theta_{DA} = 6,73^\circ$. Bien que ces molécules ne soient pas dans des plans parallèles, elles sont face à face. Cette chaîne de molécules est représentée figure 5.4, à droite. La distance R entre les molécules, qui est assimilée à la distance entre les barycentres des vecteurs Bore - C_8 , a été calculée à partir des coordonnées des atomes dans un repère cartésien. On trouve $R = 8,06 \text{ \AA}$. De la même manière, on peut calculer θ_D et θ_A ¹. Le calcul donne $\theta_D = 96,60^\circ$ et $\theta_A = 98,31^\circ$. La facteur d'orientation entre deux molécules voisines est $\kappa = 0,943$, et le dédoublement de bande théorique² est $\Delta\nu * n^2 = 311 \text{ cm}^{-1}$. La valeur du dédoublement de bande estimée à partir des spectres d'absorption est deux à six fois plus importante. Il y a donc une interaction plus importante dans le solide, car l'énergie est délocalisée sur plusieurs molécules [16].

À l'état cristallin, il se forme un agrégat fluorescent, qui correspond à une interaction entre plusieurs molécules. Mais la fluorescence de cette espèce est facilement quenchée. La durée de vie de cette espèce est plus longue que celle du monomère, ce qui indique que la transition correspondante est interdite.

5.2 ParacyclophanylBodipy - pcp-BDY

Seulement quelques milligrammes de chaque fraction ont été obtenus à l'issue de la première synthèse. Il n'a donc pas été possible d'obtenir des cristaux, et les pcp-BDY ont été étudiés sous forme de films évaporés à partir d'une solution de dichlorométhane. Les résultats obtenus sont rassemblés table 5.2.

Pour les deux fractions de hpcp-BDY, le spectre d'absorption des films est très large et il n'y a pas de rebond vibrationnel. Le maximum est déplacé de 10 nm vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre dans le dichlorométhane, ce qui correspond à une différence d'énergie de 290 cm^{-1} . Les spectres de fluorescence sont aussi déplacés vers le rouge, de 968 cm^{-1} pour la fraction 1 et de 919 cm^{-1} pour la fraction 2. Les déclin de fluorescence sont multiexponentiels, avec une durée de vie moyenne de l'ordre de 2,5 ns. Ces données indiquent qu'il y a une interaction non négligeable entre les fluorophores dans le solide.

Par contre, les propriétés spectroscopiques de l'epcp-BDY et du ppcp-BDY sont assez proches de celles des molécules en solution dans le dichlorométhane. Les spectres d'absorption mesurés

¹Le produit scalaire de deux vecteurs est égal au produit des normes de chaque vecteur et du cosinus de l'angle entre ces vecteurs

²La valeur de l'indice de réfraction du solide n'est pas connue, et l'énergie correspondant au dédoublement de bande donnée ici est la valeur maximale.

sous microscope sont plus larges que les spectres en solution, mais leur forme est similaire. Les spectres de fluorescence présentent une seule bande. Les différences d'énergie entre le solide et la solution sont rassemblées dans le tableau suivant :

	hpcp-BDY		epcp-BDY		ppcp-BDY	
	f1	f2	f1	f2	f1	f2
$\Delta\nu(cm^{-1})$	968	919	209	154	234	378

TAB. 5.1 – Différences d'énergie entre le maximum de fluorescence des films étirés et celui des molécules en solution dans le dichlorométhane.

L'émission de fluorescence des films est donc similaire à celle de la molécule isolée. Pour certains films, les déclin de fluorescence peuvent être ajustés par une fonction monoexponentielle, avec une durée de vie entre 3 et 5 ns, selon les cas, ce qui est plus faible que la durée de vie mesurée en solution. Lorsque le déclin est multiexponentiel, il comporte une composante très courte (< 1 ns) et une composante assez longue de quelques nanosecondes.

La deuxième synthèse de pcp-BDY a donné plus de produit, ce qui a permis d'étudier les poudres. Seule la molécule ppcp-BDY a été étudiée. La poudre brute non purifiée est faiblement fluorescente, et les déclin de fluorescence sont multiexponentiels, avec une durée de vie moyenne autour de 1,5 ns. La chromatographie sur couche mince (CCM) montre que cette poudre est un mélange de trois composés. Il y a deux taches proches sur la plaque, qui sont les deux isomères du Bodipy, et une troisième qui pourrait correspondre au Bodipy hydrolysé au niveau de la liaison B - F. Une chromatographie sur colonne a permis d'obtenir deux fractions. La CCM montre que la première fraction, f1, contient un mélange des deux isomères, et que la seconde fraction, f2, contient l'un des deux isomères et le produit hydrolysé.

La fraction f1 a été étudiée sous forme de poudre, de film évaporé et de film étiré. À puissance laser équivalente, l'intensité de fluorescence de cette fraction est beaucoup plus importante que celle du brut. Pour la poudre, les spectres de fluorescence présentent trois maxima, à 620, 650 et 680 nm. Le premier maximum correspond au monomère, et les deux suivants à la formation d'agrégats. Il n'y a pas suffisamment de spectres pour faire une décomposition en composantes principales. Les déclin de fluorescence sont assez longs, avec une durée de vie moyenne de $3,83 \pm 0,47$ ns. La décomposition en composantes principales donne des résultats satisfaisants avec 5 composantes. Par ailleurs, l'ajustement en racine de t des déclin est possible avec $\tau_f = 5,39 \pm 0,40$ et $\tau_{1/2}$ varie entre 3,2 ns et 21 ns. La faible variation de τ_f (7,4 %), semble indiquer qu'il y a une espèce fluorescente dans le solide qui est quenchée par un transfert d'énergie vers d'autres espèces. Cela indique aussi qu'il n'y a pas de migration de l'énergie d'excitation dans le solide. En effet ce phénomène est décrit par un terme en $\exp(-\alpha t)$ dans le déclin (cf. paragraphe 1.2.2) [21]. Le paramètre α étant dépendant de la concentration en impureté, une variation de la durée de vie déduite de l'ajustement est observée quand il y a une migration de l'énergie. Le quenching de la

fluorescence est plus ou moins important selon la zone observée, ce qui traduit une variation de la concentration d'impuretés. D'après les données spectroscopiques, on peut supposer que l'espèce fluorescente mise en évidence ici est le monomère.

Un spectre de fluorescence d'un film évaporé de la fraction f1 a été mesuré, il présente une bande à 628 nm. Les déclin de fluorescence mesurés sur ce film sont courts et multiexponentiels avec une durée de vie moyenne de $1,19 \pm 0,44$ ns. Les spectres d'absorption des films étirés³ sont similaires à ceux mesurés en solution. Le maximum d'absorption se situe à 584 nm. Les spectres de fluorescence de ces films possèdent un maximum à 626 ± 5 nm. L'imagerie de fluorescence met en évidence deux populations différentes : les particules solides formées lors de l'évaporation du solvant, et une pellicule de molécules isolées déposées sur la lamelle. Les déclin de fluorescence correspondant à la totalité de l'image possèdent une composante courte et une composante longue. La première correspond aux particules et la seconde aux molécules isolées. La durée de vie moyenne du déclin de fluorescence des particules, qui est déterminé en traçant des ROI, est de $1,59 \pm 0,32$ ns et celle du fond de $4,14 \pm 0,55$ ns.

La fraction f2 n'a pas formé de cristaux et un solide pâteux a été étudié. Les propriétés spectroscopiques de ce solide sont similaires à celles des films évaporés et des films étirés. Deux bandes apparaissent sur les spectres de fluorescence, centrées à 626 et 695 nm. Les déclin de fluorescence sont multiexponentiels et la durée de vie moyenne est de $1,66 \pm 0,75$ ns.

La fluorescence des films de pcp-BDY à l'état solide est donc proche de celle des fluorophores en solution. L'ajout d'un groupement paracyclophane sur le noyau Bodipy a donc permis de limiter les interactions entre les fluorophores dans le solide, mais ce n'est pas suffisant, puisque d'une part la formation d'agrégats fluorescents est observée pour le hpcp-BDY, ce qui signifie que la présence de chaînes alkyles en positions C₂ et C₆ est nécessaire, et d'autre part, plusieurs espèces fluorescentes coexistent quand même dans la poudre. Enfin, la pureté de la fraction étudiée est un paramètre critique pour la fluorescence du solide.

³Ces spectres ont été mesurés par Thanh Truc Vu dans le cadre de son stage de Master 2° année.

Molécule	Forme	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	Ajustement mono- exponentiel
TMB	Solution	543	556		6,30
	Film évaporé (C ₆ H ₄ Cl ₂)	550	564 - 600 620 - 650	1,00	
	Film évaporé	553	569 - 620	1,5	
	Poudre brute	540 - 565	570 - 605	≈ 1 - 2	
	Poudre recristallisée	527 - 587	608 ± 3	8,15 ± 2,02	9,5
	Poudre utilisée pour les RX	535 - 565	577 ± 2,6 605 ± 2,6	5,03 ± 2,25	
hpcp-BDY f1	Solution	550	592		5,47
	Film évaporé	559	628 ± 1,5	2,55 ± 0,34	
hpcp-BDY f2	Solution	551	600		5,52
	Film évaporé	560	635 ± 2,5	2,60 ± 0,35	
epcp-BDY f1	Solution	588	615		6,27
	Film évaporé	589	623 ± 2,4		3,39 ± 0,3
epcp-BDY f2	Solution	588	622		6,38
	Film évaporé		628 ± 6	4,57 ± 1,7	
	Film évaporé		628 ± 6		4,37 ± 0,7
ppcp-BDY f1	Solution	589	616		6,20
	Film évaporé	593	625 ± 3		5,31 ± 0,4
	Film évaporé		625 ± 3	2,98 ± 0,18	
ppcp-BDY f2	Solution	589	622		6,42
	Film évaporé	593	637 ± 7	1,96 ± 1,14	
ppcp-BDY f1 (synthèse 2007)	Solution	589	614		6,37
	Film évaporé		628	1,19 ± 0,44	
	Film étiré	584 ± 0,5	626 ± 5	1,59 ± 0,32 (solide) 4,14 ± 0,55 (fond)	
	Poudre		620 - 650 680	3,83 ± 0,47	

TAB. 5.2 – *Bodipy* encombrés. Propriétés spectroscopiques. Sauf mention contraire, les films ont été préparés à partir d'une solution de dichlorométhane. λ_{abs} : maximum du spectre d'absorption, λ_{em} : maximum du spectre de fluorescence, $\langle \tau \rangle$: durée de vie moyenne.

5.3 Bilan

La fonctionnalisation des Bodipy par des groupements encombrants donne des résultats encourageants, puisque pour trois des quatre molécules étudiées, on observe, à l'état amorphe, la fluorescence du monomère. Pour le epcp-BDY et le ppcp-BDY, seule cette fluorescence est observée. Par contre, pour le TMB, il se forme aussi des agrégats fluorescents et à l'état cristallin, la fluorescence est celle d'un autre type d'agrégat. Pour toutes ces molécules la présence d'impuretés modifie la fluorescence de manière importante.

De nouveaux pyrroles et Bodipy ont été synthétisés ces derniers mois au laboratoire. En particulier, un trimésityl-Bodipy avec des groupements éthyles en position C₂ et C₆ a été préparé. L'étude de sa fluorescence permettra de déterminer l'influence de la longueur de la chaîne alkyle à cette position. L'utilisation de groupements non aromatiques est aussi en projet. Par exemple, la synthèse d'un Bodipy fonctionnalisé par des adamantanes est envisagée.

Enfin, les données spectroscopiques sur les pcp-BDY sont à compléter. En particulier, il faudrait déterminer si les solides étudiés sont amorphes ou cristallins. Si cela est techniquement possible, la détermination de la structure cristalline de ces molécules serait intéressante.

Chapitre 6

Criblage d'une famille de Bodipy

6.1 Cryptobodipy - Série 1

6.1.1 Résultats

Dans un premier temps, cinq molécules ont été étudiées, les molécules BDY-1 à BDY-5. Il s'agit de molécules synthétisées par Christine Goze pendant sa thèse. Nous avons sélectionné ces molécules car leur structure cristallographique a été déterminée. Les poudres, des films évaporés et des films étirés ont été étudiés. Les spectres d'émission et les déclinés de fluorescence, représentatifs des propriétés moyennes observées sur les échantillons, sont présentés figure 6.1, les données expérimentales sont rassemblées table 6.1. Dans chaque cas, une dizaine de mesures a été réalisée sur les poudres et environ cinq images ont été enregistrées pour les films. Pour toutes ces molécules, les déclinés sont multiexponentiels et les spectres présentent en général plusieurs maxima.

La taille des cristaux varie entre quelques dizaines de microns et le millimètre. Des cristaux de tailles différentes ont été étudiés. Les molécules BDY-1 et BDY-3 forment des cristaux en aiguilles. Pour les molécules BDY-2 et BDY-5, on observe des cristaux de faible épaisseur (quelques microns). Dans le premier cas, ils sont en forme de plaquettes et dans le second cas, ils sont rectangulaires. Enfin, les cristaux de BDY-4 ont des dimensions similaires dans les trois directions de l'espace. Pour les films évaporés et étirés, les structures observées sont similaires d'une molécule à l'autre, sauf pour les films étirés de BDY-4, où il semble y avoir un début de cristallisation.

Les spectres de fluorescence des poudres de BDY-1 possèdent un maximum principal à 647 nm, avec des épaulements vers 590 et 700 nm. La durée de vie moyenne est de $1,22 \pm 0,12$ ns, soit une variation de 10% par rapport à la valeur moyenne, ce qui est faible comparé aux autres solides étudiés. Le maximum des spectres de fluorescence du BDY-2 est situé à 590 nm et la largeur à mi-hauteur est de $1\ 900\ \text{cm}^{-1}$ environ, ce qui est important. Les spectres mesurés sont très similaires mais le déclin de fluorescence varie de manière significative d'une mesure à l'autre avec une durée de vie moyenne de $2,50 \pm 1,04$, soit une variation de 42% par rapport

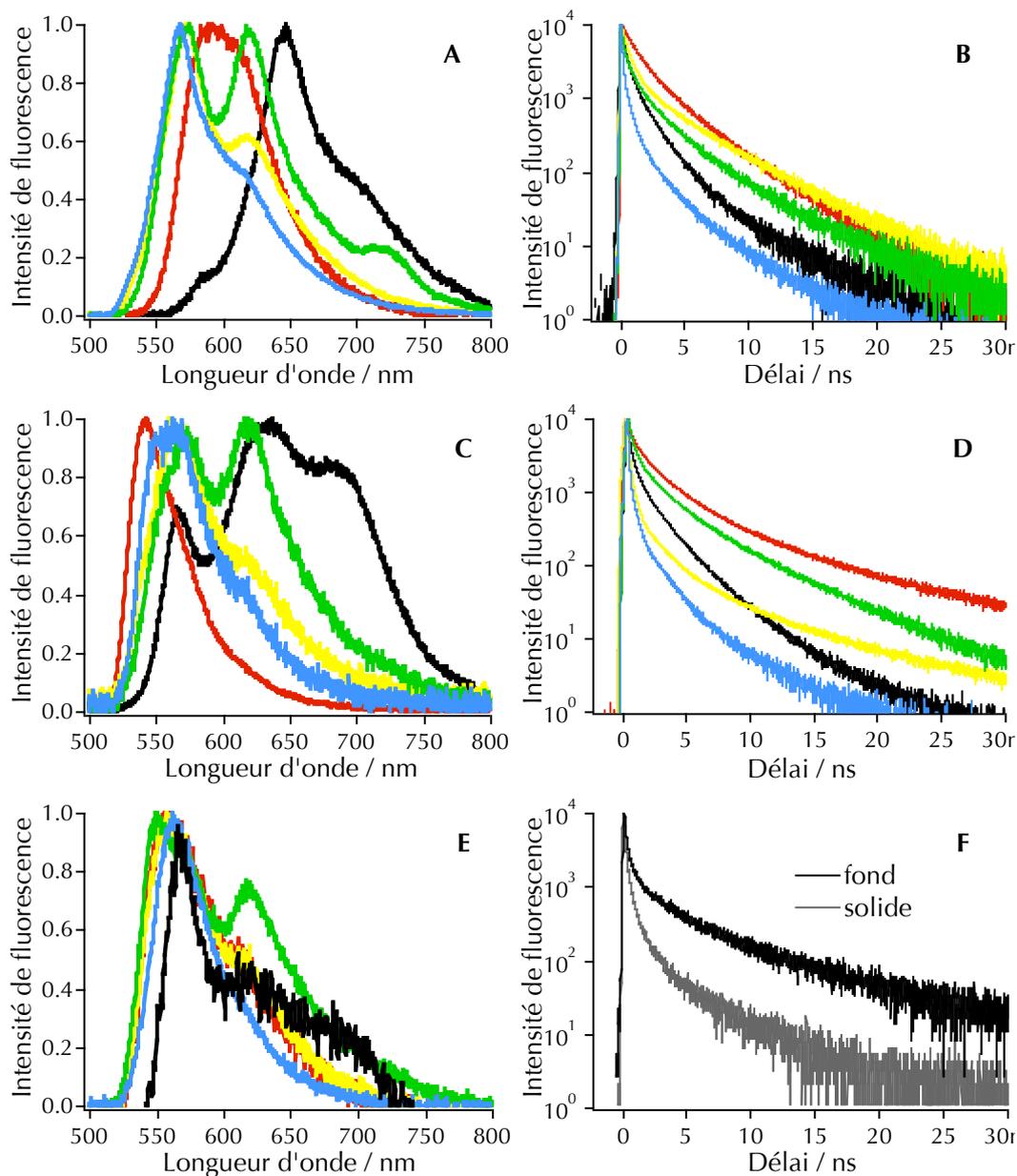


FIG. 6.1 – Spectres et déclin de fluorescence des Bodipy de la série 1; Noir : BDY-1; Rouge : BDY-2; Jaune : BDY-3; Vert : BDY-4; Bleu : BDY-5. A et B : Poudre; C et D : Films évaporés; E : Films étirés; F : BDY-2, film étiré déclin mesuré sur le solide et sur le fond.

Nom	CH ₂ Cl ₂		Poudre		Films évaporés			Films étirés		
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	τ (ns)	λ_{em} (nm)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	λ_{em} (nm)	$\langle \tau \rangle$ (ns)
BDY-1	529	541	7,0	647 ± 1	1,22 ± 0,12	546	563 - 634 674	1,6	560	1,24 ± 0,1
BDY-2	517	528	6,2	590 ± 4	2,50 ± 1,04	530	543	4,4	558	1,30 ± 0,41
BDY-3	516	532	9,0	573 ± 3 618 ± 3	2,84 ± 0,54	522 495	570 620	1,91	555 620	1,06 ± 0,10
BDY-4	515	531	8,0	574 ± 9 616 ± 2	2,75 ± 0,48		573 617	3,0	540 - 560 620	1,96 ± 0,33
BDY-5	514	544	6,0	567 ± 2	1,00 ± 0,14	529	560	1,20	565	0,82 ± 0,13

TAB. 6.1 – Cryptobodipy - Série 1. Propriétés spectroscopiques. λ_{abs} : maximum du spectre d'absorption, λ_{em} : maximum du spectre de fluorescence, τ durée de vie (ajustement par une fonction monoexponentielle), $\langle \tau \rangle$: durée de vie moyenne. Les films ont été préparés à partir d'une solution de Bodipy dans le dichlorométhane.

à la moyenne. Les spectres de fluorescence des molécules BDY-3 et BDY-4 sont similaires : ils comportent deux maxima, l'un à 573 nm (574 pour le BDY-4), l'autre à 618 nm (616 nm pour le BDY-4). En plus de ces maxima, une bande vers 720 nm est aussi observée pour le BDY-4. Les durées de vie moyenne sont aussi proches ; $2,84 \pm 0,54$ ns pour le BDY-3 et $2,75 \pm 0,48$ ns pour le BDY-4. Pour le BDY-3, une mesure a été réalisée en plaçant un filtre passe-bande centré à 619 nm à la sortie du microscope. Le déclin est dans ce cas plus long que celui correspondant à toutes les longueurs d'onde, ce qui montre qu'il y a un transfert d'énergie vers l'agrégat de plus basse énergie. Enfin, le spectre de fluorescence de la molécule BDY-5 comporte un pic centré à 567 nm avec un épaulement vers 620 nm. La durée de vie moyenne est de $1,00 \pm 0,14$ ns.

Pour les cinq molécules étudiées, le maximum de fluorescence est déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre de la molécule en solution. Le décalage est compris entre 746 cm^{-1} , pour le BDY-5 et 3028 cm^{-1} pour le BDY-1. Cela indique que la fluorescence observée est celle d'agrégats de Bodipy.

Les spectres d'absorption des films évaporés préparés avec ces molécules ont été mesurés avec le CARY. Les spectres bruts, ainsi que ceux des molécules en solution, sont présentés figure 6.2. Ils semblent déformés, peut être à cause d'effet de réabsorption dans le film. Sauf pour le BDY-4, une bande déplacée vers le rouge par rapport au spectre en solution est observée. Dans le cas des BDY-1, BDY-3 et BDY-5, il y a aussi un épaulement ou une bande secondaire, à plus faible longueur d'onde par rapport au maximum d'absorption dans le dichlorométhane. Pour le BDY-1 et le BDY-5, il est difficile de déterminer si cela correspond à un agrégat ou au rebond vibrationnel observé en solution. Le spectre du BDY-3 semble bien présenter deux bandes. Celui des films évaporés de BDY-4 semble être déplacé vers les courtes longueurs d'onde par rapport au spectre de cette molécule en solution.

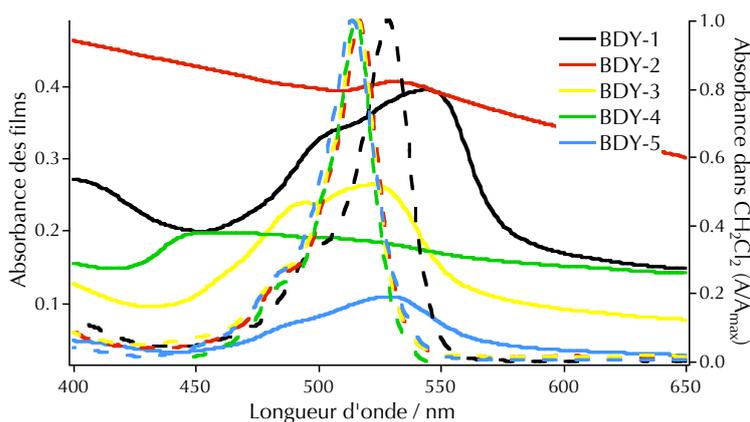


FIG. 6.2 – *Cryptobodipy*, série 1; Trait plein : Spectres d'absorption des films étirés (brut); Trait pointillé : Spectres normalisés, mesurés dans le dichlorométhane.

Les spectres de fluorescence des films évaporés de BDY-1 et BDY-2 sont différents de ceux

mesurés sur la poudre. Pour le BDY-1, le spectre comporte une pic fin vers 563 nm et deux pics larges à 634 et 674 nm. Le spectre de fluorescence du BDY-2 présente une seule bande, centrée à 543 nm au lieu de 590 nm et la durée de vie est plus longue que celle de la poudre. Par contre, pour les trois autres molécules, les propriétés spectroscopiques sont similaires à celles des cristaux.

Les spectres de fluorescence des films étirés présentent tous un maximum entre 550 et 560 nm. Pour les molécules BDY-2 et BDY-5, ces spectres sont similaires à ceux des films évaporés. Pour le BDY-1, c'est aussi le cas, mais la contribution des deux bandes aux longueurs d'onde les plus élevées semble moins importante. Pour les BDY-3 et BDY-4, la bande principale est déplacée vers les faibles longueurs d'onde par rapport aux films évaporés. Dans tous les cas, le FLIM montre qu'il y a des molécules individuelles déposées sur le verre. Elles peuvent perturber la mesure des propriétés des amas. La figure 6.1-F présente les déclinés mesurés sur ces amas et sur le fond. Le premier est plus court que le second. Les molécules isolées sur le verre augmentent la durée de vie moyenne mesurée et peuvent expliquer le déplacement vers le bleu des spectres de fluorescence. Pour les cinq Bodipy, le déclin de fluorescence, mesuré sur une ROI correspondant aux amas, est court avec une durée de vie moyenne de l'ordre de la nanoseconde.

Pour toutes ces molécules, les propriétés spectroscopiques montrent qu'il y a des interactions fortes entre les fluorophores dans le solide qui conduisent à la formation d'agrégats fluorescents. Pour le BDY-1, le BDY-2 et le BDY-5 il y a une espèce fluorescente majoritaire dans le cristal. Pour les deux premières molécules, la fluorescence des films est différente de celle des cristaux. Les spectres de fluorescence du BDY-3 et du BDY-4 à l'état cristallin ou sous forme de films possèdent deux maxima, qui sont les mêmes pour les deux molécules. Ces agrégats existent aussi dans les films.

6.1.2 Structure cristallographique

BDY-1 Tous les atomes du noyau Bodipy d'une molécule sont dans le même plan, et l'angle dièdre entre ce plan et celui du pyrène est de $78,3^\circ$. Les molécules sont empilées en colonne selon l'axe \vec{a} du réseau cristallin. Dans une colonne, les pyrènes sont tous du même côté par rapport au Bodipy (cf. figure 6.3). Les molécules sont toutes à la même distance les unes des autres, et $\theta_D = 31^\circ$, ce qui correspond à un agrégat J. Des pyrènes sont intercalés entre les pyrènes de cette colonne. Une deuxième colonne de molécules, dont les Bodipy sont face à ceux de la première, est située à proximité. Des molécules de nitrométhane sont intercalées entre ces deux empilements. Ici $\theta_D = 73,68^\circ$. Il y a un contact entre les molécules au niveau des méthyles en position C_3 et C'_5 dans la première colonne et entre le fluor et le méthyle en position C'_5 . Par contre la distance entre les pyrènes est supérieure au rayon de Van Der Waals des atomes, ce qui indique qu'il n'y a pas de recouvrement important des orbitales π .

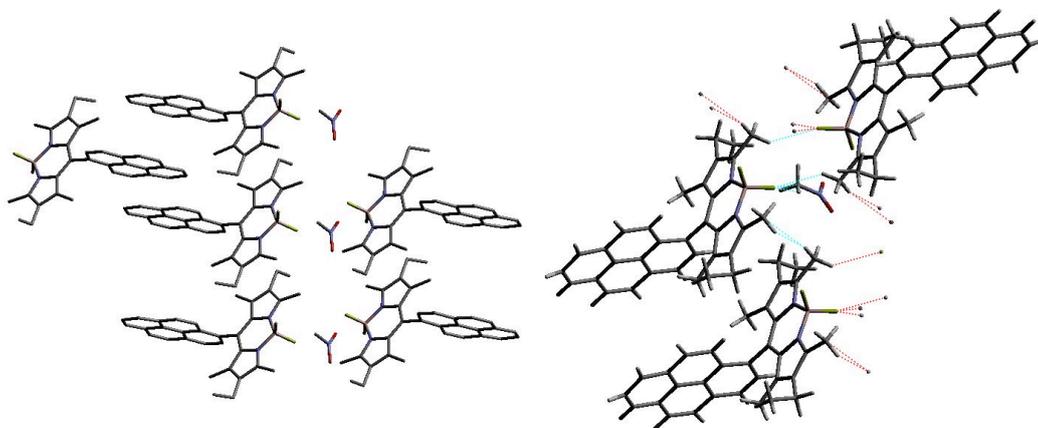


FIG. 6.3 – Empilement des molécules *BDY-1* dans le cristal. À gauche, vue générale, à droite, les traits correspondent aux distances les plus faibles entre molécules.

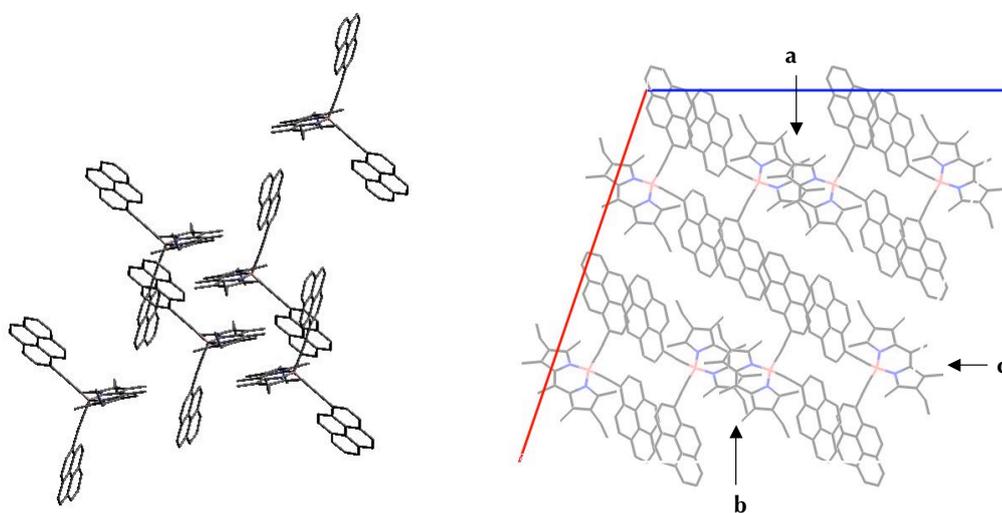


FIG. 6.4 – Empilement des molécules *BDY-2* dans le cristal. À gauche; vue générale, à droite; projection selon la direction (101) .

À l'état cristallin, les molécules de BDY-1 s'empilent donc dans un agrégat de type J. La distance entre les molécules est de 7.27 Å, ce qui est important. Il existe aussi une interaction de type H entre deux molécules placées dans deux agrégats J voisins. Dans ce cas la distance intermoléculaire est de 8,36 Å. L'énergie d'interaction, en valeur absolue, est plus importante dans le premier cas que dans le second.

BDY-2 Ici encore, les molécules forment une colonne mais selon l'axe \vec{b} . Les noyaux Bodipy les plus proches correspondent à un empilement tête - bêche des molécules (cf figure 6.4). Les distances intermoléculaires les plus faibles correspondent aux distances entre les méthyles et les éthyles du krypto-pyrrole et entre le méthyle en position C₈ et le carbone le plus proche du pyrène de la liaison C≡C. Les distances entre les carbones de deux pyrènes sont plus importantes. Dans une colonne Les distances entre les noyaux Bodipy R et les angles θ_D sont alternativement de 4,85 Å et 99,78° et de 7,00 Å et 33,12°. L'énergie d'interaction est plus importante dans le premier cas que dans le second. Il semble qu'il y a formation d'une paire de molécules.

Les molécules s'empilent de manière à ce que les groupements pyrènes soient à l'extérieur de cette colonne. De plus, les Bodipy des colonnes **a** et **b** sont dans des plans parallèles, ce qui n'est pas la cas entre les colonnes **a** et **c**. La distance entre les atomes de Bore de deux Bodipy équivalents dans les colonnes **a** et **b** est de 16,198 Å. Et la distance intermoléculaire entre les molécules des colonnes **a** et **c** est supérieure à 10 Å. Il semble donc que les interactions entre des molécules de deux colonnes différentes soient difficiles.

BDY-3 Les molécules s'arrangent en colonnes de manière similaire au BDY-2. Il y a un empilement de type J avec $R = 6,35$ et $\theta_D = 44,92^\circ$, et un empilement de type H avec $R = 5,02$ et $\theta_D = 71,49^\circ$. Il y a contact entre deux molécules de la même colonne, mais aussi entre les extrémités des éthyles appartenant à des molécules des colonnes de type **a** et **b** (cf. figure 6.5). Dans ce dernier cas, $R = 14,21$ Å et $\theta_D = 6,47$. Les molécules de plusieurs colonnes peuvent interagir.

BDY-4 La structure cristallographique est similaire à celle du BDY-3. Dans une colonne les distances intermoléculaires et les angles sont très similaires : $R = 4,99$ et $4,96$ Å et $\theta_D = 72,48$ et $71,85$ Å. Pour deux molécules qui sont dans des colonnes voisines, $R = 12,04$ Å et $\theta_D = 18,32^\circ$.

Pour le BDY-3 et le BDY-4, on trouve aussi une colonne de molécules qui s'empilent comme dans un mur de briques et où il semble se former une paire de molécules qui interagissent préférentiellement. Contrairement au BDY-2, il peut aussi y avoir des interactions entre les molécules de deux colonnes voisines.

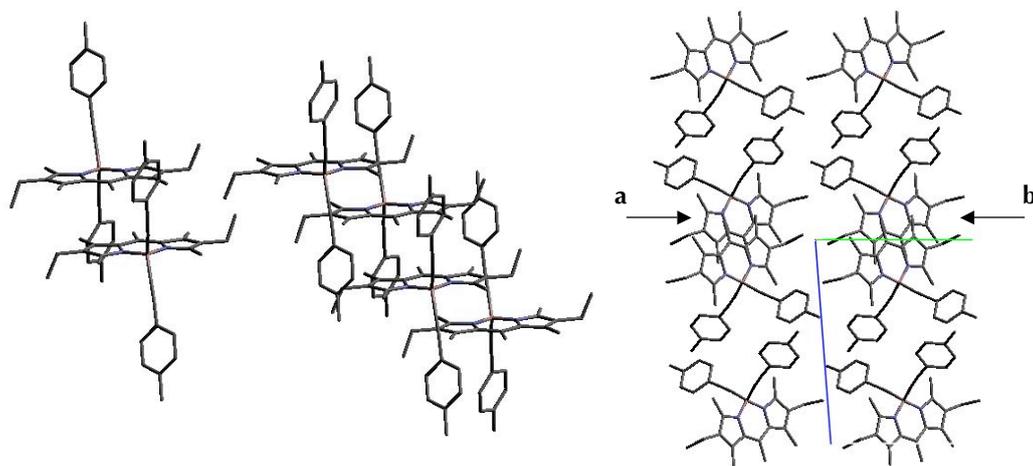


FIG. 6.5 – Empilement des molécules *BDY-3* dans le cristal. À gauche ; vue générale, à droite ; projection dans la direction (011) .

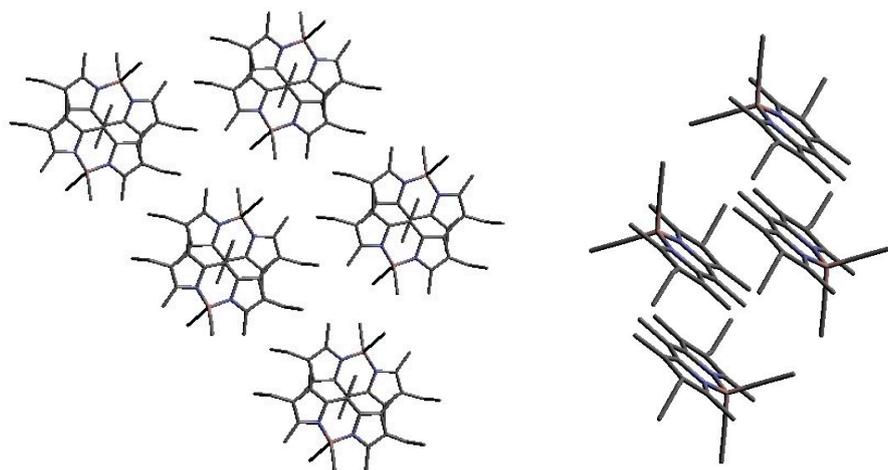


FIG. 6.6 – Empilement des molécules *BDY-4* dans le cristal. À gauche, projection dans la direction (011) , à droite ; empilement des molécules dans une colonne.

BDY-5 L'organisation des molécules dans le cristal est plus complexe que précédemment. Ici, le Bore est en dehors du plan contenant le dipyrrométhène. Les groupements *p*-méthoxy-phényles interviennent dans l'arrangement des molécules. Les noyaux Bodipy sont organisés en marche d'escalier (cf. figure 6.7). Les noyaux Bodipy les plus proches correspondent à $R = 5,50 \text{ \AA}$ et $\theta_D = 85,43$. Pour l'autre molécule voisine, les groupements *p*-méthoxy-phényles s'intercalent entre les Bodipy. Il y a aussi un contact entre deux escaliers. Dans ce cas, l'empilement est de type J, avec $R = 10,12 \text{ \AA}$ et $\theta_D = 19,2 \text{ \AA}$.

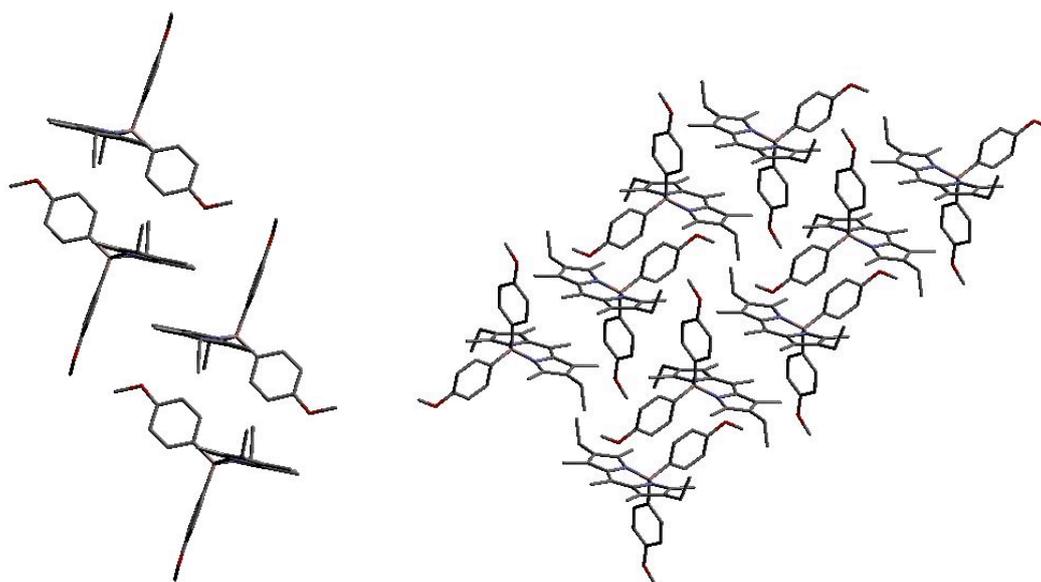


FIG. 6.7 – Empilement des molécules BDY-5 dans le cristal.

6.1.3 Relation entre la structure du solide et la fluorescence

Les distances intermoléculaires et les angles θ_D déduits des structures cristallographiques sont rassemblés table 6.2. Ces valeurs ont permis de calculer le facteur orientationnel κ et le dédoublement de bande $\Delta\bar{\nu} \cdot n^2$. L'indice de réfraction du solide est difficile à estimer, car il varie fortement autour de la longueur d'onde du maximum d'absorption. Mais comme $n > 1$, la valeur de $\Delta\bar{\nu}$ est inférieure à la valeur présentée dans le tableau. La différence d'énergie entre le maximum de fluorescence dans le solide et en solution est aussi présenté.

L'étude des structures cristallines a permis d'identifier les voisins d'un fluorophore donné. Un alignement des molécules, qui correspond à la formation d'un agrégat, a pu être mis en évidence dans ces solides. Deux situations ont été identifiées :

- Soit la distance intermoléculaire est la même pour toutes les molécules, comme c'est le cas pour le BDY-1. Le facteur d'orientation indique qu'il s'agit d'un agrégat de type J.

	R (Å)	θ (°)	κ	$\Delta\bar{\nu}^*n^2$ (cm^{-1})	μ (D)	$\Delta\bar{\nu}$ fluorescence (cm^{-1})
BDY-1	7,27	31,01	-1,20	-560	6,16	3 028
	8,36	73,68	0,76	249		
BDY-2	4,85	99,78	0,91	1496	6,09	1 990
	7,00	33,12	-1,10	-602		
BDY-3	5,02	71,49	0,68	1035	6,11	1 345
	6,35	44,92	-0,50	-371		
	14,21	6,47	-1,96	-128		
BDY-4	4,96	71,85	0,71	1 116	6,17	1 411
	4,99	72,48	0,73	1 121		
	12,04	18,32	-1,70	-187		
BDY-5	5,50	85,43	0,98	1 116	6,12	746
	10,12	19,2	-1,67	-306		

TAB. 6.2 – Données déduites des structures cristallographiques. R : distance intermoléculaire, θ angle entre le vecteur reliant les deux molécules et le plan contenant ces molécules, κ : facteur d'orientation, $\Delta\bar{\nu}^*n^2$: valeur calculée à partir de l'équation 4.8, μ moment de transition calculé à partir des spectres en solution, $\Delta\bar{\nu}$: différence entre les maxima de fluorescence en solution et dans le solide.

Par contre, on observe un déplacement vers le rouge de la fluorescence de $3\,028\text{ cm}^{-1}$ par rapport à la solution. Ceci correspond à une différence d'énergie beaucoup plus importante que le dédoublement calculé pour deux molécules. Ceci est cohérent avec la formation d'un exciton délocalisé sur plusieurs molécules de l'agrégat J. Par ailleurs, la forme du spectre de fluorescence indique qu'il existe d'autres interactions dans le solide. Enfin, la faible variation de la durée de vie dans le solide laisse supposer que le déclin mesuré est celui de l'agrégat J.

- Soit une molécule donnée dans une colonne est plus proche de l'un de ses voisins que de l'autre. Ceci est observé dans les quatre autres structures étudiées. L'interaction la plus élevée correspond à un agencement de type H entre deux molécules avec $R \approx 5\text{ Å}$ et $\theta_D \approx 70 - 80^\circ$. Cette paire de molécule est un dimère. Les colonnes sont donc des empilements de dimères plutôt qu'un alignement de monomères. Pour le BDY-2, une seule espèce fluorescente a été identifiée. Il s'agit de la fluorescence de l'excimère. La dispersion des durées de vie indique que cette fluorescence est perturbée par la présence de défauts ou d'impuretés. Par contre, pour les BDY-3 et le BDY-4, une autre bande de fluorescence apparaît sur les spectres. Or, l'étude de la structure cristallographique montre que des agrégats de type J peuvent se former entre les molécules de deux colonnes voisines. Enfin, la fluorescence du BDY-5 est celle de l'excimère, et le rebond observé à plus grande longueur d'onde pourrait être dû à des interactions entre les colonnes de molécules.

Les spectres de fluorescence des films de BDY-1 montrent que l'agrégat observé dans le solide ne survit pas au désordre. Pour le BDY-2, la bande de fluorescence est moins déplacé vers les grandes longueurs d'ondes dans les films que dans la poudre, ce qui indique que les interactions dans les films sont moins fortes que dans le solide. Enfin, pour les trois dernière molécules, la fluorescence des films est la même que celle de la poudre, c'est à dire qu'il se forme le même type d'agrégat.

6.2 Cryptobodipy - Série 2

Une deuxième série de molécules a été étudiée. La structure cristallographique n'étant en général pas disponible, une étude rapide sur les poudres a été effectuée afin de sélectionner les molécules potentiellement intéressantes. Les résultats obtenus sont rassemblés table 6.3. Dans chaque cas, les résultats correspondent à deux ou trois images.

Nom	CH ₂ Cl ₂		Poudre	
	λ_{em} (nm)	τ (ns)	λ_{em} (nm)	$\langle \tau \rangle$ (ns)
IP-BDY	541	4,85	631 ± 4	3,35 ± 0,38
BDY-A	546	5,3		1,16 ± 0,01
BDY-B	546	5,7	587	1,82 ± 0,45
BDY-C	535			1,21
BDY-D	534			2,28 ± 0,88
BDY-E	539		560 - 590 630	1,52 ± 0,25

TAB. 6.3 – *Cryptobodipy - Série 2. Propriétés spectroscopiques.* λ_{em} : maximum du spectre de fluorescence, τ durée de vie (ajustement par une fonction monoexponentielle), $\langle \tau \rangle$: durée de vie moyenne

Le déclin de fluorescence des molécules BDY-A à E étant multiexponentiel avec une durée de vie moyenne comprise entre 1 et 2 ns, ces molécules n'ont pas été étudiées de manière plus approfondie.

Par contre, la fluorescence des cristaux de IP-BDY (iodophényl-Bodipy) s'est révélée être beaucoup plus prometteuse. Pour une puissance laser équivalente, la fluorescence de ces cristaux, observés avec la caméra du microscope, est beaucoup plus intense que celle des autres molécules de cette série. De plus les déclins de fluorescence peuvent être ajustés par une fonction biexponentielle et dans un cas par une fonction monoexponentielle. Enfin, la fluorescence est décalée de 2610 cm⁻¹ vers le rouge par rapport à la molécule en solution. Une étude plus complète de la fluorescence à l'état solide de l'IP-BDY a donc été réalisée. Elle est présentée dans le chapitre suivant.

6.3 Bodipy commerciaux

Les Bodipy commerciaux, le PM567 et le PM597, sont fournis sous forme de poudre cristalline qui, a priori, a une pureté élevée. Ces cristaux, dont la taille est de l'ordre de plusieurs dizaines de microns, ont été étudiés avec le QA. Pour le PM567, des films amorphes et des cristaux obtenus par réprécipitation dans le dichlorométhane ont aussi été observés. Les structures cristallographiques du PM597 et du PM567 ne sont pas enregistrées dans la base de donnée de Cambridge. Il n'a donc pas été possible d'étudier l'arrangement des molécules dans le solide.

Molécule	Forme	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	τ (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)
PM597	Solution	526	565	4,57	
PM597	Poudre	480 - 550 400	555 - 590 630	$\tau_1 = 1,70 \pm 0,51$ ($\approx 70\%$) $\tau_2 = 4,81 \pm 1,94$ ($\approx 30\%$)	$3,56 \pm 1,38$
PM567	Solution	520	537	6,08	
PM567	Poudre	495 - 540 365 - 435	550 - 570 590 - 722	$3,78 \pm 1,12$	$4,17 \pm 1,28$
PM567	Poudre reprécipitée		570 - 590	$3,32 \pm 0,9$	$3,27 \pm 1,24$
PM567	Film éaporé		540 - 570		≈ 1

TAB. 6.4 – *Bodipy commerciaux. Propriétés spectroscopiques.* λ_{abs} : maximum du spectre d'absorption, λ_{em} : maximum du spectre de fluorescence, τ durée de vie (ajustement par une fonction monoexponentielle ou biexponentielle), $\langle \tau \rangle$: durée de vie moyenne. Les films ont été préparés à partir d'une solution de Bodipy dans le dichlorométhane.

6.3.1 PM597

Les cristaux de cette molécule sont des plaquettes de faible épaisseur mais dont la largeur varie entre une dizaine de microns et plusieurs centaines de microns. Les spectres d'absorption et de fluorescence de ces cristaux sont présentés figure 6.9. Il y a un dédoublement de la bande d'absorption correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_1$, avec une bande fine à 550 nm et une bande large à 480 nm. Les bandes à plus faible longueur d'onde correspondent à la transition $S_0 \rightarrow S_2$. Trois bandes ont été identifiées sur les spectres de fluorescence. La première vers 550 nm, qui correspond à la fluorescence du monomère. Il y a aussi deux bandes à 590 et 630 nm qui correspondent à des agrégats. L'observation au microscope montre que la longueur d'onde de fluorescence varie sur l'échantillon. Le centre est plutôt vert, les bords sont jaune et certains cristaux sont rose - violet. La durée de vie moyenne n'est pas homogène sur un cristal. Même dans une zone où la durée de vie moyenne est homogène, les déclins ne peuvent être ajustés que par des

fonctions biexponentielles (cf. figure 4.10). Sept images ont été enregistrées, ce qui a permis de reconstruire 22 déclin de fluorescence. La durée de vie moyenne est de $3,56 \pm 1,38$ ns. La durée de vie courte est de $1,70 \pm 0,51$ ns et la durée de vie longue de $4,81 \pm 1,94$ ns. Les propriétés de fluorescence étant très variables d'un cristal à l'autre, cette molécule n'a pas été étudiée de manière plus approfondie.

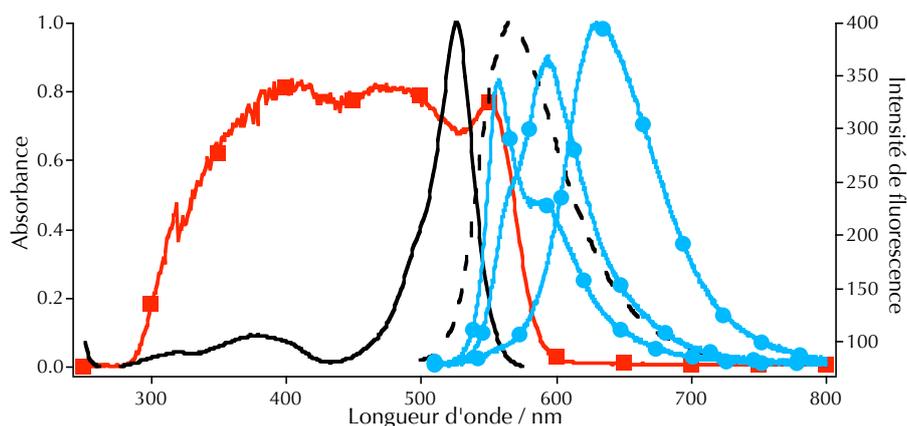


FIG. 6.8 – Spectres d'absorption (—) et de fluorescence (— —) normalisés du PM597 dans le dichlorométhane. Spectres d'absorption (■) et de fluorescence (●) bruts du PM597 à l'état solide.

6.3.2 PM567

Les cristaux de PM567 sont en forme d'aiguilles. Le spectre d'absorption de la poudre montre qu'il y a un dédoublement de la bande d'absorption $S_0 \rightarrow S_1$ et de la bande $S_0 \rightarrow S_2$ (cf. figure 6.9). Les maxima d'absorption correspondant à la première transition sont de 495 et 540 nm. Deux maxima ont été identifiés sur les spectres de fluorescence des cristaux, vers 570 et 590 nm. Il y a aussi des épaulements à 550 et 720 nm. Quarante déclin ont été reconstruits à partir des images de FLIM. La durée de vie moyenne est de $4,17 \pm 1,28$ ns. La décomposition en composantes principales donne des résultats corrects avec 5 composantes. Pour 26 des déclin, un ajustement par une fonction monoexponentielle est possible, et la durée de vie est de $3,78 \pm 1,12$ ns. Un ajustement par une fonction en racine de t est aussi possible. On obtient $\tau_f = 4,38 \pm 0,20$ ns et $\tau_{1/2}$ varie entre 2 et 350 ns. Pour cette molécule, il y a formation d'agrégats fluorescents dans le solide et un quenching de la fluorescence de ces agrégats par transfert d'énergie se produit dans le volume.

Des cristaux macroscopiques ont été préparés en laissant s'évaporer une solution de PM567 dans le dichlorométhane dans un petit pilulier. Ils sont moins bien cristallisés que les cristaux initiaux. Seulement deux maxima de fluorescence ont été identifiés à 570 et 590 nm. La durée de vie moyenne est de $3,27 \pm 1,24$ ns et l'ajustement par une fonction monoexponentielle donne

$\tau = 3,32 \pm 0,9$ ns. Ces valeurs sont inférieures à celles mesurées pour la poudre initiale. Cette diminution est peut être due à l'introduction de défauts dans les cristaux lors de la cristallisation.

Des films évaporés de PM567 ont aussi été préparés. Le spectre d'absorption ne possède pas de bande marquée à 520 nm. Ce spectre semble donc être décalé vers les courtes longueurs d'onde par rapport au spectre mesuré en solution, ce qui correspond à la formation d'agrégats peu fluorescents. Il y a deux maxima de fluorescence à 540 et 570 nm. Les déclin de fluorescence sont multiexponentiels et d'après les images de FLIM, la durée de vie moyenne des solides formés est inférieure à la nanoseconde.

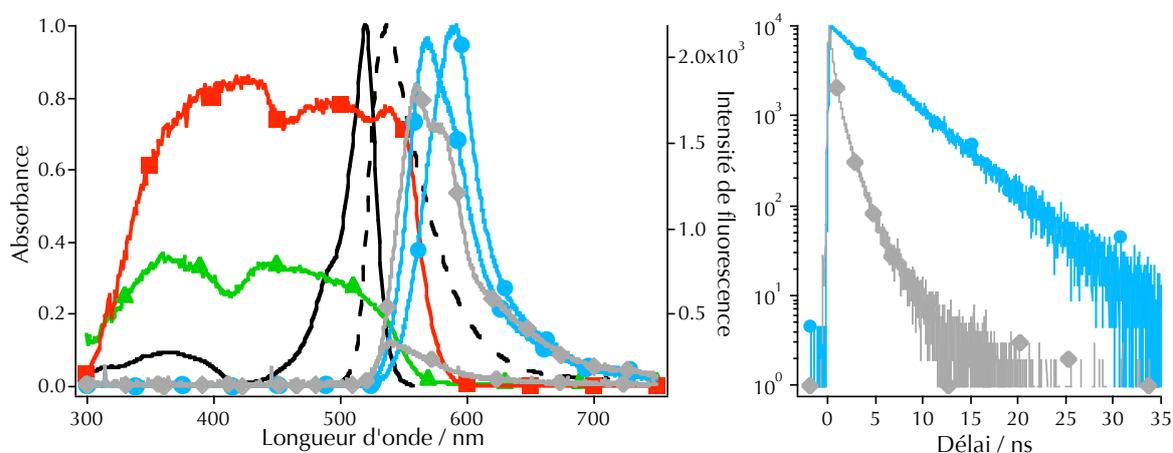


FIG. 6.9 – À gauche : Spectres d'absorption (—) et de fluorescence (— —) normalisés du PM567 dans le dichlorométhane. Spectres d'absorption (■) et de fluorescence (●) bruts du PM567 en poudre, Spectres d'absorption (▲) et de fluorescence (◆) bruts des films évaporés de PM567. À droite, déclin de fluorescence mesuré sur un cristal (●) et sur un film évaporé (◆).

Le PM567 présente des propriétés de fluorescence intéressantes à l'état cristallin, puisqu'un déclin de fluorescence monoexponentiel est observé. La fluorescence des films est moins prometteuse mais cette molécule a l'avantage d'être disponible en grandes quantités.

6.4 Bilan

Treize Bodipy ont été étudiés. Dans la majorité des cas, la fluorescence à l'état solide n'est pas satisfaisante mais pour deux de ces molécules, l'IP-BDY et le PM567, un déclin de fluorescence monexponentiel est observé à l'état cristallin. Ils semblent être dus à la formation d'agrégats de type J dans le solide.

Par ailleurs, l'observation des structures cristallographiques de six d'entre elles a permis de déterminer l'arrangement des fluorophores dans le solide. Une première étude qualitative a permis de déterminer l'effet de cette géométrie sur la fluorescence observée et des calculs plus précis ont été entrepris.

Chapitre 7

Iodophényl-Bodipy - IP-BDY

Cette molécule a été étudiée sous forme de poudre, de films évaporés à partir de solutions de dichlorobenzène et de dichlorométhane, de films étirés à partir d'une solution de dichlorométhane et de nanocristaux en matrice sol-gel. Les résultats expérimentaux sont rassemblés à la fin de ce chapitre, table 7.2.

7.1 Poudre

7.1.1 Résultats

L'IP-BDY forme des cristaux cubiques, avec dans certains cas une forme octaédrique (cf. figure 7.4). Les spectres d'absorption et de fluorescence sont présentés figure 7.1. L'absorbance commence à augmenter vers 640 nm et atteint un plateau vers 580 nm. Il n'est pas possible de distinguer un maxima entre 510 et 580 nm. Cela correspond à un déplacement vers le rouge de la bande d'absorption correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_1$. La bande à plus faible longueur d'onde peut être attribuée à la transition $S_0 \rightarrow S_2$. Les spectres de fluorescence possèdent une bande centrée à 629 ± 2 nm qui a une largeur à mi-hauteur de 907 ± 83 cm^{-1} . Dans certains cas, des épaulements à 590 et / ou 660 nm apparaissent. 32 déclin ont été reconstruits à partir des images enregistrées (cf. figure 7.2). La durée de vie moyenne est de $2,8 \pm 0,8$ ns. Pour 20 de ces déclin, un ajustement par une fonction monexponentielle est possible. La durée de vie obtenue est de $2,9 \pm 0,6$ ns. L'ajustement en racine de t est possible pour 24 déclin. On obtient $\tau_f = 4,75 \pm 1,09$, soit une variation de 23 %, et $\tau_{1/2}$ varie entre 0,64 et 26 ns.

Une série d'expériences a aussi été réalisée en mesurant le déclin de fluorescence avec le photomultiplicateur utilisé pour la mesure des déclin en cuve. La fluorescence est amenée sur le détecteur par la fibre optique qui sert aussi à mesurer les spectres de fluorescence. La lumière collectée ne vient que d'une partie de l'image, mais, avec ce système, le spectre de fluorescence correspond exactement à la même zone que le déclin. Les résultats sont similaires à ceux obte-

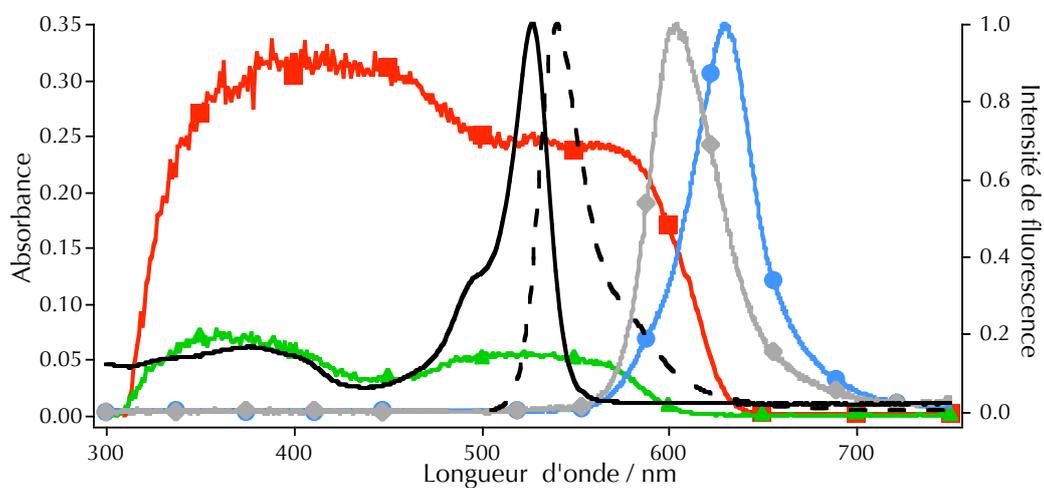


FIG. 7.1 – Spectres d'absorption (—) et de fluorescence (---) de l'IP-BDY dans le dichlorométhane. Spectres d'absorption (■) et de fluorescence (●) de l'IP-BDY en poudre, spectres d'absorption (▲) et de fluorescence (◆) des films évaporés à partir de CH_2Cl_2 . À part pour l'absorption des solides, les spectres sont normalisés.

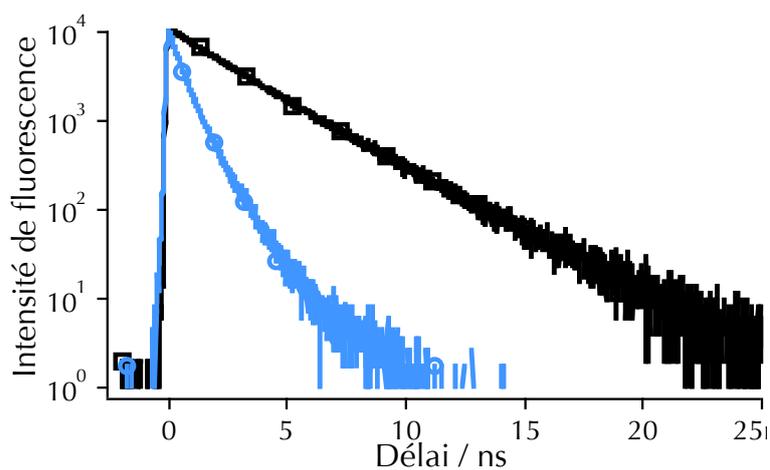


FIG. 7.2 – Déclins de fluorescence de l'IP-BDY. □ : Cristal; ○ : Poudre écrasée.

nus avec le QA. Il n'y a pas de corrélation évidente entre la forme des spectres et le déclin de fluorescence.

Des décompositions en composantes principales ont été réalisées sur les données recueillies. Que ce soit pour les déclin ou pour les spectres, il est nécessaire d'utiliser au moins 5 composantes pour décrire de manière convenable les données.

De la poudre écrasée sur une lamelle de microscope avec une spatule a aussi été observée. Le maximum de fluorescence se situe entre 580 et 600 nm pour quatre des six spectres mesurés, et pour les deux derniers, les maxima de fluorescence sont de 622 et 629 nm. Les déclin de fluorescence sont plus courts que ceux mesurés précédemment. En écrasant la poudre, on augmente le désordre dans le solide. Un nouveau type d'agrégat semble apparaître, puisque le maximum de fluorescence est moins décalé vers le rouge par rapport au spectre mesuré en solution.

Dans la poudre, l'IP-BDY forme un agrégat fluorescent. Le spectre d'absorption indique qu'il s'agit d'un agrégat de type J. Le maximum du spectre de fluorescence est situé à 630 nm et la durée de vie est légèrement inférieure à 3 ns. Cependant d'autres espèces fluorescentes coexistent avec cet agrégat dans le solide et il existe un transfert d'énergie de cette espèce vers des impuretés ou d'autres types d'agrégats.

7.1.2 Structure cristallographique

La structure cristallographique de l'IP-BDY a été déterminée à partir de la poudre décrite ci-dessus. Les propriétés de fluorescence qui ont été présentées sont donc celles de la molécule sous forme cristalline. L'empilement des molécules dans le cristal est présenté figure 7.3.

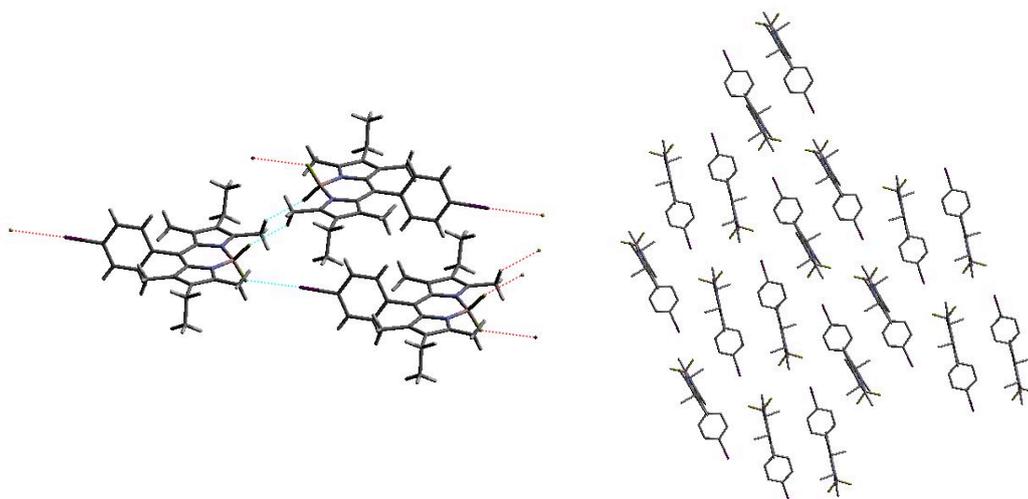


FIG. 7.3 – Empilement des molécules BDY-5 dans le cristal.

La distance la plus courte entre deux molécules est la distance Fluor - Iode (3,059 Å). Il se forme une chaîne de molécules qui sont alignées les une derrière les autres avec la même orientation. Ces chaînes peuvent être regroupées par paires où les plans contenant les noyaux Bodipy sont parallèles, mais où les molécules sont tête bêche. L'orientation des molécules entre deux paires voisines est différente. Cependant l'énergie d'interaction correspondant à cette géométrie est très faible ($< 100 \text{ cm}^{-1}$), et le facteur d'orientation correspond à un agrégat de type H. Par contre, si on considère les distance Bore-Bore, il y a une molécule à $d_{B-B} = 7,506 \text{ Å}$ et $\theta_D = 28,57^\circ$. Il s'agit des molécules placées à la verticale des molécules représentées sur la figure 7.3. Il est possible de former un alignement de molécules qui ont cette géométrie. Le facteur d'orientation correspondant est négatif, donc l'interaction entre ces molécules pourrait correspondre à l'agrégat de type J qui est apparaît sur les spectres d'absorption et de fluorescence.

Le spectre de diffraction de poudre a aussi été mesuré. Il est différent du spectre calculé à partir de la structure cristallographique. En plus des pics calculés, il y a un fond important, qui peut être attribué, soit à l'existence d'une deuxième phase, soit à la formation de zones amorphes lorsque la poudre a été écrasée.

7.2 Films

Des films évaporés ont été préparés à partir de la molécule dissoute dans le dichlorobenzène. Plusieurs types de structures ont été observés (cf. figure 7.4). Des objets d'environ dix microns de long sont formés. Sur la photographie en fluorescence, on voit un objet rouge sur un fond vert. L'image de FLIM montre que la durée de vie de cet objet est courte alors que celle du fond est plus longue. Le déclin de fluorescence mesuré sur une ROI correspondant au solide est présenté figure 7.5. Le fond fluorescent peut être dû à des molécules isolées adsorbées sur la surface. Des objets plus petits ont aussi été étudiés. Ici encore, le déclin de fluorescence est très rapide (cf. figure 7.5).

Le spectre d'absorption d'un film formé par évaporation d'une goutte de dichlorométhane est similaire à celui mesuré sur la poudre, mais le plateau ne commence que vers 570 nm (cf. figure 7.1). Il est quand même décalé vers le rouge par rapport au spectre en solution. Les spectres de fluorescence sont aussi moins décalés vers le rouge que pour la poudre. Les déclins de fluorescence de ces films sont multiexponentiels avec une durée de vie moyenne de $0,73 \pm 0,13 \text{ ns}$. Sur les films étirés, on observe des objets de moins de un micron de diamètre. Le déclin de fluorescence correspondant à la totalité de l'image comporte une composante très courte et une composante assez longue. Les images de FLIM montrent que la composante longue est due au fond alors que les particules ont une durée de vie très courte. La durée de vie moyenne de fluorescence de ces particules, est, d'après ces images, de quelques centaines de nanosecondes.

Dans les solides formés par évaporation d'une solution contenant de l'IP-BDY, il y a formation d'agrégats fluorescents. D'après le spectre d'absorption, il s'agit aussi d'agrégats de type J. Leur

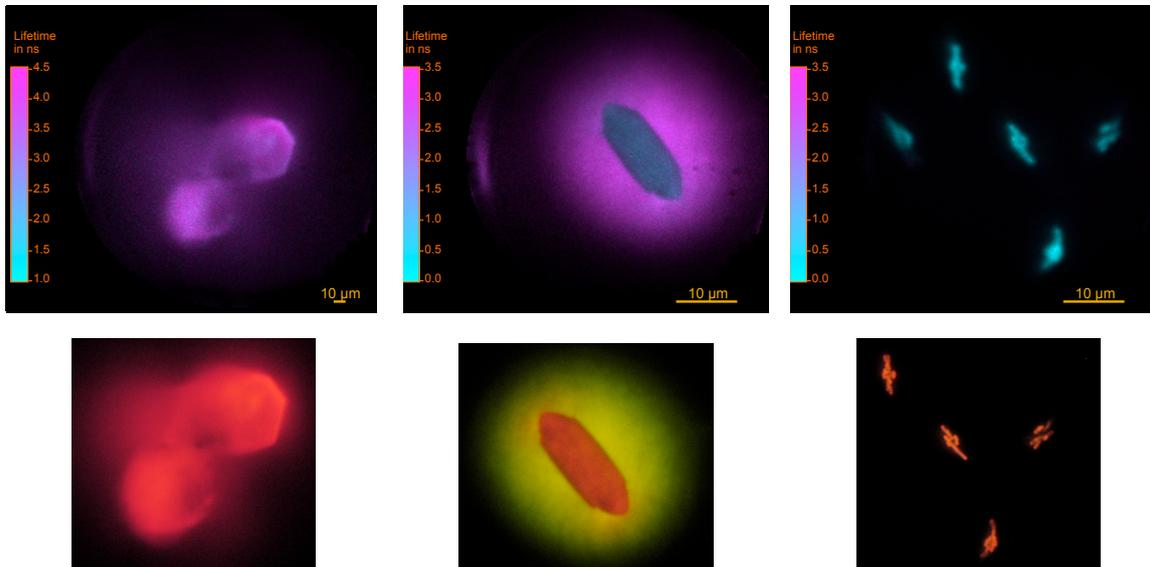


FIG. 7.4 – Aquarelle (en haut) et photographies en fluorescence (en bas) de l'IP-BDY. La première image à gauche correspond à la poudre, les deux autres sont celles d'un film évaporé à partir du dichlorobenzène.

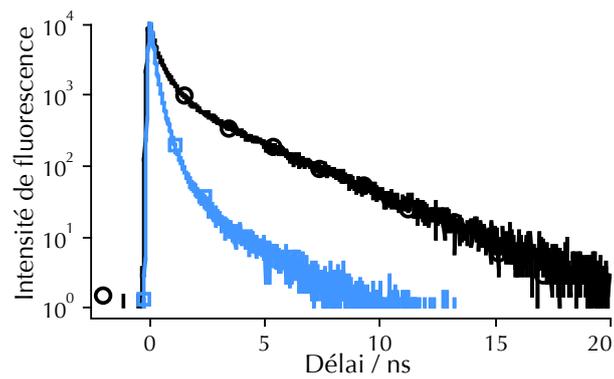


FIG. 7.5 – Déclins des film évaporés d'IP-BDY préparés à partir d'une solution de dichlorobenzène. \circ : Déclin correspondant à l'image centrale de la figure 7.4; \square : Déclin correspondant à l'image de droite de la figure 7.4.

durée de vie de fluorescence est très courte. Cependant, de manière qualitative, l'intensité de fluorescence de ces agrégats est importante, si on les compare aux films préparés avec d'autres Bodipy.

7.3 Nanocristaux en matrice sol-gel

L'IP-BDY présentant des propriétés spectroscopiques intéressantes à l'état solide, notamment en terme d'intensité de fluorescence, des nanocristaux en matrice sol-gel ont été préparés. La formation de nanocristaux moléculaires en matrice sol-gel a été mise au point dans l'équipe d'A. Ibanez, du département Matière condensée, matériaux et fonctions de l'Institut Néel de Grenoble [5, 53, 55]. Les échantillons présentés ici ont été préparés par Émilie Dubuisson, qui effectue sa thèse dans ce laboratoire.

7.3.1 Préparation

Un *sol* est une suspension colloïdale de particules solides dans une phase liquide. Si la phase dispersée se combine avec le milieu de dispersion pour former un réseau solide tridimensionnel, il y a formation d'un *gel*. Un sol est préparé à partir de *précurseurs*, qui sont en général des alcoxydes métalliques, par hydrolyse et condensation, ce qui conduit à la formation d'un réseau de ponts métal-oxygène-métal. Les matrices sol-gel utilisées ici ont été formées à partir d'alcoxydes de silicium, de formule $R_xSi(OR)_{4-x}$, où R est une chaîne alkyle. Les bilans des réactions d'hydrolyse et de condensation sont les suivants :



Il y a donc formation de chaînes polymériques de taille croissante. Plus la cinétique de la condensation est rapide devant celle de l'hydrolyse, plus les chaînes sont linéaires. Lorsque la dimension du polymère devient infinie à l'échelle moléculaire, le *point de gélification* est atteint. Le gel ainsi formé est encore gorgé de solvant, qu'il faut éliminer. Lors du séchage, la condensation se poursuit et une contraction du solide se produit. Cette étape est appelée la *synérèse*. Pour les couches minces étudiées ici, cette étape est confondue avec la gélification.

Plusieurs paramètres permettent de contrôler la nature du gel formé. La cinétique des réactions d'hydrolyse et de condensation dépend du pH. Si le pH est inférieur au point de charge nulle de la silice¹, soit pH = 3, la cinétique d'hydrolyse et de condensation fait des chaînes plutôt linéaires sont formées. Quand le pH est compris entre 3 et 7, le polymère est plus ramifié et on obtient des gels mésoporeux, c'est à dire que le diamètre des pores est supérieur à 2 nanomètres. Enfin, à pH

¹Le pH auquel la silice est neutre

> 7, des particules de silice sont formées. Il est aussi possible de contrôler les vitesses relatives d'hydrolyse et de condensation en modulant le rapport entre les quantités d'eau et d'alcoxydes. La nature des chaînes alkyles modifie la réactivité de l'alcoxyde et influence aussi la porosité du gel final.

Il est possible de former des cristaux moléculaires dans les pores de la matrice sol-gel. Pour une solution *sursaturée*, i.e. si la concentration en molécules organiques est supérieure à la solubilité, la *nucléation* d'un cristal peut avoir lieu. Cela correspond à la formation d'un germe solide dans le liquide. Cette première étape est suivie de la *croissance* du cristal. Pour obtenir des cristaux monodisperses en taille, la nucléation doit être confinée dans le temps et la sursaturation correspondante doit être atteinte rapidement. La diminution de la concentration de molécules dissoutes interrompt rapidement la nucléation. Pour que la distribution en taille des particules soit étroite, la croissance doit être lente. Dans les pores d'une matrice, il y a un confinement spatial, mais aussi un confinement temporel, car la sursaturation à appliquer pour que la nucléation ait lieu est plus élevée qu'en solution. Le confinement dans les pores permet aussi d'obtenir des cristaux plus petits qu'en solution, et d'éviter leur coalescence.

Les échantillons présentés ici ont été préparés de la manière suivante [5] : le fluorophore en poudre, les précurseurs, l'eau et un solvant organique, du tétrahydrofurane (THF) sont mélangés. Cette solution est portée à 80 °C, pendant 4 à 24 heures, pendant lesquelles l'hydrolyse se produit. Après refroidissement, cette solution est déposée sur une lamelle de microscope par centrifugation à la tournette, ou *spin-coating*. Une phase de rotation permet d'étaler la solution sur le substrat, et lorsque la rotation est arrêtée, la gélification et la nucléation des cristaux se produisent. Les films sont ensuite recuits pendant 10 à 20 min à 100 - 150 °C. Plusieurs paramètres d'élaboration peuvent varier :

Le taux d'hydrolyse $h = [H_2O]/[-OR]$, qui détermine les cinétiques d'hydrolyse et de condensation².

Le taux de solvant $s = [\text{solvant}]/[Si]$, qui permet de contrôler la viscosité et l'homogénéité de la solution déposée.

Le taux de molécules organiques $d = [\text{molécules organiques}]/[Si]$, qui gouverne la sursaturation.

Le catalyseur L'hydrolyse est toujours catalysée par de l'acide chlorhydrique, et dans certains cas de l'hydroxyde d'ammonium est ensuite ajouté, ce qui permet d'augmenter le taux de réticulation des chaînes, et donc de diminuer la taille des pores et des cristaux.

La taille des nanocristaux est mesurée par microscopie optique confocale si leur taille est supérieure à la résolution du microscope, i.e. 200 nm. L'image de la fluorescence des particules est analysée avec le logiciel NIH (Scion Corporation), et on obtient la distribution en taille des particules. Pour des cristaux plus petits, il est possible de visualiser les cristaux par microscopie

²Les concentrations sont exprimées en mol.L⁻¹

électronique à transmission (TEM), mais dans ce cas il faut déposer le film sur une lame de chlorure de sodium.

À l'issue du dépôt, les cristaux sont recouverts d'une couche de silice. Si on dépose un quenching à la surface du film, celui-ci sera donc assez éloigné des cristaux et la probabilité de quenching de la fluorescence des nanocristaux sera diminuée. Pour pallier à ce problème, il est possible de moduler le diamètre des pores en changeant de précurseur. La matrice agit alors comme un filtre. Pendant sa thèse, V. Monnier a mis au point une méthode chimique, qui fait l'objet d'un dépôt de brevet, qui permet de décaper la couche sol-gel qui recouvre les cristaux. L'observation par microscopie à force atomique (AFM) des couches montre qu'à la fin du décapage les cristaux sont accessibles mais qu'ils restent ancrés dans la couche sol-gel [5].

Au cours de ma thèse, j'ai étudié cinq films différents. Dans chaque cas, j'ai mesuré les propriétés spectroscopiques des lames non décapées, puis de lames décapées pendant plus ou moins longtemps. Suite à des problèmes techniques, ces lames n'ont pas pu être caractérisées par AFM, on ne sait donc pas si la couche de silice recouvrant les nanocristaux a été totalement éliminée. Les conditions de synthèse, ainsi que l'épaisseur des films avant décapage et la taille des nanocristaux mesurée par microscopie optique confocale sont rassemblées table 7.1.

	h	s	d	$\frac{[\text{NH}_4\text{OH}]}{[\text{HCl}]}$	Épaisseur du film (nm)	Diamètre des nanocristaux (nm)
NC-1	1	20	$3 \cdot 10^{-3}$	0	110	≈ 600
NC-2	1	20	$6 \cdot 10^{-3}$	0	160	≈ 900
NC-3	1	20	$9 \cdot 10^{-3}$	0	160	Non homogène
NC-4	0,5	30	$6 \cdot 10^{-3}$	1	90	<200
NC-5	0,5	40	$6 \cdot 10^{-3}$	1	80	<200

TAB. 7.1 – Conditions de préparation des nanocristaux d'IP-BDY en matrice sol-gel.

La modification des paramètres de synthèse permet de former des cristaux dont la taille varie entre moins de 200 nanomètres et un micron. L'épaisseur des couches est inférieure au diamètre des cristaux, mais des mesures d'AFM réalisées sur d'autres lames ont montré que ces derniers sont recouverts d'une couche de silice.

7.3.2 Propriétés spectroscopiques

Les spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de fluorescence ont été mesurés avec le CARY et le SPEX-FLUOROLOG. Ils sont présentés figure 7.6. Pour les films NC-1, 2 et 3, le spectre d'absorption présente un maximum autour de 527 nm, et une deuxième bande apparaît entre 550 et 600 nm. Les spectres de fluorescence présentent aussi deux maxima, l'un à 540 nm pour les trois types de film, l'autre à 579 nm pour le film NC-1, à 594 nm pour le film NC-2

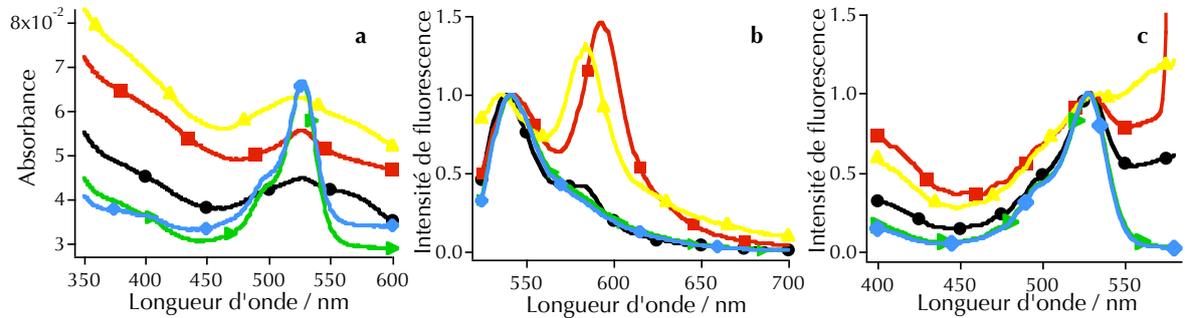


FIG. 7.6 – Propriétés spectroscopiques des nanocristaux d'IP-BDY en matrice sol-gel; **a** : spectres d'absorption bruts; **b** : Spectres de fluorescence normalisés ($\lambda_{exc} = 495 \text{ nm}$); **c** : Spectres d'excitation de fluorescence normalisés ($\lambda_{em} = 595 \text{ nm}$). ■ : NC-1; ● : NC-2; ▲ : NC-3; ► : NC-4; ◆ : NC-5.

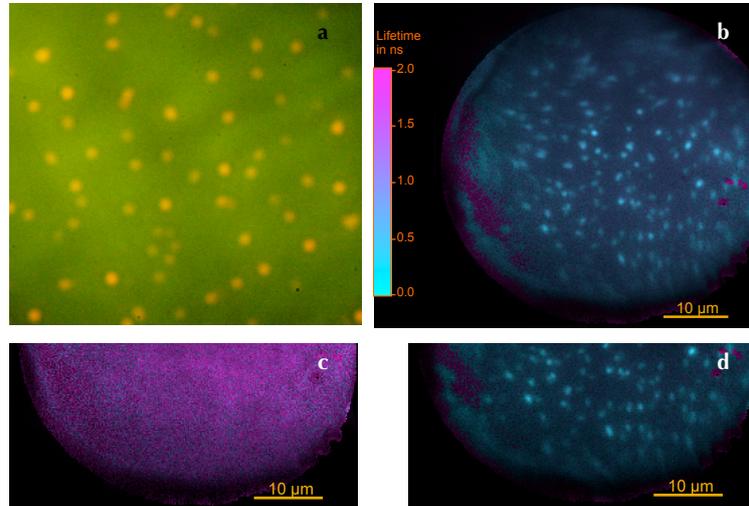


FIG. 7.7 – Nanocristaux d'IP-BDY en matrice sol-gel; **a** : photographie en fluorescence; **b** : Aquarelle, lame NC-2, toutes longueurs d'onde; **c** : Aquarelle, lame NC-2, avec filtre passe bande centré à 544 nm; **d** : Aquarelle, lame NC-2, avec filtre passe bande centré à 594 nm. L'échelle de durée de vie est la même pour les trois images.

et à 585 nm pour le film NC-3. Sur les spectres de l'échantillon NC-1, la bande à 540 nm est la plus intense alors que pour les deux autres films, c'est l'autre bande qui est plus intense. Les spectres d'excitation de fluorescence ont été mesurés en collectant la fluorescence à 585 nm. Ils présentent une bande centrée à 530 nm, et l'intensité remonte après 550 nm. Dans le cas des échantillons NC-4 et NC-5, il n'y a qu'un maximum d'absorption, à 527 nm, et un maximum de fluorescence à 542 nm. La forme des spectres est similaire à celle des spectres d'un Bodipy en solution. Dans ces films il y a donc deux espèces fluorescentes. L'une a une spectroscopie proche de celle d'un monomère, et pour l'autre les maxima d'absorption et de fluorescence sont déplacés vers les grandes longueurs d'onde, ce qui traduit une interaction entre les fluorophores. Les spectres d'absorption montrent qu'il s'agit d'un agrégat de type J.

Si on observe les films où les nanocristaux sont suffisamment gros sous microscope, on voit, en fluorescence, des particules rouge-orangé sur un fond vert (cf. figure 7.7). Sur le FLIM, la durée de vie du fond est assez longue ($\langle \tau \rangle \approx$ quelques ns) alors que celle des cristaux est très courte. Les spectres de fluorescence mesurés sous microscope sont similaires à ceux décrits précédemment. Des filtres ont été placés à la sortie du microscope pour visualiser l'une ou l'autre des espèces identifiées. Un exemple d'aquarelle est présenté figure 7.7. Avec un filtre passe-bande centré à 544 nm, l'image est homogène, alors qu'avec un filtre centré à 594 nm, les nanocristaux sont visibles sur l'image.

La fluorescence des films est donc due à des molécules isolées d'IP-BDY dispersées dans la matrice sol-gel et aux nanocristaux. Dans ces particules, les molécules d'IP-BDY interagissent suffisamment entre elles pour que les propriétés spectroscopiques soient modifiées. Il y a formation d'un agrégat de type J. Les positions des maxima d'absorption et de fluorescence et les durées de vie de fluorescence sont proches de celles observées dans les films évaporés et étirés mais elles sont différentes des valeurs mesurées pour les cristaux.

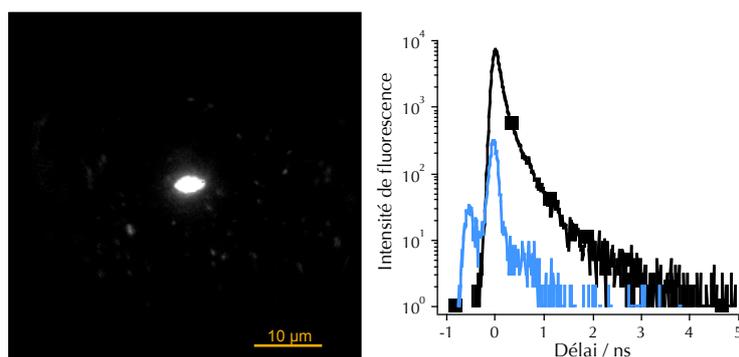


FIG. 7.8 – À gauche : image en intensité d'une particule trouvée sur la lame NC-3. À droite : ■ : déclin de fluorescence correspondant à la particule, — : impulsion laser.

Un objet de 5 microns de long et de 2 microns de large a été trouvé sur la lame NC-3.

D'après le FLIM, sa durée de vie est très courte. L'agrégat fluorescent dans cette particule est probablement similaire à ceux présents dans les nanocristaux. Il est suffisamment grand pour qu'on puisse reconstruire un déclin de fluorescence avec un nombre de coups important. L'image d'intensité de fluorescence, mesurée avec un filtre passe-bande centré à 594 nm, et le déclin reconstruit sur une ROI correspondant au cristal sont présentés figure 7.8. Une déconvolution du déclin et de la fonction d'appareil a été tentée. L'impulsion a été mesurée sur une lamelle de microscope seule et correspond à la même ROI que le déclin. La déconvolution a été réalisée avec le logiciel Globals. L'ajustement n'est pas satisfaisant autour du retard nul, car l'impulsion est composée de deux pics, qui viennent de réflexions sur la lamelle. Le logiciel donne une durée de vie de 230 ps, ce qui donne un ordre de grandeur de la durée de vie réelle.

Pour les films NC-4 et NC-5, seule la fluorescence des molécules isolées est observée. Cela ne signifie pas forcément qu'il n'y a pas de cristaux dans la couche sol-gel. En effet, dans les conditions utilisées pour préparer ces films, des cristaux de diamètre inférieur à 200 nm ont été obtenus avec d'autres fluorophores. Il est possible que le signal de fluorescence des nanocristaux soit noyé dans la fluorescence des molécules isolées. Pour vérifier la présence de cristaux il faudrait utiliser des techniques d'imageries non optiques, comme le TEM ou l'AFM.

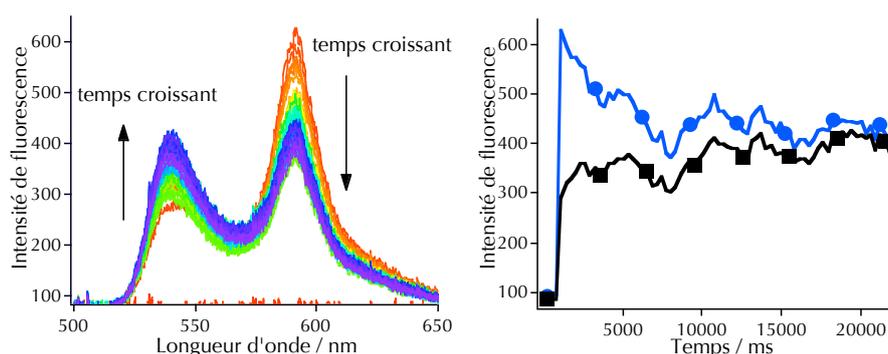


FIG. 7.9 – Évolution du spectre de fluorescence en fonction du temps d'exposition au laser. À gauche ; Spectres de fluorescence, mesurés toutes les 300 ms. À droite ; Évolution des intensités des deux maxima. ● : intensité à 590 nm, fluorescence des nanocristaux ; ■ : Intensité à 540 nm, fluorescence des molécules isolées dans la matrice sol-gel.

Sous microscope, un blanchiment des cristaux a été observé. Dans un premier temps, des spectres de fluorescence en un point de la lame NC-2 ont été mesurés toutes les 300 millisecondes, pendant une vingtaine de secondes. Ces spectres sont présentés figure 7.9. Au début, la bande à 590 nm est plus intense que celle à 540 nm, puis l'intensité de la première diminue alors que celle de la seconde augmente. Les deux intensités se stabilisent au bout d'une quinzaine de secondes. L'exposition au laser entraîne donc un blanchiment des nanocristaux. Pour mesurer les spectres de fluorescence, le laser n'est pas atténué, par contre pour les mesures de FLIM, des filtres neutres

sont utilisés pour diminuer la puissance laser d'un facteur 10^3 environ. Même si l'intensité reçue est plus faible, le déclin de fluorescence évolue au cours de la mesure et la durée de vie moyenne mesurée augmente dans certains cas. Ceci peut s'expliquer par le fait que la proportion de la fluorescence émise par les nanocristaux diminue, et comme la durée de vie correspondante est faible, la durée de vie globale apparaît plus longue. Afin de s'affranchir des effets de blanchiment, les cristaux ont été exposés au laser à la puissance maximale pendant 20 secondes environ, avant d'être observés au QA. Le déclin de fluorescence ne varie plus au cours de la mesure après cette opération.

Émilie Dubuisson a aussi préparé des lames décapées. Quatre durées de décapage ont été utilisées : 6, 10, 15 et 20 heures. Dès 6 heures, la contribution du monomère dans le spectre d'absorption diminue. Pour les lames NC-1, NC-2 et NC-3 le pic d'absorption des agrégats est de plus en plus marqué quand la durée d'immersion dans la solution de décapage augmente. En fluorescence, la contribution des deux espèces est toujours visible. Après 20 heures de décapage, la fluorescence du monomère redevient plus importante que celle des agrégats. Bien que, sous microscope, des cristaux soient encore visibles, certains se sont probablement détachés de la surface. Le spectre de fluorescence du film NC-5 décapé pendant 15 heures possède deux maxima, mais l'observation au microscope montre qu'il y a des cristaux dont la taille est supérieure à 200 nanomètres dans la matrice. Ces résultats sont à compléter par une observation à l'AFM, mais il semble qu'après 20 heures de décapage, les nanocristaux commencent à se détacher de la matrice.

7.3.3 Quenching par le bleu de cibacron

Le quenching de la fluorescence des nanocristaux par le Bleu de Cibacron (BC) a été testé. Les propriétés de cette molécule seront décrites en détail dans le chapitre 9. Le BC est un colorant bleu dont le spectre d'absorption présente une bande entre 550 et 700 nm. Le recouvrement avec le spectre de fluorescence de l'IP-BDY est satisfaisant. Un transfert d'énergie entre ces deux molécules est donc possible en théorie. Le dispositif expérimental est décrit figure 7.10. Un réservoir, pouvant contenir environ 50 μL , est collé sur la lamelle. Une solution de BC dans l'eau est injectée dans ce réservoir ce qui permet de mettre en contact le BC et le film sol-gel. Il est ensuite possible de retirer le liquide par aspiration, puis de rincer le film.

Des lames NC-2 décapées ont été utilisées. L'absorbance du monomère est moins importante que pour la lame NC-2 non décapée et il y a deux bandes de fluorescence. Au microscope, les nanocristaux sont toujours visibles. La zone étudiée a été irradiée pendant environ 20 secondes avec le laser à la puissance maximale, de manière à éliminer les effets du blanchiment. En présence de BC à $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, il n'y a pas de modification du déclin de fluorescence de la zone étudiée. Les spectres de fluorescence n'ont pas été mesurés puisque cette mesure nécessite d'utiliser le laser non atténué, ce qui provoque un blanchiment important des nanocristaux et fausse les résultats.

Il n'a donc pas été possible d'éteindre la fluorescence des nanocristaux d'IP-BDY avec du

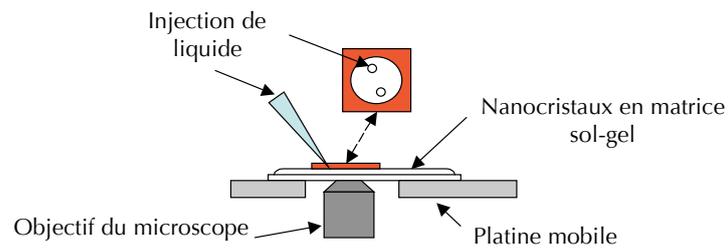


FIG. 7.10 – *Dispositif expérimental utilisé pour tester le quenching des nanocristaux par le BC. Des solutions aqueuses de cette molécule à différentes concentrations sont mises en contact avec la couche sol-gel, grâce à un réservoir posé sur la lamelle de microscope.*

BC. Cependant les cristaux utilisés avaient un diamètre important, de l'ordre du micron, et il est possible qu'un quenching de la fluorescence de nanocristaux plus petits soit possible. Un effet de taille sur le quenching de la fluorescence de nanocristaux de rubrène par le BC a déjà été observé [5]. Plus les cristaux sont petits, plus le quenching est efficace.

7.4 Bilan

Les propriétés de fluorescence de l'IP-BDY à l'état solide sont rassemblées dans le tableau 7.2. Deux types d'agrégats sont formés à l'état solide. Dans les cristaux, le maximum de fluorescence est situé vers 630 nm et la durée de vie est proche de 3 ns. Le maximum de fluorescence du second agrégat est situé entre 580 et 595 nm et sa durée de vie est très courte, inférieure à 500 ps. Cet agrégat apparaît dans les films qui sont plutôt amorphes, la poudre écrasée et les nanocristaux en matrice sol-gel.

Forme	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	τ (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)
Solution	527	541	4,85	
Poudre	≈ 585	629 ± 2	$2,9 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,8$
Film évaporé $C_6H_4Cl_2$				1,5 / 0,36
Film évaporé CH_2Cl_2	≈ 570	≈ 610		$0,73 \pm 0,13$
Film étiré		≈ 600		$< 0,5$
NC-1	$526,8 \pm 1,3$	$539,2 \pm 0,5$ $579,3 \pm 0,6$		$3,90 \pm 0,25$ $2,72 \pm 0,67$
NC-2	$527,0 \pm 1,2$	$541,7 \pm 1,2$ $593,5 \pm 1,7$		$2,35 \pm 0,4$ $0,88 \pm 0,20$
NC-3	$524,4 \pm 3,4$	$537,9 \pm 1,4$ $584,6 \pm 0,9$		$2,38 \pm 0,63$ $1,04 \pm 0,21$
NC-4	$527,2 \pm 0,4$	$542,4 \pm 1,5$		
NC-5	$527,4 \pm 0,4$	$541,6 \pm 0,5$		

TAB. 7.2 – IP-BDY. Propriétés spectroscopiques. λ_{abs} : maximum du spectre d'absorption, λ_{em} : maximum du spectre de fluorescence, τ durée de vie (ajustement par une fonction monoexponentielle), $\langle \tau \rangle$: durée de vie moyenne. Les films ont été préparés à partir d'une solution de Bodipy dans le dichlorométhane.

La fluorescence à l'état solide de l'IP-BDY est donc intéressante car il se forme des agrégats de type J, qui ont une efficacité de fluorescence élevée. Il est possible de réaliser des nanocristaux fluorescents avec cette molécule. La prochaine étape de ce travail sera d'optimiser la préparation de ces cristaux et de tester l'extinction de leur fluorescence.

Conclusion et perspectives

Lors de la décomposition en composantes principales des spectres et des déclin de fluorescence, il est nécessaire d'utiliser au moins 5 à 7 composantes pour décrire de manière satisfaisante les résultats. Cela traduit la complexité de la fluorescence à l'état solide des molécules étudiées ici. Il y a une distribution des durées de vie et des énergies dans le solide qui traduit la variabilité de l'environnement d'une molécule.

Cependant, certaines des molécules étudiées possèdent des propriétés intéressantes : l'approche consistant à synthétiser des molécules encombrées pour conserver les propriétés de fluorescence du monomère dans le solide s'est révélée être prometteuse. Plusieurs molécules nouvelles ont été préparées ces derniers mois et leur étude est en cours. De plus, le criblage d'une bibliothèque de cryptobodipy a permis de trouver une molécule qui peut former des nanocristaux fluorescents, l'IP-BDY.

Le travail réalisé au cours de ma thèse a permis de mettre au point une méthodologie d'étude de la fluorescence à l'état solide de cristaux moléculaires. Un bon candidat pour réaliser un capteur fluorescent est une molécule pour laquelle l'énergie d'excitation dans le solide est délocalisée, car dans ce cas, l'effet du quenching de la fluorescence peut être amplifié. Ce travail a aussi mis en évidence l'influence de la formulation du solide sur les propriétés photophysiques observées. La présence de défauts et la nature du solide, cristallin ou amorphe, peuvent modifier de manière importante la fluorescence.

Comme cela a déjà été évoqué, une autre manière de rapprocher des fluorophores consiste à les incorporer dans une matrice polymère. Dans ce cas, la matrice permet souvent de limiter les interactions entre les molécules et la fluorescence observée est en général celle du monomère. Cependant elles sont suffisamment proches les unes des autres pour qu'un transfert d'énergie non radiatif puisse avoir lieu. La possibilité de faire des capteurs à partir de ces assemblées de Bodipy a donc été étudiée. En particulier, des nanolatex fluorescents ont été préparés. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la troisième partie de ce manuscrit.

Troisième partie

Fluorescence en matrice polymère

Chapitre 8

Films de PMMA

Des Bodipy ont été utilisés pour préparer les films fluorescents de polyméthacrylate de méthyle (PMMA). En faisant varier la concentration de fluorophore, il est possible d'étudier l'évolution des propriétés spectroscopiques en fonction de la distance entre les molécules, et en particulier le transfert d'énergie. Ces films peuvent aussi servir comme systèmes modèles pour l'étude du quenching de la fluorescence par transfert d'énergie en milieu confiné. Pour cela, deux accepteurs ont été utilisés, le bleu de cibacron (BC), et une molécule de la famille des diaryléthènes, dont le spectre d'absorption peut être modulé par irradiation avec de la lumière UV ou visible. Les structures des molécules évoquées dans ce chapitre sont présentées figure 8.1.

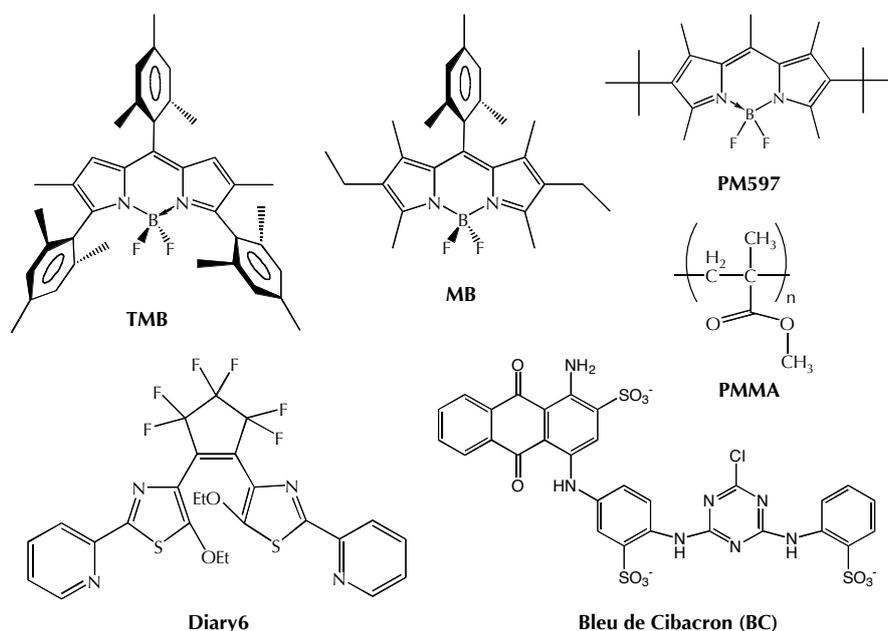


FIG. 8.1 – Structures chimiques des molécules évoquées dans ce chapitre.

8.1 Préparation et méthodes de caractérisation

8.1.1 Dépôt des films

Les films de PMMA ont été déposés sur des lamelles de microscope par évaporation à la tournette ou '*spin-coating*'. Cette technique consiste à déposer une goutte de liquide visqueux, en général un polymère dissout dans un solvant adéquat, sur un substrat en rotation sur une tournette. La force centrifuge induite par la rotation provoque un étalement du liquide alors que sa viscosité le retient sur le substrat. Un équilibre est atteint et un film homogène est formé. La fin de la rotation permet d'évaporer le solvant. Le dépôt du liquide peut s'effectuer sur le substrat immobile ou en rotation à faible vitesse. Une phase d'accélération peut être appliquée pour atteindre la vitesse maximale, qui est en général de 3 000 tr / min. Certaines tournettes possèdent un capot, ce qui permet de maîtriser l'évaporation du solvant, mais ce n'est pas le cas de celle du PPSM. La phase d'accélération, la vitesse et la durée de rotation ainsi que la viscosité de la solution initiale permettent de moduler l'épaisseur du film formé.

Les échantillons présentés ici ont été préparés à partir de solutions de PMMA et de Bodipy dans le toluène. Ces solutions ont été mélangées de manière à obtenir une solution à 1% ou 10% en masse de PMMA et des concentrations variables de Bodipy. Cette solution a été déposée sur la lamelle immobile, puis, dans certains cas une phase d'accélération d'une dizaine de secondes, a été appliquée avant d'atteindre une vitesse maximale de 1 000 ou 3 000 tr / min. La durée totale du dépôt est d'environ une minute. L'épaisseur des films a été caractérisée par microscopie à force atomique (AFM). Pour cela, une entaille est réalisée dans le film et la profondeur de cette entaille correspond à l'épaisseur du film. Les mesures ont été réalisées par Arnaud Brosseau, qui est ingénieur au PPSM. Les résultats obtenus sont rassemblés table 8.1.

% masse de PMMA	Accélération	Vitesse maximale	Épaisseur du film
10%	400	3 000	1200 ± 32 nm
10%	1 000	3 000	793 ± 32 nm
1%	300	1 000	52 ± 14 nm
1%	500	1 000	51 ± 23 nm
1%	-	1 000	36 ± 2 nm
1%	-	1 000	34 ± 2 nm
1%	1 000	3 000	37 ± 4 nm
1%	-	3 000	22 ± 2 nm

TAB. 8.1 – Épaisseur des films de PMMA mesurée à l'AFM. Les moyennes ont été réalisées sur une dizaine de points.

Avec du PMMA à 10% en masse dans le toluène, on forme des films de plusieurs centaines de nanomètres d'épaisseur, alors qu'avec du PMMA à 1% en masse l'épaisseur des films n'est que de quelques dizaines de nanomètres. Plus la concentration de polymère est élevée, plus la viscosité de la solution déposée est importante, et moins le film va s'étaler. Il est donc logique que les films formés à partir d'une solution à 10% en masse soient plus épais que ceux préparés à partir d'une solution moins concentrée. Quand la vitesse de rotation augmente, la force centrifuge est plus importante et le film formé est moins épais. Enfin, plus la vitesse initiale est rapide, moins l'épaisseur varie sur le film. Avec la tournette du PPSM et pour du PMMA dissous dans le toluène, il est donc préférable d'utiliser dès le début une vitesse de rotation rapide pour que les films soient homogènes.

Le dépôt par spin-coating permet donc de préparer des films de PMMA dont l'épaisseur est proche du micron pour une solution initiale à 10% en masse de polymère et de quelques dizaines de nanomètres pour une solution à 1% en masse.

8.1.2 Étude de la fluorescence

Les propriétés de fluorescence stationnaire et résolue en temps des films ont été étudiées en fonction de la concentration de Bodipy. Le transfert d'énergie entre les fluorophores a été évalué en mesurant l'anisotropie de fluorescence sous microscope. Les caractérisations spectroscopiques ont été réalisées sur les films préparés avec du PMMA à 10% en masse. Dans ce cas, l'épaisseur des films, plusieurs centaines de nanomètres, est grande devant la distance caractéristique du transfert d'énergie, au mieux 10 nm, et on peut considérer que le système est de dimension 3.

Les spectres d'absorption et de fluorescence des films ont été mesurés avec le CARY et le SPEX-FLUOROLOG, dans la même configuration que pour les films solides (cf. chapitre 4). Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont été mesurés. Les spectres d'excitation de fluorescence et d'absorption sont superposés. Dans les cas où les films ne sont pas suffisamment concentrés pour que le spectre d'absorption soit mesurable, les spectres d'excitation de fluorescence donnent donc une idée de l'absorbance. Les déclins de fluorescence ont été mesurés sous microscope, avec le QA (cf. chapitre 4). En spectroscopie stationnaire, la zone sondée est de quelques mm² alors que sous microscope, avec un objectif de grossissement $\times 60$, la zone étudiée est un disque de 40 microns de diamètre. Dans le premier cas, on mesure les propriétés moyennes du film sur une zone assez grande, alors que sous microscope on peut observer les variations locales à l'échelle de quelques centaines de nm.

Les trois types de mesures ont été répétés 4 à 5 fois sur la même lame. Ceci permet d'évaluer l'homogénéité du film. En effet, si l'environnement local, en particulier la concentration, varie, cela peut avoir une répercussion sur la fluorescence. Pour un même film, les valeurs des maxima d'absorption et de fluorescence et les durées de vie ne varient pas plus que l'erreur due aux appareils de mesure. Les absorbances au maximum des spectres d'absorption, pour une lame donnée, sont

proches. Par contre, les intensités de fluorescence varient beaucoup plus d'une position à l'autre, comme illustré figure 8.2. Ceci peut venir du fait que la quantité de fluorescence reçue par le détecteur varie avec l'orientation de la lame, qui est modifiée quand on déplace le film. Cela peut aussi être dû au fait que la puissance de la lampe d'excitation est importante et entraîne une saturation du signal mesuré. Les variations de l'intensité des spectres d'absorption peuvent être dues à des variations de la concentration locale de Bodipy, mais elles ne sont pas suffisantes pour modifier de manière significative la forme des spectres et la durée de vie, alors que ces paramètres varient entre deux lames de concentrations différentes. Dans la suite de ce chapitre, il sera considéré que la répartition des Bodipy est homogène dans les films.

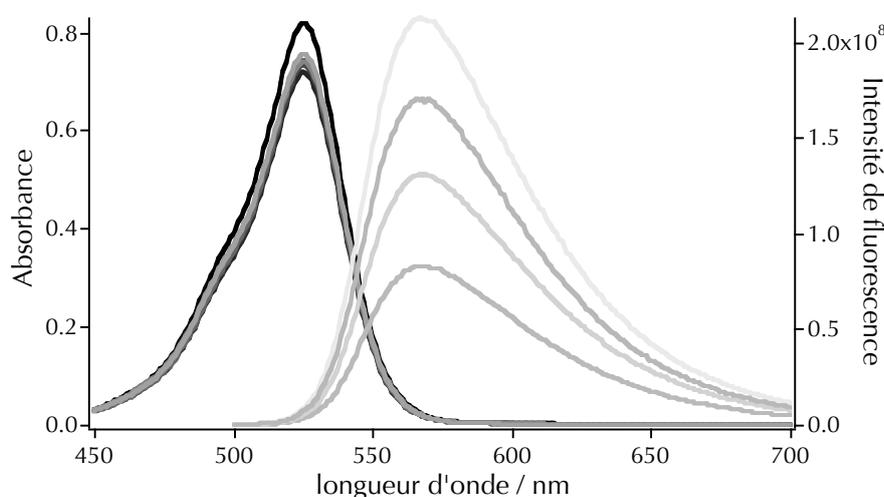
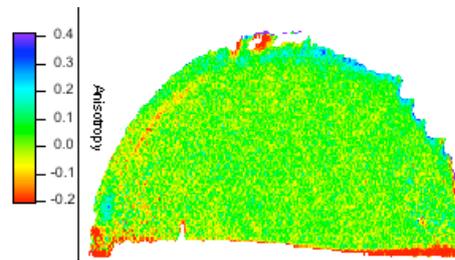
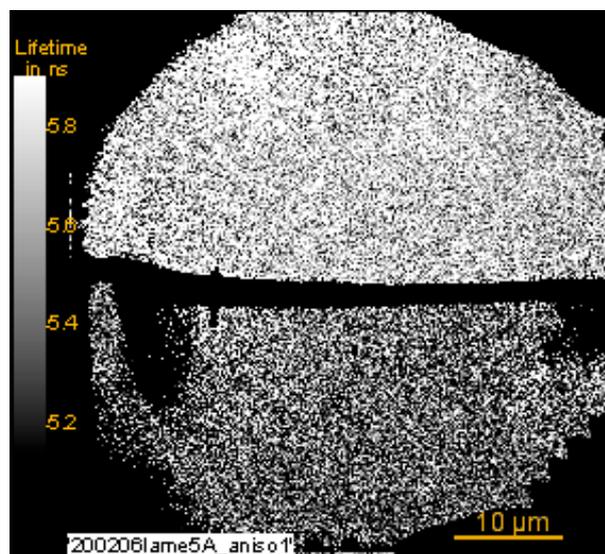
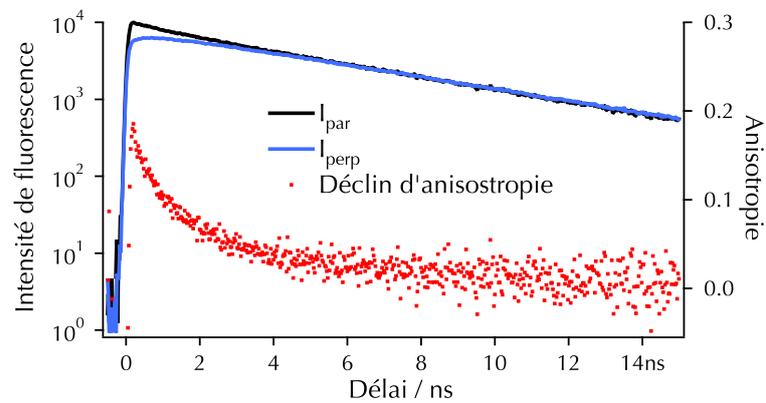


FIG. 8.2 – Spectres d'absorption (à gauche) et de fluorescence (à droite) d'un film de PM597 dans le PMMA, (0,2 mmol / g de polymère).

L'anisotropie de fluorescence permet d'étudier le transfert d'énergie entre les Bodipy dans le film (cf. chapitre 1). En effet, lorsque les molécules sont immobiles dans la matrice et quand la polarisation de la lumière émise est la même que celle de la lumière d'excitation, l'anisotropie de fluorescence est maximale. Si les molécules sont suffisamment proches les unes des autres, un homotransfert d'énergie peut se produire vers une molécule qui n'a pas la même orientation et l'anisotropie va diminuer. Après un transfert d'énergie, l'anisotropie est quasiment nulle et l'anisotropie dépend de la probabilité de transfert, qui est liée à la concentration de fluorophores.

L'anisotropie de fluorescence des films présentés ici a été mesurée avec le dispositif d'imagerie de fluorescence résolue en temps de l'équipe, qui a été décrit dans le chapitre 4. L'image est décomposée en deux parties symétriques, celle du haut correspondant à la lumière polarisée parallèlement à la polarisation d'excitation, I_{par} , et celle du bas à la lumière polarisée perpendiculairement, I_{perp} (cf. figure 4.4). L'analyse des images est réalisée avec le logiciel Igor Pro. L'anisotropie stationnaire est calculée en utilisant un facteur correctif, G , déterminé à partir d'une

FIG. 8.3 – *Film TMB15-2, imagerie d'anisotropie stationnaire.*FIG. 8.4 – *Film TMB15-2, Imagerie de durée de vie. En haut : I_{perp} , en bas : I_{par}* FIG. 8.5 – *Film TMB15-2, Déclins parallèle I_{par} , perpendiculaire I_{perp} et d'anisotropie.*

solution de Rhodamine 6G dans l'eau, pour laquelle l'anisotropie est nulle. Le déclin d'anisotropie est construit à partir des déclins correspondant à deux ROI, symétriques, dessinées sur chaque moitié de l'image. L'anisotropie $r(t)$ est calculée avec la formule :

$$r(t) = \frac{I_{par}(t) - G * I_{perp}(t)}{I_{par}(t) + 2 * G * I_{perp}(t)} \quad (8.1)$$

Les figures 8.3, 8.4 et 8.5 présentent les résultats obtenus pour un film contenant du TMB (TMB15-2). La concentration est suffisamment élevée pour qu'il y ait une relaxation de l'anisotropie. L'image d'anisotropie stationnaire (figure 8.3) n'est pas parfaitement homogène, en particulier sur les bords. Les valeurs d'anisotropie stationnaire présentées ici sont des valeurs moyennes sur une ROI correspondant à la zone centrale de l'image. Sur le FLIM (figure 8.4), la durée de vie moyenne de la partie haute de l'image est plus longue que celle de la partie basse. Cela est dû à la forme des déclins correspondant à chaque zone (cf. figure 8.5) ; comme il y a une relaxation de l'anisotropie, aux temps courts, l'intensité de fluorescence polarisée perpendiculairement à la polarisation d'excitation est plus importante que celle qui a la même polarisation. La durée de vie moyenne est donc plus importante dans le premier cas par rapport au second. La figure 8.5 montre aussi le déclin d'anisotropie, calculé à partir des déclins parallèle et perpendiculaire.

Dans le cas d'un transfert d'énergie de type Förster, la polarisation initiale de la lumière a disparu dès le premier transfert. L'anisotropie à temps long, appelée anisotropie résiduelle, r_∞ est en théorie égale à $0,04r_0$, soit $0,012$ pour $r_0 = 0,3$. Le déclin d'anisotropie dépend de la probabilité de trouver le donneur à l'état excité $G(t)$, qui évolue en $exp\sqrt{t}$. Il est alors de la forme [136, 140] :

$$r(t) = r_\infty + (r_0 - r_\infty)G(t) \quad \ln G(t) = -C\sqrt{\frac{\pi}{2}}\sqrt{\frac{t}{\tau_F}} \quad (8.2)$$

Avec C la concentration de fluorophore en nombre de molécules dans une sphère de rayon R_0 et τ_F la durée de vie de l'état excité en l'absence de transfert.

En pratique, la valeur théorique de r_∞ est dans le bruit de la mesure. Les déclins d'anisotropie mesurés ont donc été ajustés par la fonction suivante, où les inconnues sont r_0 et τ_{app} :

$$r(t) = r_0 exp\left(\sqrt{\frac{t}{\tau_{app}}}\right) \quad (8.3)$$

8.2 Propriétés spectroscopiques des Bodipy dans le PMMA

Trois Bodipy ont été utilisés; le mésitylbodipy (MB), le trimésitylbodipy (TMB) et le PM597. Pour chaque molécule, plusieurs concentrations de fluorophore ont été utilisées, de manière à faire varier la distance entre deux molécules, et donc la probabilité de transfert de l'énergie d'excitation. Les propriétés spectroscopiques mesurées sont rassemblées table 8.2. Les films ont été préparés avec deux sortes de PMMA : l'un de masse molaire moyenne en masse $M_w = 15\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ et l'autre à $M_w = 120\,000 \text{ g.mol}^{-1}$. Le premier a été utilisé pour le MB (lames MB-1 à 5) et le TMB (lames TMB15-1 à 6), le second pour le TMB (lames TMB120-1 à 6) et le PM597 (lames PM597-1 à 8). Les résultats obtenus pour le TMB montrent qu'il n'y a pas de différences significatives des propriétés spectroscopiques entre des films préparés avec l'un ou l'autre des polymères.

Pour des molécules réparties de manière aléatoire dans un volume grand devant la distance intermoléculaire, la distance entre deux molécules est décrite par une fonction de distribution, $w(r)$, qui dépend du nombre de molécules considérées. La distance moyenne au plus proche voisin, d , est donnée par la relation [141] :

$$d = \int_0^{\infty} r w(r) dr = 0,5540 n^{-1/3}, \quad \text{avec} \quad w(r) = 4\pi r^2 n \exp\left(-\frac{4}{3}\pi r^3 n\right) \quad (8.4)$$

où n est le nombre de molécules par m^3 . Cette formule a été utilisée pour calculer les valeurs présentées table 8.2. Elle est plus adaptée que la formule $d = n^{-1/3}$, qui est parfois utilisée. Cette dernière est basée sur l'hypothèse que toutes les molécules sont à la même distance les unes des autres, ce qui est peu réaliste pour les échantillons utilisés ici.

Le transfert d'énergie est caractérisé par le rayon de Förster R_0 , qui est la distance à laquelle le transfert et la désexcitation par fluorescence sont équiprobables. Il peut être calculé à partir des spectres d'absorption, $\epsilon(\lambda)$, et de fluorescence en solution, $I(\lambda)$, avec la formule [9] :

$$R_0 = 0,2108 \left(\frac{\kappa^2 \Phi}{n^4} \int I_D(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right) \quad (8.5)$$

en prenant pour valeur du facteur d'orientation $\kappa^2 = 0,496$, c'est à dire que les molécules sont orientées de manière aléatoire mais restent immobiles pendant la durée de vie de fluorescence. Les valeurs sont les suivantes;

Molécule	R_0
MB	4,80 nm [48]
TMB	5,00 nm [142]
PM597	3,90 nm

Les distances intermoléculaires varient entre 0,5 et 6 R_0 , ce qui permet d'étudier toutes les possibilités de transfert. Pour comparer les propriétés spectroscopiques des fluorophores dans le PMMA à celles dans d'autres solvants, les valeurs correspondant au cas où il n'y a pas de transfert,

c'est à dire les films les moins concentrés, ont été considérées. Les variations de ces propriétés, et en particulier l'anisotropie de fluorescence, en fonction de la concentration ont aussi été étudiées.

8.2.1 Cas $d > R_0$

Les spectres d'absorption et de fluorescence des films ainsi que les déclin de fluorescence sont présentés figures 8.6 et 8.7, et les valeurs correspondantes sont rassemblées table 8.2. La forme des spectres d'absorption et de fluorescence est similaire à celle des spectres mesurés dans le dichlorométhane. Les spectres d'absorption présentent une bande entre 500 et 550 nm qui correspond à la transition $S_0 \rightarrow S_1$, une seconde bande entre 350 et 400 nm qui correspond à la transition $S_0 \rightarrow S_2$ et une augmentation de l'absorbance dans l'UV qui est due au PMMA.

	Concentration (mol / g _{PMMA})	Distance (nm)	d/R ₀	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	λ_{exc} (nm)	τ (ns)	Anisotropie	
								stationnaire	τ_{app} (ns)
MB-1	$7,14 \cdot 10^{-6}$	3,22	0,67	525	536		5,85	$-5 \cdot 10^{-3}$	
MB-2	$7,14 \cdot 10^{-7}$	6,95	1,45	525	535		5,69	0,15	
MB-3	$7,14 \cdot 10^{-8}$	14,96	3,12				5,66	0,23	
TMB15-1	$1,7 \cdot 10^{-5}$	2,41	0,48	543	556		5,50	-0,01	-
TMB15-2	$5,6 \cdot 10^{-6}$	3,49	0,70	543	556	543	5,50	0,04	1,01
TMB15-3	$5,6 \cdot 10^{-7}$	7,53	1,51	543	552	544	5,26	0,23	75 ± 15
TMB15-4	$5,6 \cdot 10^{-8}$	16,23	3,25				5,25	0,27	-
TMB15-5	$8 \cdot 10^{-9}$	31,04	6,20				5,25	0,29	-
TMB120-1	$1,12 \cdot 10^{-5}$	2,78	0,56	543	556	544	5,78	-0,03	-
TMB120-2	$5,6 \cdot 10^{-6}$	3,50	0,70	543	554	543	5,52	0,018	0,43
TMB120-3	$2,7 \cdot 10^{-6}$	4,46	0,89	543	554	544	5,34	0,11	$3,99 \pm 1,08$
TMB120-4	$5,6 \cdot 10^{-7}$	7,53	1,51	543	552	544	5,26	0,22	43,7
TMB120-5	$2,7 \cdot 10^{-7}$	9,61	1,92	543	551	544	5,25	0,26	187 ± 11
TMB120-6	$5,6 \cdot 10^{-8}$	16,23	3,25		551	544	5,24	0,28	-
PM597-1	$2 \cdot 10^{-4}$	1,05	0,27	525	568		3,69	-0,01	-
PM597-2	$9,6 \cdot 10^{-5}$	1,36	0,35	525	567		4,41	-0,04	-
PM597-3	$9,6 \cdot 10^{-6}$	2,92	0,75	525	563	525	5,28	0,03	$0,47 \pm 0,03$
PM597-4	$4,8 \cdot 10^{-6}$	3,68	0,94	525	560	525	5,30	0,11	$3,27 \pm 0,11$
PM597-5	$9,6 \cdot 10^{-7}$	6,29	1,61	524	556	525	5,48	0,22	$82,0 \pm 3,5$
PM597-6	$4,8 \cdot 10^{-7}$	7,93	2,03	524	555	526	5,52	0,23	307 ± 39
PM597-7	$9,6 \cdot 10^{-8}$	13,55	3,47		553	528	5,55	0,27	-
PM597-8	$4,8 \cdot 10^{-8}$	17,08	4,38		554	528	5,55	0,3	-

TAB. 8.2 – Données spectroscopiques du MB, du TMB et du PM597 dans le PMMA à différentes concentrations. Les déclin de fluorescence ont été ajustés par une fonction monoexponentielle. Les déclin d'anisotropie par une fonction en $\exp \sqrt{t/\tau_{app}}$.

Le PM567 et le PM597 ont été incorporés dans des matrices contenant du PMMA, dans le but de préparer des laser solides [143, 144]. Dans les cas présentés, la concentration de Bodipy est telle que la distance entre deux fluorophores est grande devant le rayon de Förster R_0 de l'homotransfert ; $D \approx 2,5R_0$ pour le PM567 et $D \approx 6,8R_0$ pour le PM597. La fluorescence de ces molécules dans le PMMA est comparée à celle des bodipy en solution dans l'acétate d'éthyle, qui est un solvant modèle de la matrice polymère. Le maximum d'absorption varie peu, alors qu'un déplacement vers le bleu du spectre de fluorescence est observé. Cette tendance est la même si le solvant de référence est le dichlorométhane. Ces résultats peuvent être comparés aux propriétés spectroscopiques des films TMB120-6 et PM597-8, qui sont rappelées table 8.3. La position du maximum d'absorption varie peu alors qu'un déplacement vers le bleu du spectre de fluorescence des Bodipy quand ils sont incorporé dans une matrice de PMMA est observé, ce qui correspond à une diminution du déplacement de Stokes. Dans le cas de la Rhodamine 6G incorporée dans une matrice de p(HEMA-MMA)¹, où les mêmes évolutions par rapport au méthanol sont observées, la diminution du déplacement de Stokes est attribuée à une augmentation des forces de dispersion de London, qui sont proportionnelles à $(n^2-1)/(2n^2+1)$, où n est l'indice de réfraction du milieu dans lequel se trouve le fluorophore [145]. Les indices de réfraction du PMMA, du dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle sont de 1,49, 1,42 et 1,33. Le solvatochromisme observé suit donc l'évolution des forces de dispersion.

Solvant	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	Déplacement de Stokes (cm^{-1})	τ (ns)	Anisotropie stationnaire
TMB					
CH ₂ Cl ₂	543	556	430	6,30	-
PMMA	543	551	267	5,25	0,29
PM597					
Acétate d'éthyle	523	569	1437	4,31	-
CH ₂ Cl ₂	526	565	1385	4,57	-
PMMA	524	554	1033	5,55	0,30

TAB. 8.3 – Données spectroscopiques du TMB et du PM597 dans différents solvants. PM597 dans l'acétate d'éthyle : référence [146], valeurs dans le CH₂Cl₂ : chapitre 3.

Les déclin de fluorescence des films TMB120-6 et PM597-8 peuvent être ajustés avec une fonction monoexponentielle. Pour le film TMB120-6, la durée de vie est de 5,24 ns, ce qui est inférieur à la durée de vie de fluorescence mesurée dans le dichlorométhane, qui est de 6,30 ns. Au contraire, pour le film PM597-8, la durée de vie (5,55 ns) est supérieure à celle mesurée dans le dichlorométhane (4,57 ns) et l'acétate d'éthyle (4,31 ns). Les résultats obtenus pour le PM597

¹Copolymère de 2-hydroxyéthyl-méthacrylate et de méthyl-méthacrylate en proportion 1 :1

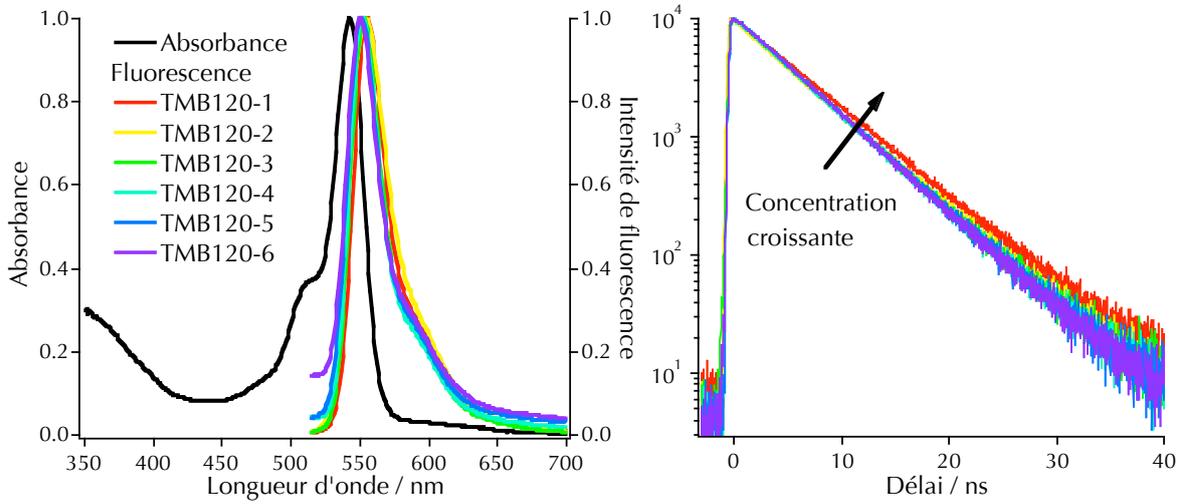


FIG. 8.6 – À gauche : Spectres d'absorption et de fluorescence des films de TMB dans le PMMA. À droite : Déclins de fluorescence. Les concentrations varient entre $5,6 \cdot 10^{-8}$ et $2 \cdot 10^{-4}$ mol / g_{PMMA}, ce qui correspond à $4,38 > d/R_0 < 0,27$.

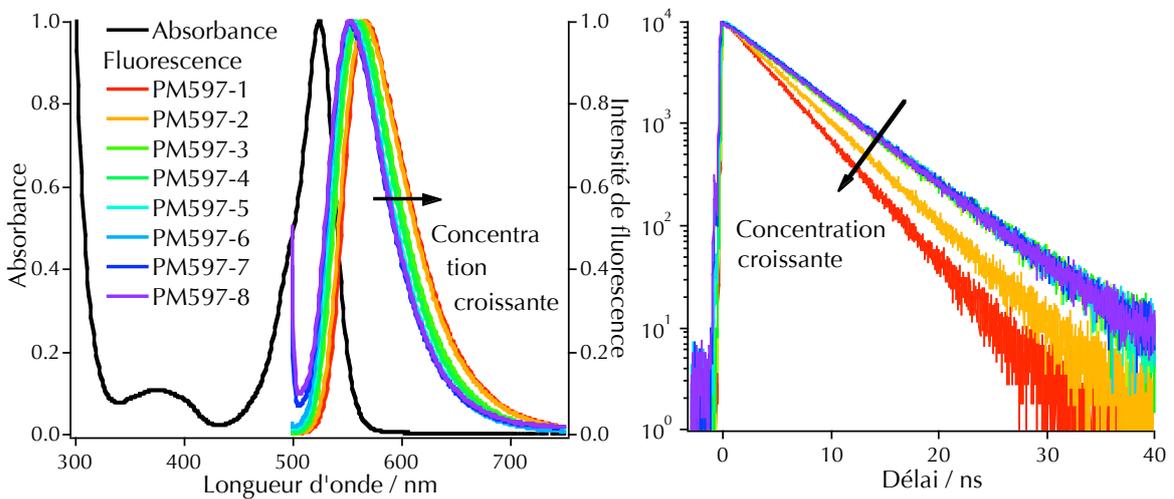


FIG. 8.7 – À gauche : Spectres d'absorption et de fluorescence des films de PM597 dans le PMMA. À droite : Déclins de fluorescence. Les concentrations varient entre $4,8 \cdot 10^{-8}$ et $1,12 \cdot 10^{-5}$ mol / g_{PMMA}, ce qui correspond à $3,25 > d/R_0 < 0,56$.

sont cohérents avec ce qui a été publié. D'après la formule de Strickler - Berg², la constante de désactivation radiative k_r augmente avec l'indice de réfraction [9, 146]. Donc k_r augmente dans le PMMA par rapport aux mesures effectuées en solution. Cette évolution est vérifiée dans la littérature. Par contre, l'effet du PMMA sur la constante de désactivation non radiative, k_{nr} varie d'une molécule à l'autre; pour le PM597, k_{nr} diminue alors que pour le PM567, k_{nr} augmente. Pour les molécules étudiées ici, l'augmentation de la durée de vie du PM597, qui correspond à une diminution de $k_r + k_{nr}$, est due à une diminution des voies de désexcitation non radiatives, par contre la diminution de la durée de vie du TMB ne peut pas être expliquée, car il faudrait déterminer k_{nr} .

L'anisotropie stationnaire r_0 est de 0,29 pour le TMB et de 0,30 pour le PM597. La valeur de l'anisotropie résolue en temps $r(t)$ ne varie pas dans la fenêtre temporelle considérée (cf figure 8.9). Le r_0 mesuré est inférieur à la valeur maximale théorique qui est de 0,4. Cette valeur est aussi appelée *anisotropie fondamentale*. La valeur expérimentale, appelée *anisotropie limite*, mesurée pour des fluorophores immobiles est toujours inférieure à l'anisotropie fondamentale [9]. Cela vient en partie du fluorophore lui-même. La diminution est attribuée à des oscillations du fluorophore par rapport à sa géométrie d'équilibre, qui se produisent dans des temps trop courts pour être observés en fluorescence résolue en temps, et à une modification de la géométrie du fluorophore entre l'état fondamental et l'état excité. Cependant, le déclin d'anisotropie du TMB dans le squalanne, qui est un solvant très visqueux, donne $r_0 = 0,34$, ce qui est supérieur à la valeur mesurée dans le PMMA. Il pourrait y avoir une rotation des molécules dans le polymère. La polarisation $P = 3r/(2+r)$ de la lumière permet de calculer le temps de réorientation τ_{or} :

$$\tau_{or} = \frac{1/P_\infty - 1/3}{1 - P} P\tau \quad (8.6)$$

Avec $P_\infty = 0,5$, la polarisation quand il n'y a pas de réorientation, P la polarisation mesurée et τ la durée de vie de fluorescence. Pour le TMB on trouve $P = 0,38$ et $\tau_{or} \approx 18,2$ ns et pour le PM597, $P = 0,39$ et $\tau_{or} \approx 21,3$ ns. Dans la littérature, la valeur finie de τ_{or} , en l'absence de transfert d'énergie, est attribuée à une réorientation de la molécule dans la matrice polymère. Cependant, pour du PM567 dans une matrice contenant 95% de PMMA et 5% de PETA (pentaérythritoltriacylate), $\tau_{or} \approx 170$ ns. Le PETA permet d'avoir un polymère qui forme un réseau tridimensionnel. Même si la matrice n'est pas exactement la même, on peut s'attendre à une valeur proche de τ_{or} pour les Bodipy dans le PMMA, ce qui n'est pas le cas. De plus, d'après la loi de Stokes - Einstein [9], τ_{or} est proportionnel au volume occupé par la molécule, et la différence de τ_{or} , devrait être plus importante entre les deux molécules. Il semble donc peu probable que la diminution de la valeur de l'anisotropie limite mesurée dans le PMMA soit due à un mouvement des molécules dans la matrice, qui se produirait pendant la durée de vie de l'état excité.

² $1/\tau_r = 2,88.10^{-9} * n^2 (\int F(\bar{\nu}_F) d\bar{\nu}_F / \int \bar{\nu}_F^3 F(\bar{\nu}_F) d\bar{\nu}_F) * \int \epsilon(\bar{\nu}_A) / \bar{\nu}_A d\bar{\nu}_A$ [9]

La mesure de l'anisotropie est aussi sensible aux artefacts expérimentaux. En particulier, elle diminue quand l'angle de collection de la lumière augmente. Les mesures ont été réalisées sous microscope avec un objectif $\times 60$ qui a une ouverture numérique (NA) de 0,95. L'angle de collection u , donné par $\sin u = NA/n$, est pour un fluorophore dans le PMMA ($n=1,50$) de 39° . Ceci est inférieur à la valeur à partir de laquelle la mesure est perturbée qui est de 50° [132]. Cependant, même si la calibration du montage a montré que la mesure d'anisotropie était peu modifiée sous microscope [132], l'hypothèse la plus probable pour expliquer la valeur de l'anisotropie limite mesurée est que cela est dû à la mesure sous microscope. Il faut noter que la mesure de l'évolution temporelle de l'anisotropie n'est pas modifiée par l'angle de collection de la lumière.

8.2.2 Évolution des propriétés spectroscopiques avec la concentration

Le maximum d'absorption varie peu avec la concentration, alors qu'un déplacement vers le rouge des spectres de fluorescence est observé quand la concentration augmente. Ce déplacement bathochrome est probablement dû à une réabsorption de la fluorescence quand la concentration est élevée, comme cela a déjà été observé pour des pyrrométhènes en solution [6]. En effet, pour le film TMB120-1, l'absorbance est de l'ordre de 0,1 et pour le film PM597-1, l'absorbance est de l'ordre de 0,8. Pour le TMB, l'absorbance la plus élevée n'est pas très importante mais pour le PM597 elle est non négligeable, ce qui peut expliquer que le déplacement vers le rouge est plus important pour cette dernière molécule.

Dans tous les cas, le déclin de fluorescence peut être ajusté par une fonction monoexponentielle. Pour le TMB, la durée de vie augmente avec la concentration. Elle est de 5,25 ns pour l'échantillon le moins concentré, et de 5,78 ns pour l'échantillon le plus concentré. Un film a été préparé par dépôt et évaporation sur une lamelle de microscope d'une solution très concentrée de TMB dans le PMMA ($>$ à celle utilisée pour le film TMB120-1). La durée de vie de fluorescence a été mesurée en deux points et les valeurs sont encore supérieures à celle du film TMB120-1 ; 9,30 et 7,15 ns au lieu de 5,8 ns. Pour le PM597, la durée de vie diminue quand la concentration augmente et passe de 5,55 à 3,69 ns. Dans le cas d'une réabsorption - réémission du signal de fluorescence, une augmentation de la durée de vie est attendue [10, 145]. Par contre, s'il y a formation d'une espèce non fluorescente, la durée de vie diminue [10]. Il a été démontré, pour de l'érythrosine B dispersée dans le PVA (poly-vinylalcool), que des agrégats peuvent se former à forte concentration [23]. On peut supposer que c'est aussi le cas pour les films les plus concentrés présentés ici, puisque d est alors du même ordre de grandeur que la taille de la molécule. L'étude de la fluorescence à l'état solide du TMB, qui a été présentée dans le chapitre 5, indique que cette molécule forme des agrégats pour lesquels la durée de vie de l'état excité est plus longue que celle de la molécule en solution ($\tau \approx 8$ ns). Leur formation dans le film obtenu par évaporation pourrait expliquer les durées de vie mesurées. Par contre, le PM597 à l'état cristallin a tendance à former des agrégats peu fluorescents (cf. chapitre 6). La diminution de la durée de vie dans les films pourrait s'expliquer par un quenching de la fluorescence des monomères par des agrégats non fluorescents.

L'anisotropie stationnaire et le déclin d'anisotropie varient avec la concentration de fluorophore. De manière qualitative, on peut observer que ces variations ont lieu dans la même gamme de valeur du rapport d/R_0 que l'efficacité de transfert, c'est à dire entre $d/R_0 \approx 0,5$ et $d/R_0 \approx 1,5$ [9]. Pour des valeurs inférieures, la probabilité est de 1 et la fluorescence est totalement dépolarisée et pour des valeurs supérieures, il n'y a pas de migration de l'énergie et l'anisotropie est maximale.

L'anisotropie stationnaire peut être reliée à la concentration de fluorophore par la relation [9, 147] :

$$\frac{r}{r_0} = 1 - \sqrt{\pi}\gamma \exp(\gamma^2)[1 - \operatorname{erf}(\gamma)] \quad (8.7)$$

Avec r , l'anisotropie stationnaire en présence de transfert et r_0 , la valeur en l'absence de transfert. erf est la fonction d'erreur. γ est proportionnel au nombre de molécules présentes dans une sphère de rayon R_0 . Ces deux dernières grandeurs sont définies par :

$$\operatorname{erf}(\gamma) = \frac{2}{\pi} \int_0^\gamma \exp(-u^2) du, \quad \gamma = \frac{\sqrt{\pi}}{2} C_A \frac{4}{3} \pi R_0^3 \quad (8.8)$$

C_A est la concentration d'accepteur, en nombre de molécules par unité de volume. Ici C_A est égale à la concentration de Bodipy dans le film.

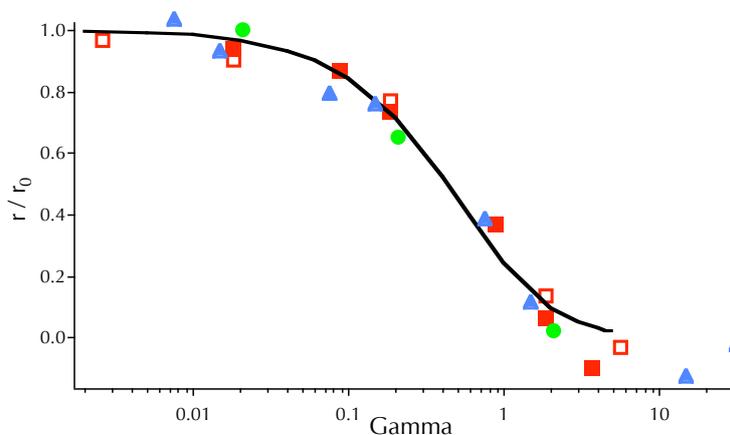


FIG. 8.8 – Évolution du rapport entre l'anisotropie stationnaire et l'anisotropie limite en fonction de γ ; — : théorie; ■ : TMB dans le PMMA à $M_w = 120\,000\text{ g.mol}^{-1}$; □ : TMB dans le PMMA à $M_w = 15\,000\text{ g.mol}^{-1}$; ▲ : PM597 dans le PMMA à $M_w = 120\,000\text{ g.mol}^{-1}$; ● : MB dans le PMMA à $M_w = 15\,000\text{ g.mol}^{-1}$.

L'évolution du rapport entre l'anisotropie stationnaire et l'anisotropie limite en fonction de γ est présentée figure 8.8. Pour les trois molécules, il y a une bonne corrélation entre la valeur théorique et les valeurs expérimentales, ce qui confirme que la diminution de l'anisotropie observée est due à un transfert d'énergie non radiatif.

Les déclin d'anisotropie mesurés pour les films PM597-3 à 6 et PM597-8, ainsi que les ajustements correspondants, sont présentés figure 8.9. Les constantes de temps apparentes, τ_{app} , correspondant à l'ajustement par une fonction en racine de t, sont rassemblées table 8.2. L'anisotropie limite mesurée à partir de ces déclin est de $r_0 = 0,302 \pm 0,033$ pour le TMB et de $r_0 = 0,293 \pm 0,030$ pour le PM597, ce qui est cohérent avec les valeurs obtenues pour l'anisotropie stationnaire en l'absence de transfert d'énergie.

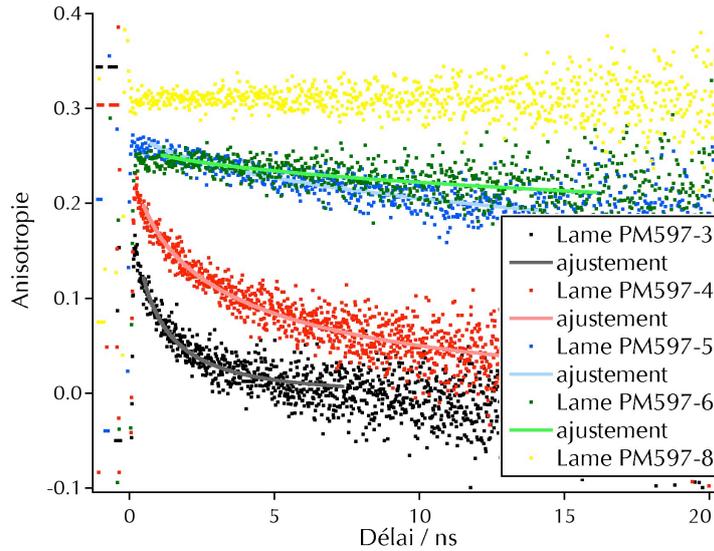


FIG. 8.9 – Déclin d'anisotropie du PM597 dans le PMMA à différentes concentrations.

La constante de temps apparente est liée à la concentration en nombre de fluorophores par unité de volume par :

$$\frac{1}{\sqrt{\tau_{app}}} = C_A \frac{4}{3} \pi R_0^3 \sqrt{\frac{\pi}{2}} \frac{1}{\sqrt{\tau_F}} \quad \tau_{app} = \frac{1}{2\gamma^2} \tau_F \quad (8.9)$$

Avec τ_F , la durée de vie de fluorescence en l'absence de transfert d'énergie, et γ la grandeur définie précédemment. Les valeurs théoriques et expérimentales de τ_{app} en fonction de γ sont présentées figure 8.10. Les valeurs théoriques ont été calculées en prenant pour valeur de τ_F , la durée de vie du film le moins concentré. Si on utilise la valeur mesurée à la concentration correspondante, le résultat n'est pas significativement différent. Il y a une bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques.

L'incorporation de Bodipy dans une matrice de PMMA permet donc de préparer des films minces fluorescents. Lorsque la concentration est suffisamment faible pour que la distance entre plus proches voisins soit inférieure à R_0 , les propriétés spectroscopiques sont cohérentes avec ce qui a été observé pour d'autres fluorophores. Lorsque la concentration augmente, une diminution de l'anisotropie de fluorescence est observée. L'évolution de cette grandeur peut être décrite dans

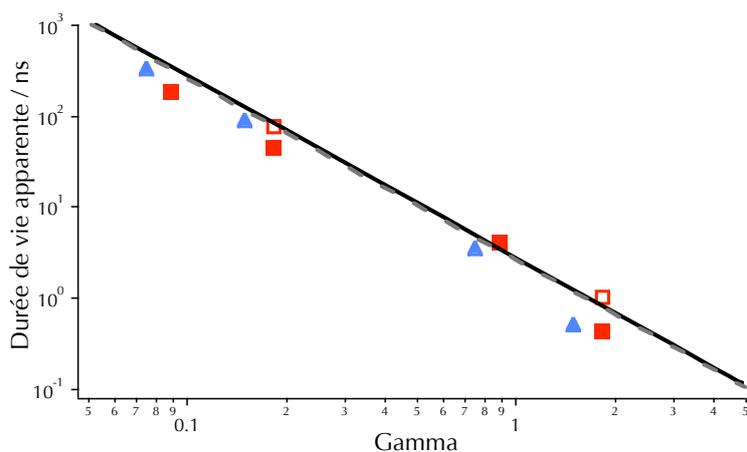


FIG. 8.10 – Évolution de la durée de vie apparente τ_{app} en fonction de γ ; — : PM597, théorie ; - - : TMB théorie ; ■ : TMB dans le PMMA à $M_w = 120\,000\text{ g.mol}^{-1}$; □ : TMB dans le PMMA à $M_w = 15\,000\text{ g.mol}^{-1}$; ▲ : PM597 dans le PMMA à $M_w = 120\,000\text{ g.mol}^{-1}$.

le cadre de la théorie de Förster pour le transfert d'énergie non radiatif par interaction dipôle-dipôle. Il y a donc une migration de l'énergie d'excitation dans le volume du film. À très forte concentration, des agrégats peuvent se former, et, s'il sont non fluorescents, cela peut diminuer la fluorescence émise. Il serait donc préférable d'utiliser une molécule qui reste fluorescente même quand elle s'agrège.

8.3 Extinction de la fluorescence

Il existe des dispositifs basés sur la modulation de la fluorescence d'un film mince [148, 149]. Ils ont été utilisés comme senseurs fluorescents ou pour le stockage d'information. Cette section décrit des essais de quenching de la fluorescence des films de PMMA dopés avec du Bodipy, soit en déposant une solution de bleu de cibacron sur le film, soit en incorporant un diaryléthène dans la matrice.

8.3.1 Quenching par le bleu de Cibacron

Le spectre d'absorption du BC présente une bande entre 550 et 650 nm, c'est donc un bon candidat pour éteindre la fluorescence des Bodipy par transfert d'énergie (cf figure 8.11). Le rayon de Förster, R_0^{d-a} est de 6,1 nm ($\kappa^2 = 0,476$) pour le transfert d'énergie entre le TMB et le BC et de 4,1 nm si on considère le PM597 et le BC. Des tests ont donc été réalisés en plaçant des solutions de BC dans l'eau à différentes concentrations, à la surface du film de PMMA. Le dispositif expérimental est le même que celui utilisé pour les essais de quenching de la fluorescence des nanocristaux de Gu009.

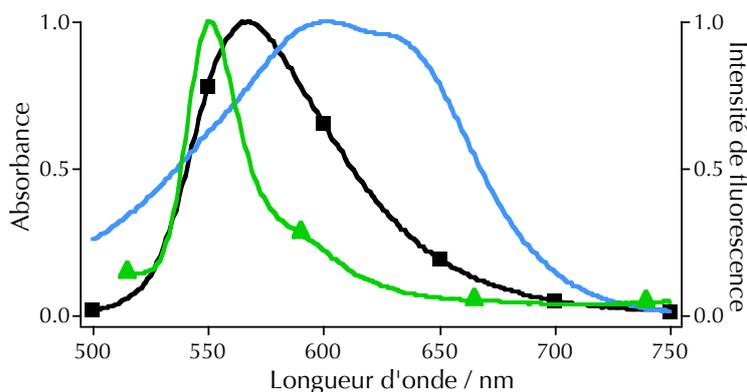


FIG. 8.11 — — : Spectre d'absorption du bleu de cibacron dans l'eau. Spectres de fluorescence : ▲ : TMB dans le PMMA, ■ : PM597 dans le PMMA.

Dans un premier temps, des films préparés à partir de solutions à 10% en masse de PMMA dopés par du TMB, ont été utilisés. Aucune variation de l'intensité de fluorescence ou de la durée de vie n'a été observée lorsque le bleu de cibacron est mis en contact avec le film. Ce résultat peut être lié à l'épaisseur du film, qui est de l'ordre du micron. Or, la portée du quenching par transfert d'énergie est au maximum de quelques R_0 , c'est à dire quelques dizaines de nanomètres. Donc, même si la fluorescence de la surface du film est éteinte, c'est la fluorescence du reste du dépôt qui est prédominante et il n'y a pas de changement des grandeurs mesurées. Des films moins épais, préparés à partir de PMMA à 1% en masse ont donc été préparés. Le dépôt a été réalisé avec

une vitesse de 3 000 tr / min, ce qui, d'après le tableau 8.2, conduit à des films d'environ 20 nm d'épaisseur.

Deux films, contenant du PM597 à 10^{-5} et 10^{-6} mol / g_{PMMA}, ont été utilisés. Cela correspond à des distances entre fluorophores de 0,74 et 1,60 fois le rayon de Förster de l'homotransfert. Dans un premier temps, une image au QA a été enregistrée en présence d'eau désionisée, puis des solutions de BC à 10^{-4} , 10^{-3} et 10^{-2} M ont été ajoutées sur le film, et enfin la fluorescence du film après rinçage à l'eau désionisée a été étudiée. L'évolution de l'intensité stationnaire de l'échantillon le moins concentré au cours de la mesure pour différentes concentrations de BC est présentée figure 8.12-a. Les fluctuations du signal au cours de la mesure sont plus faibles que la variation de l'intensité moyenne entre deux mesures.

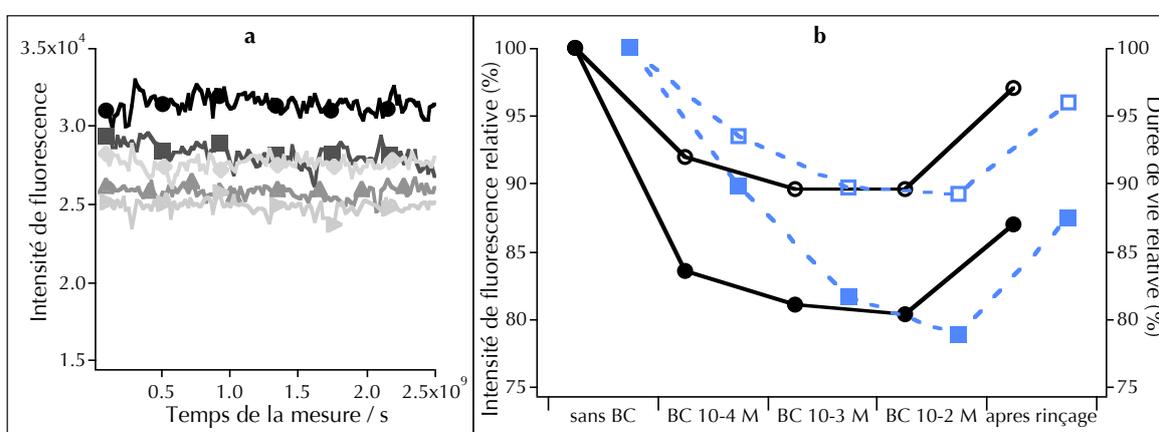


FIG. 8.12 – **a** : Intensité stationnaire en fonction du temps de mesure, pour du PM597 dans un film de PMMA, $d/R_0 = 1,60$; ● : en présence d'eau; ■ : BC à 10^{-4} M; ▲ : BC à 10^{-3} M; ► : BC à 10^{-2} M; ◆ : après rinçage. **b** : PM597 dans un film de PMMA en présence de BC. Intensité stationnaire relative; ● : $d/R_0 = 0,74$; ■ : $d/R_0 = 1,60$; Durée de vie relative; ○ : $d/R_0 = 0,74$; □ : $d/R_0 = 1,60$.

Une variation de la durée de vie a aussi été observée. L'évolution de l'intensité stationnaire et de la durée de vie par rapport aux valeurs mesurées en présence d'eau est présentée figure 8.12-b. Pour ces deux grandeurs, une diminution est observée en présence de BC à 10^{-4} et 10^{-3} M. Il n'y a pas d'évolution significative quand on ajoute du BC à 10^{-2} M. Enfin après rinçage, l'intensité stationnaire et la durée de vie de fluorescence remontent, sans revenir à leurs valeurs initiales. Le fait que cet effet soit au moins en partie réversible indique qu'il résulte de l'ajout de BC. Cette molécule étant peu soluble dans l'eau, il est possible qu'une partie du colorant reste adsorbé à la surface du film de PMMA. Il y a donc une extinction de la fluorescence des films de PMMA dopés par du PM597. Cependant l'effet est assez limité puisque la variation d'intensité obtenue n'est que de 20% de la valeur initiale. Pour les solutions de BC à 10^{-3} M et 10^{-2} M, il semble qu'un palier ait été atteint.

Les expériences présentées ici, bien que très préliminaires, montrent qu'il est possible d'éteindre la fluorescence des films de PMMA dopés par des Bodipy, à condition qu'ils ne soient pas trop épais, en déposant un quencheur à leur surface.

8.3.2 Films mixtes PM597 - Diary-6

Il est possible de diminuer la distance entre le donneur et l'accepteur en les incorporant tous les deux dans la matrice polymère. Comme on souhaite moduler la fluorescence du film par un transfert d'énergie, il faut pouvoir modifier le spectre d'absorption du quencheur à travers la matrice polymère. Les molécules photochromes sont de bonnes candidates pour ce type de systèmes, car il est possible de modifier ce spectre avec de la lumière, à des longueurs d'ondes qui ne sont pas absorbées par le PMMA.

Le *photochromisme* est une transformation photoinduite et réversible entre deux états A et B d'une entité chimique qui diffèrent par leur spectre d'absorption [150]. Cette réaction est schématisée figure 8.13. La forme A est la forme thermodynamiquement stable et le passage de la forme A à la forme B se fait par irradiation dans l'UV dans la plupart des cas. La réaction inverse peut se produire thermiquement ou par irradiation à une autre longueur d'onde, en général dans le visible. La réaction de photochromisme peut être une isomérisation cis-trans, comme pour les azobenzènes, un transfert de protons intramoléculaire comme pour les anils, ou une cyclisation, comme pour les diaryléthènes qui nous intéressent ici.

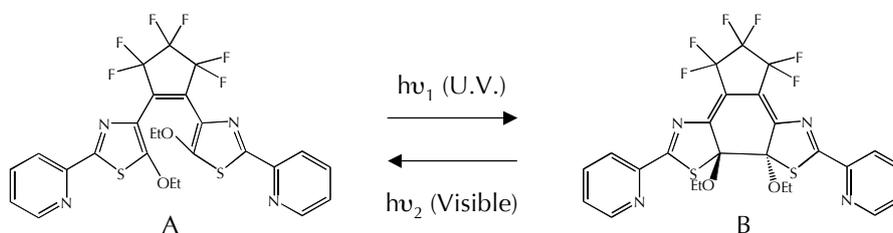


FIG. 8.13 – Réaction de photochromisme pour le Diary 6.

Le photochromisme peut être observé en solution ou à l'état solide, i.e. à l'état cristallin ou pour des molécules dispersées dans une matrice. L'irradiation entraîne une modification du spectre d'absorption du système, en général on passe d'une forme incolore à une forme colorée. Les spectres d'absorption de la forme ouverte (A) et de la forme fermée (B) du Diary6 sont présentés figure 8.14. Le spectre d'absorption de la forme ouverte possède une seule bande dans l'UV, qui est maximale à 341 nm. Si le Diary 6 est irradié dans cette gamme de longueur d'onde, la forme B apparaît. Son spectre d'absorption possède deux bandes; l'une centrée à 328 nm et l'autre centrée à 570 nm. En irradiant la molécule dans le visible, on provoque l'ouverture du cycle du Diary6. D'autres propriétés physico-chimiques peuvent être modifiées, comme la fluorescence ou les propriétés en optique non linéaire [150].

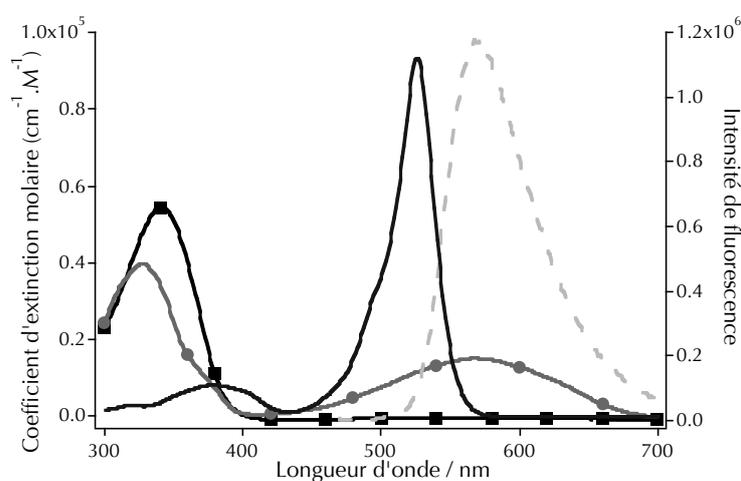


FIG. 8.14 – Spectres d'absorption; ■ : de la forme ouverte du Diary6; ● : de la forme fermée du Diary6; — : du PM597; - - : Spectre de fluorescence du PM597 dans le dichlorométhane.

Une des applications des molécules photochromes est le stockage de l'information [149, 150]; l'écriture est réalisée en irradiant le système dans l'UV et la lecture se fait dans le visible. Pour cela, il faut développer des systèmes sur support solide, et plusieurs conditions doivent être remplies [150]; la commutation doit être possible dans le solide, les deux formes doivent être stables thermiquement, la réponse du système doit être rapide, il faut un bon contraste entre les deux états, la commutation doit être possible un grand nombre de fois et enfin la lecture doit être non destructive.

La fluorescence permet un bon contraste lors de la lecture [149, 151]. Certaines molécules photochromes, pour lesquelles seule l'une des formes est fluorescente ont été utilisées, mais dans ce cas, la lecture provoque une perte d'information, car pour observer la fluorescence, il faut utiliser une longueur d'onde où la molécule absorbe, ce qui induit un retour à l'autre forme de la molécule. Pour pallier à ce problème, des fluorophores ont été ajoutés au photochrome, ce qui permet de choisir la longueur d'onde utilisée pour sonder la fluorescence. Dans ces systèmes, la fluorescence

est modulée par transfert de charge ou d'énergie entre l'une des formes du photochrome et le fluorophore.

Les Bodipy sont de bons candidats pour ce type de système, car ils sont fluorescents dans le visible, et sont donc facilement observables. Un diaryléthène substitué par deux Bodipy a été synthétisé [152]. Le rendement quantique de fluorescence de la forme ouverte est de 0,27, ce qui est la moitié du rendement quantique du Bodipy correspondant, alors que le rendement quantique de la forme fermée est de 0,02. Ce quenching de la fluorescence est attribué à un transfert d'énergie non radiatif entre le Bodipy et la forme fermée du photochrome, qui possède une bande d'absorption ayant un bon recouvrement avec la fluorescence du Bodipy. Le quenching de la fluorescence d'un Bodipy, le PM546 ou 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentaméthyl-4-Bora-3a,4a-diaza-s-indacène, par un Diaryléthène, le CMTE ou *cis*-1,2-dicyano-1,2-bis(2,4,5-triméthyl-3thiényl)éthane, dans une matrice de PMMA a aussi été testé [153]. Bien que les spectres ne se recouvrent pas, un léger quenching de la fluorescence du PM546 est observé en présence de la forme ouverte mais, en présence de la forme fermée, une diminution encore plus importante de la fluorescence est observée. Le ratio des intensités de fluorescence avant et après irradiation dans l'UV peut aller jusqu'à plus de 600. La commutation a été réalisée 20 fois sans altération de la fluorescence. Dans ce système le CMTE est en large excès par rapport au PM546.

Au PPSM, l'équipe du Pr. Keitaro Nakatani développe un système de stockage de l'information basé sur des nanoparticules de photochrome associées à des fluorophores. La préparation des particules est actuellement développée par Arnaud Spangenberg dans le cadre de sa thèse. L'objectif est d'assurer le stockage de l'énergie avec un minimum de photochrome. Des expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Rémi Métivier, afin de valider le principe de stockage de l'information. Le PM597 et le Diary6 ont été choisis car le spectre de fluorescence du Bodipy présente un recouvrement satisfaisant avec le spectre d'absorption de la forme ouverte du photochrome (cf. figure 8.14). Le rayon de Förster correspondant au transfert d'énergie, calculé à partir des spectres mesurés dans le chloroforme, est de 4,8 nm.

Un film contenant uniquement du Diary6 a d'abord été préparé [154]. Sans irradiation, le spectre d'absorption est similaire à celui de la forme ouverte en solution. Après irradiation à 334 nm pendant 5 min, une bande d'absorption dans le visible apparaît et la bande dans l'UV se déplace vers le bleu, ce qui indique que la cyclisation a eu lieu. Une irradiation à 554 nm pendant 5 min permet de revenir à la forme ouverte. La commutation du Diary6 dans le PMMA est donc possible de manière efficace. De plus le film formé n'est pas fluorescent.

Deux films contenant le fluorophore et le photochrome ont été étudiés. La concentration de Diary6 est la même pour les deux films et celle de PM597 varie. Les concentrations de PM597 et de Diary6 de ces films sont rassemblées tableau 8.4. Deux films contenant les mêmes concentrations de PM597 ont aussi été préparées. J'ai étudié la fluorescence résolue en temps de ces films et des mesures de fluorescence stationnaires ont été réalisées par Rémi Métivier. Ces mesures ont été faites sur un SPEX FLUOROMAX (Horiba Jobin-Yvon), avec lequel les mesures sont plus reproductibles

qu'avec le SPEX-FLUOROLOG. Il s'agit d'un modèle plus récent que le SPEX-FLUOROLOG, pour lequel le détecteur est plus sensible, ce qui permet d'utiliser une lampe d'excitation moins puissante et donc d'éviter une modification des échantillons lors de la mesure. En effet, le Diary6 sous forme fermée absorbe à la longueur d'onde d'excitation utilisée pour mesurer la fluorescence, donc si l'intensité est trop forte, une ouverture du cycle se produit. Les résultats obtenus pour le film DA-2 sont présentés figure 8.15. L'évolution de l'intensité de fluorescence stationnaire en fonction du temps d'irradiation est présentée figure 8.16.

	Concentration PM597 (mol / g _{PMMA})	Distance D - D (nm)	Concentration Diary6 (mol / g _{PMMA})	Distance A - A (nm)	τ (ns)	Anisotropie stationnaire
D-1	$7,8 \cdot 10^{-7}$	6,7	0	0	5,34	0,25
DA-1	$7,8 \cdot 10^{-7}$	6,7	$1,73 \cdot 10^{-5}$	2,4	4,41	0,31
D-2	$7,8 \cdot 10^{-6}$	3,1	0	0	5,48	0,12
DA-2	$7,8 \cdot 10^{-6}$	3,1	$1,73 \cdot 10^{-5}$	2,4	4,85	0,16

TAB. 8.4 – Films mixtes PM597 - Diary6 dans le PMMA. Pour le transfert D-D, $R_0 = 3,9$ nm, pour le transfert D-A, $R_0 = 4,8$ nm.

Pour les mesures de durée de vie, les films sont d'abord irradiés pendant 5 min à 547 nm de manière à être sûr que tout le Diary 6 soit sous forme fermée. Dans les deux cas, la durée de vie de fluorescence est plus courte que pour les films sans photochrome (films D-1 et D-2). Comme cela a déjà été observé, il y a un quenching de la fluorescence du Bodipy en présence de la forme ouverte du Diaryléthène [152, 153]. Après irradiation pendant 5 min à 334 nm, il y a une diminution de 85% de l'intensité de fluorescence, et le déclin de fluorescence devient bi-exponentiel. Si on repasse à la forme ouverte du photochrome, en irradiant pendant 5 min à 334 nm, l'intensité et la durée de vie de fluorescence augmentent à nouveau, mais sans retrouver leurs valeurs initiales.

En fluorescence stationnaire, une diminution de l'intensité de fluorescence est observée lorsque le film est irradié à 334 nm. Elle se stabilise après 150 secondes. Cette intensité augmente sous irradiation à 547 nm et revient à sa valeur initiale après 800 secondes environ. L'efficacité de transfert théorique, Φ_T , en supposant que tous les Diary6 sont sous forme ouverte est donnée par le recouvrement entre la fonction de distribution des Diary6³ et le rendement de transfert déterminé par la théorie de Förster [155] :

$$\Phi_T = \int_0^\infty w(r) \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad (8.10)$$

Pour les films étudiés ici, $\Phi_T = 95\%$, et la valeur minimale de l'intensité stationnaire correspond à une diminution de 90% par rapport à l'intensité initiale. La valeur expérimentale est donc proche de la valeur théorique.

³La distance entre un PM597 et le Diary6 le plus proche est égale à la distance entre deux Diary6.

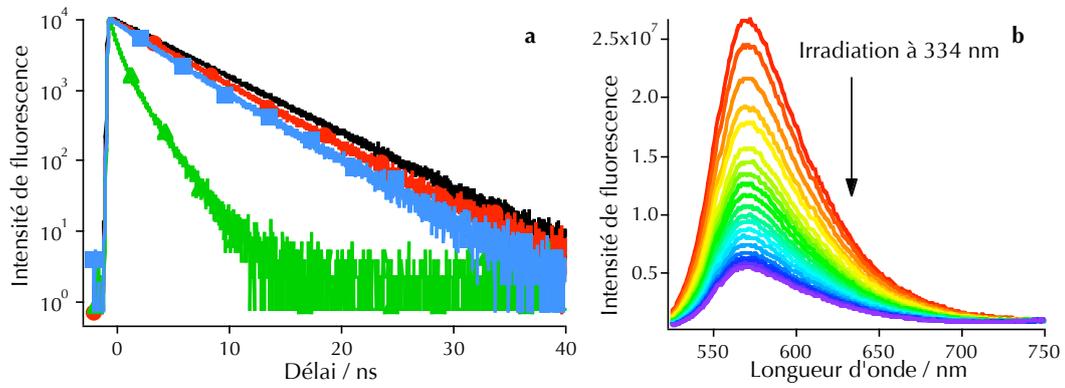


FIG. 8.15 – **a** : déclin de fluorescence : — : film D-2, ● : film DA-2, ▲ : film DA-2 après irradiation pendant 2 min à 334 nm, ■ : film DA-2 après irradiation pendant 5 min à 556 nm. ($\lambda_{exc} = 495$ nm) **b** : spectres de fluorescence du film DA-2 à différents temps d'irradiation à 334 nm. ($\lambda_{exc} = 520$ nm)

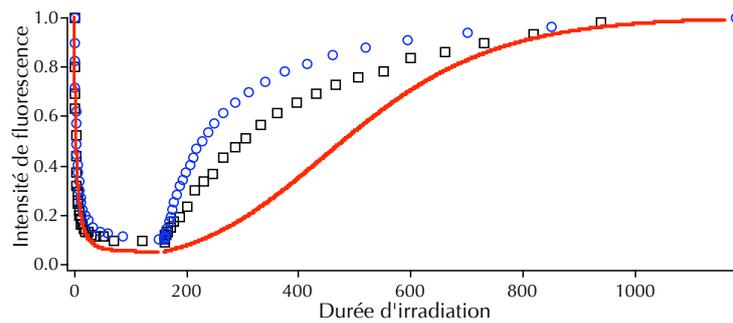


FIG. 8.16 – Évolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps d'irradiation (à 334 puis à 547 nm). — : évolution calculée, □ : film DA-1, ○ : film DA-2

La courbe théorique présentée figure 8.16 a été établie à partir de la concentration en Diary6 à chaque instant pendant l'irradiation, qui est déterminée à partir des rendements quantiques de conversion de la réaction photochrome mesurés en solution. À chaque instant l'efficacité de transfert est calculée avec la formule 8.10. Lors de l'irradiation à 334 nm, les valeurs expérimentales sont proches des valeurs calculées alors que lors de l'ouverture du cycle du Diary6, la fluorescence remonte plus vite que prévu. Cela peut traduire le fait qu'on commute plus de Diary6, peut être en observant la fluorescence.

Cette démarche permet aussi de calculer le nombre de fluorophores éteints par molécule de Diary6. Pour cela on suppose que la diminution de l'intensité de fluorescence est directement reliée au nombre de molécules éteintes. L'évolution de ce nombre est présentée figure 8.17.

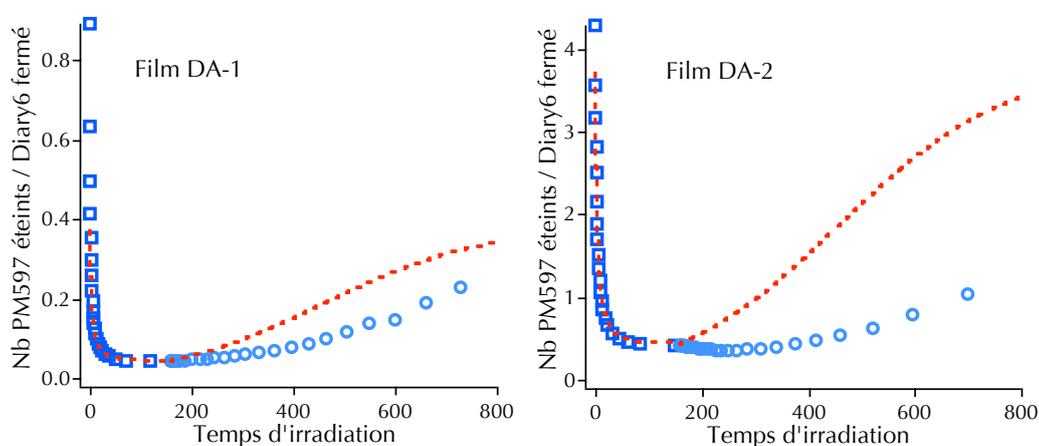


FIG. 8.17 – Évolution du nombre de PM597 éteints par molécule de Diary6 fermée, en fonction du temps d'irradiation en seconde. - - : valeur théorique, calculée avec le modèle de Förster, \square : irradiation à 334 nm, la quantité de quencheur dans le film augmente avec le temps, \circ : irradiation à 547 nm, le nombre de quencheur diminue.

Lors de la cyclisation, les points expérimentaux suivent la courbe théorique, par contre ce n'est pas le cas lors de l'ouverture du cycle. Cela est cohérent avec l'évolution de l'intensité de fluorescence. La figure 8.16 montre que, lorsqu'on irradie le film à 547 nm, la concentration de Diary6 sous forme fermée calculée est très probablement fautive. On fait donc une erreur sur le nombre de fluorophores éteints par photochrome. Le nombre de fluorophores éteints par Diary6 diminue quand le temps d'irradiation à 334 nm augmente, car cela correspond à une augmentation de la concentration de Diary6. Le nombre de fluorophores éteints par Diary6 est plus important pour le film DA-2 que pour le film DA-1, ce qui s'explique par le fait que ce film est plus concentré en fluorophore. Les mesures d'anisotropie stationnaire indiquent qu'une migration de l'énergie d'excitation au sein de la population de fluorophores est possible dans ce film, mais elle ne semble pas suffisante pour amplifier le quenching.

Enfin, plusieurs cycles d'irradiation à 334 puis 547 nm ont été appliqués sur le film DA-2. Les résultats sont présentés figure 8.18. Il est possible de commuter plusieurs fois le Diary6 sans perte significative de l'efficacité de quenching. De plus, la commutation est rapide, de 3 et 30s, ce qui permettrait une phase d'écriture courte dans un dispositif de stockage de l'information.

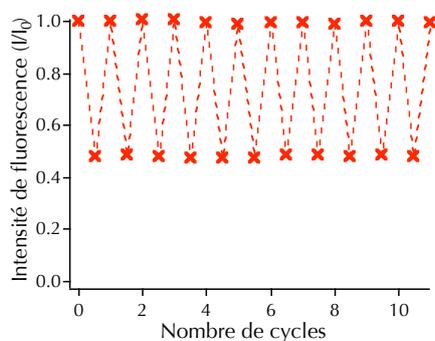


FIG. 8.18 – Évolution de l'intensité de fluorescence du film DA-2 en fonction du nombre de cycle d'irradiation : 3 secondes à 334 nm puis 30 secondes à 547 nm.

Ces premières expériences montrent qu'il est possible de moduler la fluorescence d'un film de PMMA contenant du PM597 et du Diary6 de manière réversible en changeant la forme du photochrome par irradiation. Cependant, il doit être possible d'améliorer le système en changeant son arrangement spatial. Ici, un nombre important de photochromes est nécessaire pour que tout point de l'espace soit statistiquement compris dans une zone où le quenching est efficace. Avec des nanoparticules, on peut rapprocher de manière mieux contrôlée le fluorophore et le quancheur. L'équipe de K. Nakatani travaille aussi sur des assemblées supramoléculaires réunissant le fluorophore et le photochrome.

8.4 Conclusion

Des films de PMMA fluorescents ont été préparés avec des Bodipy. L'étude de l'anisotropie de fluorescence permet de montrer qu'il y a une migration de l'énergie d'excitation dans ces films, quand la concentration le permet. Nous avons de plus montré que l'évolution de l'anisotropie avec la concentration correspond à un transfert d'énergie de type Förster. Par ailleurs, la fluorescence de ces films peut être modulée par un quancheur situé en surface ou incorporé dans la matrice.

Chapitre 9

Nanolatex

Les particules de polymère fluorescentes, dont le diamètre peut atteindre plusieurs microns, sont en général appelées *microsphères*. Pendant ma thèse, j'ai utilisé des particules de polystyrène de 15 nm de diamètre environ. Le terme *nanolatex* (NL) désigne une suspension colloïdale formée avec ces billes. Les NL ont été utilisés pour développer un senseur fluorescent d'ATP. Ce chapitre présente le projet, puis la synthèse et la caractérisation des NL fluorescents et enfin les résultats obtenus pour la détection d'ATP.

9.1 Introduction

9.1.1 Microsphères fluorescentes

Les microsphères fluorescentes sont des particules de polymère, du polystyrène dans la majorité des cas, de diamètre variant entre 20 nm et plusieurs microns dans lesquelles des fluorophores ont été incorporés [156]. Comme il existe un grand nombre de fluorophores pouvant être incorporés dans une matrice polymère, les longueurs d'onde de fluorescence de ces sphères couvrent tout le spectre, de l'ultra-violet à l'infra-rouge¹. Ces particules peuvent être fonctionnalisées en surface [157], par des espèces chargées (sulfate, ammonium, carboxylate) ce qui améliore leur stabilité colloïdale, par des groupements réactifs qui permettent de greffer une protéine ou une molécule pouvant reconnaître un analyte, par des espèces hydrophiles telles que des polyéthylènes glycol ou par des ligands (lipides, peptides, anticorps...).

Les applications de ces objets sont les suivantes [158] :

- Le marquage de cibles biologiques [159, 160]. Comme cela a été évoqué dans la première partie de ce manuscrit, les microsphères sont plus lumineuses que des fluorophores individuels, ce qui améliore la signalisation. Elles peuvent être greffées sur des brins d'ADN sonde

¹Pour les microsphères fluorescentes vendues par Molecular Probes et Bangs Laboratories, le maximum de fluorescence varie entre 415 et 755 nm

pour les tests d'hybridation ou servir à mettre en évidence des marqueurs cellulaires peu exprimés dans une cellule [161].

- Le traçage d'objets d'intérêt biologique ou environnemental. Les microsphères fluorescentes permettent de suivre la circulation sanguine, le transport dans les neurones ou encore les mécanismes de phagocytose [161].
- Le diagnostic médical et en particulier les tests immunologiques [162]. Les tests déjà existants peuvent être améliorés par l'utilisation de microsphères fluorescentes. Ces objets sont utilisés pour détecter de manière simultanée plusieurs informations, chacune étant signalée par une couleur différente [163].
- La calibration en microscopie confocale ou en cytométrie de flux [158]. Dans le premier cas, les billes servent à déterminer la résolution spatiale du microscope ou à régler l'alignement du dispositif. La cytométrie de flux permet d'étudier les propriétés individuelles de particules et de cellules dont la taille varie entre 0,5 et 40 μm . Celles-ci sont transportées dans un liquide et passent une à une devant une source lumineuse, en général un laser. La lumière diffusée ainsi que la fluorescence de marqueurs préalablement fixés sur la cellule sont récoltées et donnent des informations sur la taille, la structure ou la composition des cellules. Les microsphères fluorescentes sont utilisées pour la calibration des appareils mais aussi comme marqueurs fluorescents.
- Enfin, la fluorescence des microsphères peut être modulée en présence d'un analyte, ce qui permet de les utiliser comme nanocapteurs [4, 46].

Le fluorophore est incorporé dans la matrice polymère par gonflement de celle-ci avec un solvant organique qui s'évapore par la suite et laisse le colorant piégé dans la bille [158]. Il est alors protégé du milieu environnant, ce qui limite le quenching et le photoblanchiment. Cette technique permet aussi de laisser la surface de la bille disponible pour d'autres fonctionnalisations. La quantité de molécules introduites représente environ 1% de la masse de polymère. Au delà, les interactions intramoléculaires sont susceptibles de modifier la fluorescence émise [158]. Le fluorophore peut aussi être greffé à la surface de la bille, ce qui présente d'autres avantages ; il est attaché de manière covalente au latex, ce qui permet d'éviter les fuites de colorant en présence d'un solvant qui dilate le polymère, et il peut voir sa fluorescence modifiée par un facteur environnemental ou la présence d'un analyte.

Les Bodipy sont utilisés pour préparer ces particules fluorescentes, en particulier par Molecular Probes [161, 41]. La fluorescence de ces molécules dans des sphères de 40 nm a été comparée à celle en solution ; un déplacement des spectres de quelques nm vers le rouge est observé et le rendement quantique ne varie en général pas. La photodégradation est moins importante dans la matrice polymère que dans les solvants utilisés (méthanol ou éthanol) car la rigidité des molécules est plus importante dans la matrice polymère et elles sont moins exposées à l'oxygène. Les auteurs soulignent le fait que la constante de dégradation mesurée pour le colorant dans les microsphères dépend peu de leur environnement alors qu'elle dépend fortement du solvant pour une molécule

isolée. La spectroscopie montre qu'il n'y a pas de formation d'agrégats dans les sphères.

Molecular Probes a aussi incorporé jusqu'à 6 Bodipy différents dans une même bille. Ces objets sont commercialisés sous le nom de TransFluoSphere [164]. Ils sont conçus de manière à ce qu'il y ait un transfert d'énergie entre les fluorophores dans la matrice polymère ; l'émission de fluorescence est celle du fluorophore émettant à l'énergie la plus faible [44]. Comme ces sphères ont un déplacement de Stokes important, il est possible d'utiliser des longueurs d'onde d'excitation et de détection bien distinctes. Il existe cinq sortes de billes qui peuvent être excitées à la même longueur d'onde, ce qui permet de détecter autant de paramètres simultanément. Les propriétés spectroscopiques des billes T8869 ont été publiées [44]. Il s'agit de billes comportant 6 Bodipy différents, dans des proportions qui ont été ajustées empiriquement de manière à optimiser le transfert d'énergie. Ces billes absorbent de manière importante vers 500 nm et le maximum de fluorescence est situé à 720 nm. Le transfert de l'énergie d'excitation est efficace à 95% entre 450 et 740 nm. La distance donneur-accepteur varie entre 2,5 et 4,0 nm, ce qui est suffisamment faible pour que le transfert d'énergie ait lieu mais suffisamment grand pour qu'il n'y ait pas d'agrégats non fluorescents dans les microsphères.

9.1.2 Travaux antérieurs

L'équipe de Robert Pansu travaille avec des microsphères fluorescentes depuis une dizaine d'années. Au cours de sa thèse, Rachel Méallet-Renault a étudié la fluorescence des billes Orange de Molecular Probes [47]. Elle a testé l'effet de l'adsorption du bleu de méthylène sur des billes de 100 nm de diamètre. Elle a montré que seulement 45% des fluorophores pouvaient être quenchés.

Afin de mieux contrôler les propriétés des microsphères, et en particulier la nature et les propriétés du fluorophore utilisé pour les doper, une collaboration a été initiée avec le Pr. Chantal Larpent qui synthétise des nanolatex de 15 nm de diamètre [4, 48]. Un système permettant la détection d'ions cuivre II en milieu aqueux par spectroscopie d'absorption avait déjà été mis au point dans son équipe. L'incorporation de méstityl-bodipy (MB) dans ces nanolatex a permis d'abaisser la limite de détection à 1 nM. Le principe de ce capteur est résumé figure 9.1.

Des molécules de cyclame sont greffées sur les nanolatex et le MB est incorporé dans la matrice polymère. La forme libre du ligand est incolore mais le complexe Cyclame - Cu^{2+} est bleu et il y a un bon recouvrement entre le spectre d'absorption de ce complexe et le spectre de fluorescence du MB. Il y a donc un quenching de la fluorescence des nanolatex par transfert d'énergie en présence de Cu^{2+} . Il a été montré que l'homotransfert d'énergie amplifie le quenching et que un ion Cu^{2+} peut éteindre la fluorescence de 45 fluorophores.

Les NL peuvent donc être utilisés comme senseurs fluorescents et, comme la surface des billes peut être facilement fonctionnalisée, il est possible d'adapter le système à un grand nombre d'analytes. Pendant ma thèse, nous avons cherché à développer un capteur d'ATP.

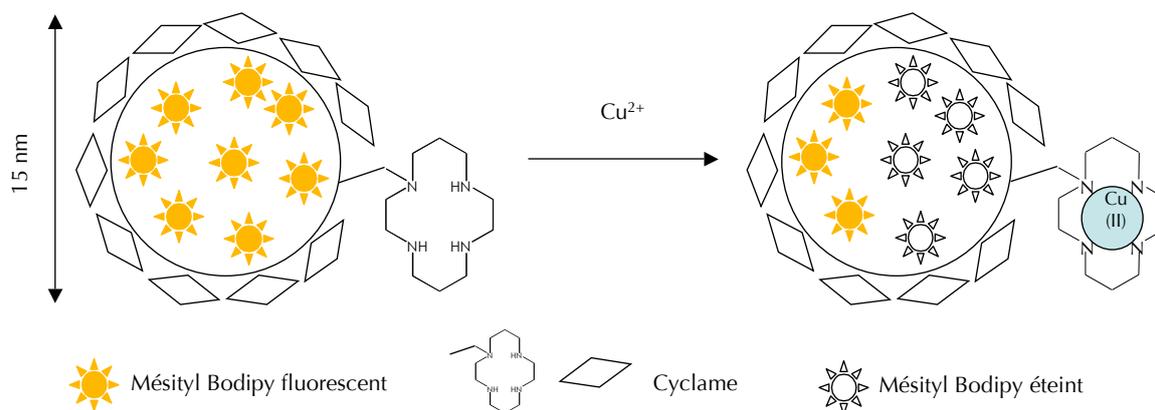


FIG. 9.1 – Principe de fonctionnement du capteur de Cu^{2+} développé au PPSM. (D'après [4])

9.1.3 Capteur d'ATP

9.1.3.1 L'Adénosine Tri Phosphate

L'ATP est une molécule formée avec de l'adénine, du ribose et trois groupements phosphate [165]. Sa structure est présentée figure 9.3. Cette molécule joue un rôle fondamental en biologie puisqu'elle permet de stocker l'énergie à court terme dans les cellules. L'hydrolyse de l'ATP produit une molécule d'adénosine diphosphate (ADP), un phosphate inorganique et de l'énergie. L'énergie libre de cette réaction est de l'ordre d'une dizaine de kcal / mol en milieu biologique. L'énergie libérée permet d'induire des réactions endoénergétiques dans la cellule. Par exemple, l'hydrolyse de l'ATP permet d'initier les mouvements de cils ou de flagelles, et est impliquée dans la contraction musculaire. L'ATP permet aussi le transport actif des cations, c'est à dire dans le sens inverse du gradient naturel de concentration, à travers une pompe transmembranaire. Par exemple, dans le cas de la pompe sodium - potassium dans les neurones, l'hydrolyse de l'ATP induit un changement de conformation de la pompe qui transporte alors le sodium vers l'extérieur de la cellule et le potassium vers l'intérieur. L'ATP est en permanence régénéré à partir de l'ADP ou de l'Adénosine monophosphate (AMP), grâce au métabolisme de la cellule. Il existe quatre types de métabolisme : la photosynthèse, la fermentation, la respiration cellulaire et la glycolyse. L'ATP est aussi impliqué dans la régulation de la transmission d'informations à l'extérieur des cellules, par exemple dans le système nerveux il participe à la communication entre les cellules non-neuronales et les neurones.

La méthode optique la plus courante pour étudier la concentration d'ATP dans une cellule utilise la bioluminescence générée par le complexe luciférine - luciférase en présence d'ATP [166, 167]. Ce phénomène est à l'origine de l'émission de lumière par le ver luisant.

Le bilan de la réaction est le suivant :



Le maximum de luminescence se situe à 560 nm. Molecular Probes, ainsi que d'autres compagnies de biotechnologies, commercialisent des kits de détection de l'ATP en solution utilisant cette méthode. L'intensité de luminescence émise est proportionnelle à la concentration d'ATP. La limite de détection annoncée est de 0,1 pM. Ce test est effectué sur l'ATP extrait des cellules et les applications citées sont, entre autres, le suivi de la production d'ATP au cours de réactions enzymatiques, la détection de contamination bactérienne dans le lait, le sang, les urines ou la terre. Cette méthode est très sensible et sélective, mais son utilisation *in-vivo* est délicate. Une équipe a cependant utilisé ce test pour suivre par imagerie la libération d'ATP dans des cellules nerveuses [168]. Leur article, publié en 2000, a été cité 76 fois mais un rapide survol des références semble montrer que leur technique n'a pas été beaucoup réutilisée. Pour faire un suivi cinétique de la concentration d'ATP dans les tissus vivants, en particulier en neurophysiologie, l'utilisation de techniques électrochimiques semble plus adaptée [169].

Des systèmes dans lesquels l'enzyme est immobilisée sur un support solide ont été développés [170, 171]. L'enjeu est de conserver l'activité de l'enzyme une fois qu'elle est liée à une matrice polymère ou sol-gel. La limite de détection de ces systèmes est de l'ordre de 1 pM, ce qui correspond à l'ATP contenu dans une vingtaine de cellules, pour le système développé par Cruz-Aguado et al. [171]. Les auteurs ont par ailleurs montré que ce système est réutilisable plusieurs fois sans perte d'activité de l'enzyme.

Parmi les équipes travaillant sur la détection optique de cations, certaines ont développé des senseurs d'ATP. L'interaction entre la molécule du senseur et l'ATP fait intervenir en général deux types d'interactions : une interaction électrostatique entre une partie cationique et les phosphates et une interaction avec le ribose ou l'adénine. En effet, il est nécessaire que le senseur soit sélectif vis à vis de l'ADP et de l'AMP, mais aussi vis à vis des autres nucléotides triphosphate.

Kejik et al. ont synthétisé une tétrabrucine - porphyrine qui interagit de manière sélective avec l'ATP [172]. L'adénosine de l'ATP interagit avec la porphyrine par recouvrement des orbitales π et les quatre charges positives permettent une interaction sélective avec le triphosphate. En présence d'ATP une diminution du maximum d'absorption ($\lambda \approx 410$ nm) de la porphyrine est observée. Elle est due à la formation d'un complexe de stoechiométrie 1 :1. Ce système n'est pas soluble dans l'eau mais les auteurs ont immobilisé de la trisbrucine - porphyrine sur une matrice de silice et ont utilisé celle-ci comme phase stationnaire en chromatographie en phase liquide. Dans ce cas aussi, l'affinité de la matrice pour l'ATP est plus importante que celle pour l'ADP ou l'AMP.

Des systèmes utilisant la fluorescence ont aussi été développés. Par exemple, Kanekiyo et al. ont utilisé un acide phényl-boronique fonctionnalisé par un pyrène qui s'agrège avec un polycation en présence d'ATP : l'acide boronique forme un complexe avec le ribose de l'ATP qui lui-même interagit avec le polycation [13]. Il y a alors une agrégation des pyrènes et la bande de fluorescence de l'excimère apparaît ($\lambda_{max} = 482$ nm). Le principe de ce capteur est décrit figure 9.2. La limite de détection est de $0.1 \mu\text{M}$. Ce système est sélectif par rapport à l'AMP et la sélectivité par rapport à l'ADP est améliorée en augmentant la force ionique de la solution.

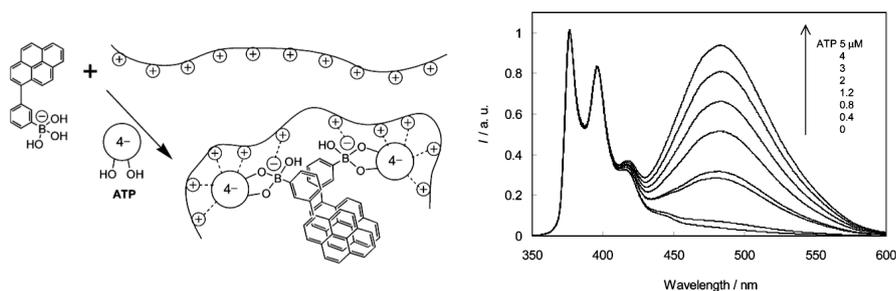


FIG. 9.2 – Principe de fonctionnement du capteur d'ATP développé par Kanekiyo et al., et évolution de la fluorescence en fonction de la concentration d'ATP. D'après [13].

L'agrégation d'un polycation induite par l'ATP a aussi été utilisée dans un capteur permettant une mise en évidence de la présence d'ATP en solution par un changement de couleur important [173]. Il s'agit d'un polythiophène qui est jaune dans l'eau ($\lambda_{abs} = 400$ nm) et qui devient rose en présence d'ATP ($\lambda_{abs} = 538$ nm). Un changement de couleur a aussi lieu en présence d'ADP, d'AMP et d'UTP mais il est moins prononcé. Dans l'eau, le polythiophène s'arrange en pelote statistique. En présence d'ATP, les interactions électrostatiques induisent une planarisation de la molécule et les interactions hydrophobes entre les adénines provoquent un empilement des molécules par interaction entre les orbitales π des thiophènes, qui est à l'origine du déplacement vers le rouge du spectre d'absorption. L'agrégation du polythiophène induit aussi un quenching de la fluorescence. Ce système a été testé dans un tampon biologique (HEPES) ; un déplacement vers le rouge du spectre d'absorption est aussi observé mais il n'est que de 64 nm au lieu de 138 nm, car les anions du tampon interagissent avec le polythiophène. Cependant la variation est suffisante pour pouvoir détecter l'ATP.

Enfin, certains groupes ont utilisé des biomolécules comme des aptamères pour la reconnaissance de l'ATP. Les aptamères sont des brins d'ADN, d'ARN ou des polypeptides de petite taille qui se lient à d'autres molécules d'intérêt biologique. L'équipe du Pr Anslyn a développé des systèmes où des tripeptides ayant une affinité sélective pour l'ATP sont greffés sur un support solide [174, 175]. La détection de l'interaction entre l'aptamère et l'ATP se fait par fluorescence.

9.1.3.2 Senseur d'ATP envisagé

Principe Le système développé au cours de cette thèse fait intervenir une enzyme ; l'Aspartate-TransCarbamylase (ATCase) qui assure la reconnaissance de l'ATP, car elle possède un site sur lequel cette molécule se fixe. La signalisation est assurée par la modulation de la fluorescence des nanolatex par un colorant ; le bleu de cibacron. Cette molécule absorbe la lumière entre 550 et 700 nm, c'est donc un bon candidat pour éteindre la fluorescence des Bodipy par transfert d'énergie. Par ailleurs, il peut se lier à l'ATCase sur le même site de fixation que l'ATP mais avec une moins bonne affinité. Le principe du capteur envisagé est donc le suivant (cf. figure 9.3) : l'enzyme, ou la sous-unité correspondant au site de fixation de l'ATP, est fixée aux billes de latex, par adsorption ou de manière covalente. Quand il n'y a pas d'ATP, le bleu de cibacron est lié à l'enzyme et la fluorescence des billes est éteinte. Si de l'ATP est présent dans le milieu, alors il va se fixer sur l'enzyme car son affinité pour celle-ci est plus élevée que celle du bleu de cibacron. Comme le bleu de cibacron sera éloigné de la surface des billes, leur fluorescence sera restaurée.

L'Aspartate-TransCarbamylase L'ATCase est un catalyseur de la synthèse du carbamyl aspartate à partir du L-aspartate et du carbamyl-phosphate. Il s'agit de la première étape de la synthèse des nucléotides pyrimidiques. Sa structure est schématisée figure 9.4. Cette enzyme est composée de 6 sous-unités catalytiques et de 6 sous-unités régulatrices. Elle existe sous deux formes, la forme R qui est active, et la forme T qui l'est moins. C'est une enzyme allostérique, c'est à dire qu'elle change de conformation après l'attachement d'un composé sur un site différent du site catalytique. L'ATP est un effecteur positif de cette enzyme, ce qui signifie que sa fixation sur un site de régulation augmente l'activité catalytique de l'ATCase. Il faut remarquer que l'interaction entre l'enzyme et l'ATP ne provoque pas l'hydrolyse de ce dernier.

Le Bleu de Cibacron Le bleu de cibacron (BC) est à l'origine un colorant textile, mais il est aussi beaucoup utilisé en chromatographie d'affinité. Historiquement, c'est le premier colorant interagissant avec des protéines qui a été identifié. Sa structure est présentée figure 9.3.

La chromatographie d'affinité est utilisée pour identifier, purifier ou séparer des macromolécules [176]. L'analyte est retenu dans la colonne grâce à des interactions spécifiques avec un ligand fixé sur le support solide. L'analyte est ensuite décroché de la colonne en changeant les conditions d'élution. Les ligands utilisés peuvent être des biomolécules, par exemple des anticorps, des oligonucléotides ou des enzymes, mais dans ce cas le dispositif présente plusieurs inconvénients : il est cher, la fixation sur la matrice peut modifier l'activité du ligand et le stockage nécessite quelques précautions. Au contraire, l'utilisation de colorant de synthèse est plus économique et leur immobilisation sur la colonne est simple. Ces molécules peuvent se fixer sur les sites actifs de certaines protéines mais aussi interagir de manière non spécifique avec celles-ci. Les colorants utilisés sont composés d'un chromophore, une anthraquinone dans le cas du bleu de cibacron, d'un groupe réactif, en général une mono ou une dichlorotriazine, et comportent plusieurs groupes

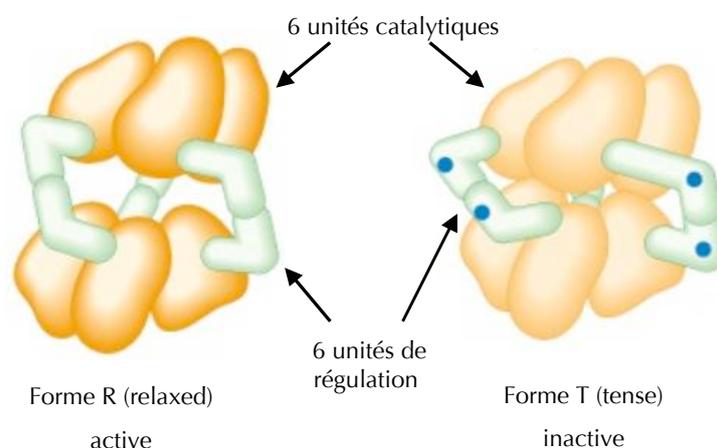


FIG. 9.4 – Schéma de la structure de l'ATCase. L'ATP et le bleu de cibacron se fixent sur les sites de régulation

acide sulfonique, ce qui améliore leur solubilité dans l'eau. Le bleu de cibacron est donc chargé négativement, et ce quelque soit le pH. Il a été montré que le bleu de cibacron interagit avec les protéines préférentiellement au niveau des sites de fixation des nucléotides.

Le bleu de cibacron absorbe la lumière entre 550 et 700 nm et n'est pas fluorescent. Le coefficient d'absorption molaire est de $5\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$ environ, entre 600 et 650 nm, où le spectre est maximal. La coloration de la molécule est due au groupe anthraquinone. Le rayon de Förster pour le transfert d'énergie entre la fluorescence du TMB et l'absorption du bleu de cibacron est de 8 nm si les moments de transition sont parallèles ($\kappa^2=1$) et de 7,1 nm si les molécules sont immobiles et orientées aléatoirement ($\kappa^2=0,476$) (cf chapitre 1). La formation de dimères provoque un déplacement vers le rouge du spectre d'absorption, mais il n'est pas possible de déterminer le spectre d'absorption du dimère seul [177]. En effet, la structure tridimensionnelle de la molécule, qui est présentée figure 9.5, empêche un rapprochement efficace des deux groupes anthraquinone et la modification du spectre d'absorption est faible, ce qui empêche de distinguer l'absorbance du dimère de celle du monomère.

Il a été montré que dans l'eau, il y a formation d'agrégats à partir de $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de colorant [179], la solubilité dans l'eau étant de 5 mg/mL, soit $5,9\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [180]. L'augmentation de la force ionique², par ajout de KCl, favorise l'agrégation du bleu de cibacron, car les forces électrostatiques répulsives sont écrantées. Au contraire, en présence de tensio-actif non-ioniques de type Lubrol ou Triton, la concentration à laquelle les dimères apparaissent est plus élevée [179], car les molécules de tensio-actif interagissent avec le BC et favorisent la solvatation. L'interaction du bleu de cibacron avec les protéines provoque une modification du spectre d'absorption [181, 182].

²La force ionique d'une solution est définie comme $I = 1/2 \sum_i C_i z_i^2$, avec C la concentration de l'ion i et z sa charge. Dans l'eau, la concentration des ions H^+ et OH^- est négligée.

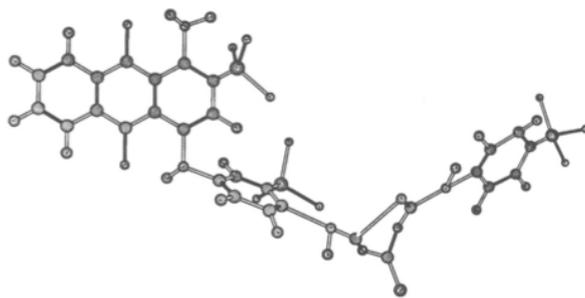


FIG. 9.5 – Structure tridimensionnelle du bleu de cibacron, d'après [178].

Ceci a été utilisé pour étudier la nature des interactions colorant-protéine. En particulier, le spectre de différence d'absorbance, i.e. la différence entre les spectres d'absorption du BC avec et sans protéine, toutes choses identiques par ailleurs, dépend de l'environnement du colorant. Cette technique permet aussi de déterminer les constantes d'association apparentes entre le colorant et la protéine.

Pour réaliser le capteur envisagé, il faut fabriquer les NL correspondants. Le TMB a été choisi pour le dopage des billes. La fluorescence de cette molécule dans les NL a été caractérisée puis l'extinction de cette fluorescence par le bleu de cibacron a été étudiée. L'enzyme peut facilement être greffée sur une bille de polystyrène, par exemple grâce à une liaison disulfure. Cependant, nous avons voulu dans un premier temps tester la possibilité de quencher la fluorescence des billes avec le bleu de cibacron, puis regarder l'évolution du système en présence d'enzyme, sans qu'elle soit liée de manière covalente aux billes.

9.2 Préparation

Trois étapes sont nécessaires pour obtenir des nanolatex fluorescents : la synthèse des sphères de polystyrène par polymérisation, la fonctionnalisation de la surface des sphères, et l'incorporation du fluorophore dans la matrice polymère. Cette section décrit ces trois étapes ainsi que les résultats obtenus pour les nanolatex qui ont été préparés au cours de cette thèse.

9.2.1 Synthèse

La synthèse des nanolatex a été réalisée dans l'équipe de Chantal Larpent à l'Université de Versailles Saint-Quentin. Il s'agit d'une co-polymérisation en microémulsion huile dans eau à partir d'un mélange styrène / divinylbenzène / chlorovinylbenzène.

9.2.1.1 Polymérisation en microémulsion

Les microémulsions sont formées à partir de deux liquides non miscibles et un surfactant ou un mélange de surfactants [183, 184]. Elles sont stables thermodynamiquement. Le milieu est isotrope avec une architecture bien définie, une surface spécifique importante et des distances caractéristiques de quelques nanomètres. La solution est transparente ou translucide. Depuis le début des années 1980, ces microémulsions sont utilisées pour la synthèse de latex. Cette procédure permet d'obtenir des objets plus petits qu'avec les synthèses en émulsion classiques, soit une gamme de taille de 10 à 50 nm au lieu de 50 à 500 nm. De nombreuses synthèses ont été réalisées à partir de systèmes huile dans eau, eau dans huile ou bicontinus. Il est possible d'obtenir des particules de formes diverses. Les latex obtenus sont d'autant plus petits que la concentration en tensioactif est élevée. Le fait que les microémulsions soient stables thermodynamiquement permet de bien contrôler la réaction et assure une bonne reproductibilité de la synthèse. Mais cette technique nécessite l'usage de grandes quantités de surfactant, au moins 10% du poids total de la solution, ce qui limite les possibilités de synthèse à grande échelle, bien que des recherches aient été menées pour diminuer les quantités nécessaires [185].

La polymérisation en microémulsion huile dans eau permet, comme pour une émulsion classique, d'obtenir des polymères de masse molaire élevée avec un rendement de polymérisation important, car les radicaux sont compartimentalisés dans les gouttelettes. En général, le nombre de chaînes par particule est inférieur à 3 et ces chaînes sont fortement compressées. Le mécanisme de polymérisation peut être décrit par le modèle de Candau-Leong-Fitch [186, 187]. Il a été développé pour le cas des émulsions eau dans huile, mais il est aussi accepté aujourd'hui pour les polymérisations en microémulsion huile dans eau. Ce mécanisme est décrit figure 9.6. Il y a deux étapes :

- Selon la nature de l'amorceur, la polymérisation est initiée par l'entrée des radicaux dans les microgouttelettes (figure 9.6, Ia) ou par génération des radicaux directement à l'intérieur de celles-ci (figure 9.6, Ib). Environ 1 micelle sur 1000 donne naissance à une particule.
- Ensuite, les particules croissent par diffusion des monomères depuis les micelles inactives à travers la phase continue (figure 9.6, IIa) ou par collision-coalescence de deux gouttelettes (figure 9.6, IIb).

Comme la concentration en tensioactif est élevée, il y a, dans le milieu réactionnel, tout au long de la polymérisation, des micelles contenant du monomère, ce qui fait que la nucléation des particules est continue et ne s'arrête que quand tout le monomère a été consommé. À la fin de la polymérisation, la suspension contient les particules entourées de surfactant et des micelles de tensioactif plus petites que les latex (figure 9.6, III).

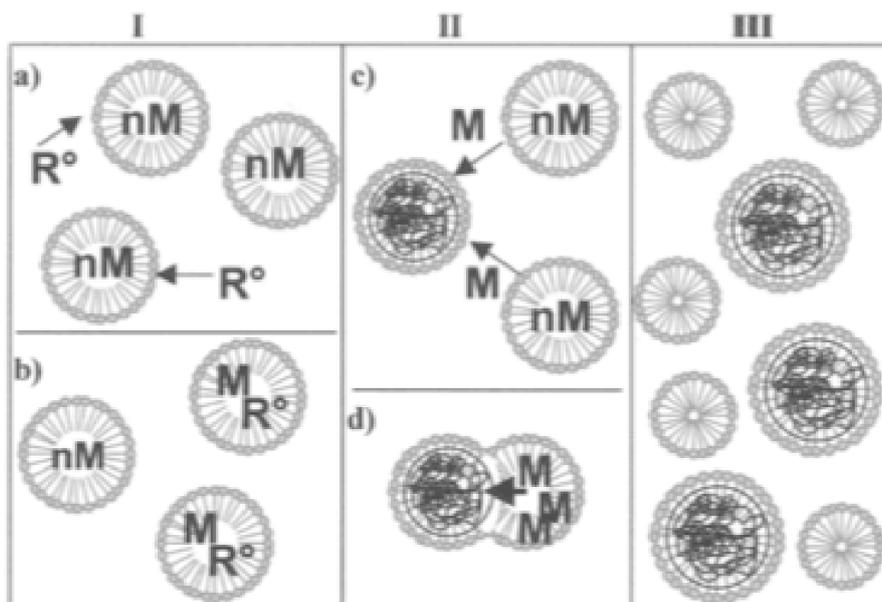


FIG. 9.6 – Mécanisme de la polymérisation en microémulsion [187]; I : Nucléation des particules ; II : Croissance des particules ; III : Suspension quand tout le monomère a été consommé. (M = Monomère, R^\bullet = Radicaux). Reproduction de [186].

Suivant l'application visée, les particules peuvent être fonctionnalisées. Trois voies sont utilisées [187] :

- La copolymérisation avec un monomère fonctionnalisé, pour laquelle la fonction est répartie de manière homogène dans le volume de la particule.
- La copolymérisation avec un monomère réactif, qui permet de fonctionnaliser le NL après la polymérisation. Les fonctions seront alors localisées à la surface de la particule. Cette option a été choisie pour fonctionnaliser les NL utilisés dans cette thèse.
- L'incorporation d'une molécule hydrophobe dans la matrice polymère en la faisant gonfler avec un solvant adéquat. C'est de cette manière que les latex sont rendus fluorescents.

La formation de nanolatex fonctionnalisés à base de polystyrène a été largement étudiée par Chantal Larpent [186, 188, 189, 190]. Plusieurs voies de synthèse en microémulsion huile dans eau ont été explorées, avec des surfactants ioniques (SDS, DTAB) ou non ioniques. Parmi ces systèmes, la copolymérisation du styrène avec un monomère réticulant en présence d'un surfactant cationique est intéressante. Antonietti *et al.* ont montré que dans ce cas la taille des particules dépend linéairement du rapport surfactant / monomère [191]. Il est possible de descendre jusqu'à des rayons de l'ordre de 10 nm, avec une dispersion en taille des billes faible. Selon le type de particule et la quantité de surfactant, la suspension obtenue peut être stable plusieurs mois.

9.2.1.2 Protocole expérimental

Les nanolatex utilisés dans cette thèse ont été synthétisés par une réaction radicalaire amorcée par la lumière en présence de 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophenone (DMPA). Le surfactant utilisé est le bromure de dodécyltriméthylammonium (DTAB). Trois monomères sont utilisés : le styrène, le divinylbenzène (DVB) qui est un agent réticulant et le chlorométhylstyrène qui permet une fonctionnalisation de la surface des billes après la polymérisation. Le schéma réactionnel est présenté figure 9.7. Le protocole expérimental est détaillé Annexe C.

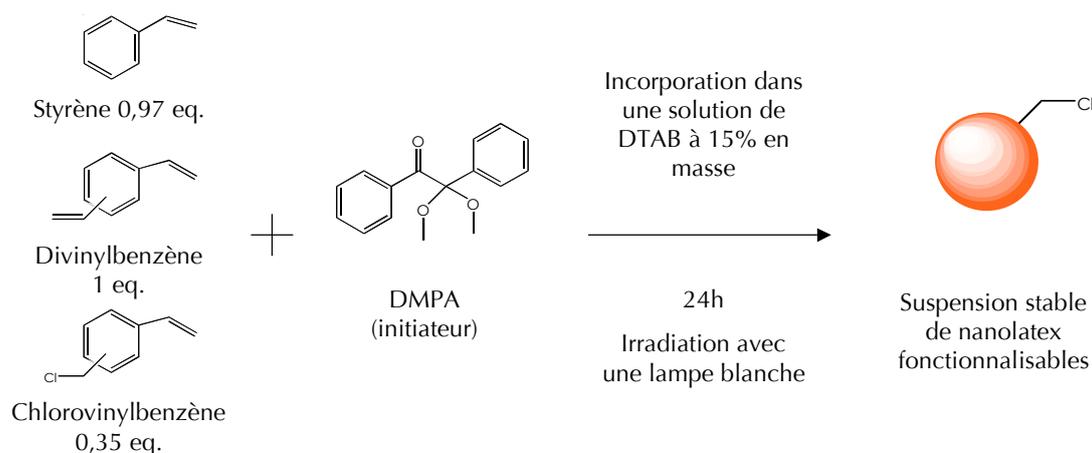


FIG. 9.7 – Principe de la synthèse des nanolatex

Deux réactions secondaires ont lieu [190] :

- Une substitution des atomes de chlore par des atomes de brome apportés par le surfactant. En effet, le brome est en large excès par rapport au chlore et il est localisé à la surface des micelles dans la paire d'ions Dodécyltriméthylammonium - Bromure. Cette substitution est plutôt bénéfique pour la post-fonctionnalisation puisque le bromure de méthyle est plus réactif que le chlorure de méthyle.
- Une hydrolyse de la fonction chlorure de méthyle du chlorovinylbenzène ou du polymère. Cette réaction diminue le nombre de fonctions réactives. Il faut donc réaliser la post-fonctionnalisation rapidement après la synthèse.

À l'issue de la synthèse, on obtient en général une suspension de nanoparticules de polystyrène à 4% en masse de polymère. La concentration de DTAB peut être diminuée par dialyse. Il est possible de descendre en dessous de la concentration micellaire critique du DTAB, qui est de 0,49 % en masse. Les suspensions sont caractérisées par plusieurs paramètres. Le pourcentage en masse de polymère est mesuré. Une analyse élémentaire permet de déterminer la composition chimique du polymère, en particulier la quantité d'halogènes. La composition du polymère peut aussi être

caractérisée par spectroscopie infra-rouge. La taille des particules est évaluée par diffusion quasi-élastique de la lumière ou par AFM après dépôt sur une lame de mica. Au cours de sa thèse, Caroline Cannizzo a reproduit une dizaine de fois la synthèse décrite ci-dessus [187]. Le pourcentage en masse de polymère est de $4,11 \pm 0,36\%$, le diamètre des nanolatex est de $15,5 \pm 1,1$ nm avec une polydispersité de $0,12 \pm 0,08$. Enfin la quantité d'halogènes, Cl et Br, déterminée par analyse élémentaire est de $0,87 \pm 0,09$ mmol / g de polymère, alors que la quantité introduite est de 1,35 mmol / g de monomère. La différence est due à l'hydrolyse des halogènes pendant la synthèse.

9.2.2 Fonctionnalisation en surface

9.2.2.1 Principe et échantillons préparés

La réactivité des halogènes situés à la surface des billes permet de préparer des NL fonctionnalisés en surface par substitution avec un nucléophile. Dans l'équipe de Chantal Larpent, des entités complexantes telles que l'acide phénylboronique qui réagit avec les catéchols [192] ont été greffées. Des nanoparticules hybrides organiques / inorganiques ont été préparées par ajout de polyoxométhalates sur les latex [193]. Des molécules de taille importante comme des dendrimères peuvent aussi être greffées sur ces nanolatex [194]. Enfin il est possible de préparer des particules photomobiles par fonctionnalisation avec un photochrome, le DR1 [187].

Trois types de fonctionnalisations ont été réalisées :

- Une fonctionnalisation par une amine ternaire, qui permet d'ajouter des charges positives à la surface des nanoparticules. Ceci améliore l'interaction avec le bleu de cibacron qui est chargé négativement (cf. figure 9.3). Les NL obtenus après une substitution nucléophile des halogènes par l'azote des amines, ont des ammoniums quaternaires en surface, ils sont donc intrinsèquement chargés positivement. Dans un premier temps la pyridine (pyr) a été utilisée (cf figure 9.8), mais les premiers tests de quenching ont montré que les NL-pyr sont déstabilisés en présence de BC, car les charges de surfaces sont neutralisées.
- Une fonctionnalisation par des amines comportant des chaînes hydrophiles a ensuite été réalisée de manière à stabiliser les billes lorsqu'elles sont neutres. Deux molécules ont été choisies, la triéthanolamine (tea) et la triéthanolamineéthoxylate (teaeo) (cf figure 9.8).
- Enfin des billes fonctionnalisées avec de l'acide 3-aminophénylboronique ont été préparées. Comme précédemment, l'amine permet de greffer la molécule sur le NL et la fonction acide boronique peut former un complexe avec un catéchol.

Les caractéristiques des nanolatex préparés sont rassemblées table 9.1. La composition chimique du polymère, déterminée par analyse élémentaire est donnée annexe C. Ces analyses montrent que les amines ont bien été greffées sur les nanolatex. L'efficacité de la réaction de greffage peut être évaluée en comparant trois paramètres; la quantité d'ammonium greffée, qui est égale à la quantité d'azote obtenue par analyse élémentaire, la quantité d'amine introduite et le maximum théorique de fonctions qui peuvent être greffées sur le NL. Ce dernier à été choisi égal

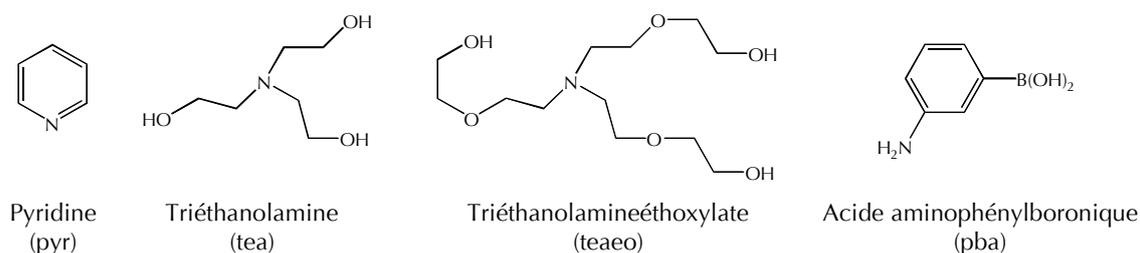


FIG. 9.8 – Amines utilisées pour la fonctionnalisation des nanolatex.

à la quantité d'halogènes donnée par l'analyse élémentaire, car pour un ammonium greffé, i.e. une charge positive, un contre ion précipite, ici un ion Br^- . La quantité totale d'halogènes est donc la somme du nombre d'halogènes encore présents sur les nanolatex et du nombre d'ammonium greffés. La quantité d'amine introduite est de 3,0 à 8,9 fois plus importante que le maximum théorique de fonctions sur le NL. Le rendement de la réaction, défini comme le rapport entre le nombre d'ammonium greffés et le maximum théorique de fonctions, est toujours inférieur à 1. Il faut donc introduire un large excès de réactif pour obtenir un greffage qui n'est pas total. Plusieurs facteurs influencent l'efficacité de la fonctionnalisation ; d'une part, la substitution nucléophile est optimale à pH basique, où les molécules ne sont pas protonées, alors qu'ici la réaction a été effectuée à pH inférieur à 6, sauf pour les NL-pba, d'autre part, il faut tenir compte de l'encombrement des molécules, qui peut gêner l'approche vers la surface. Ici, il est possible de greffer plus de pyridine par NL que de tea, de teao ou de pba, ce qui vient du fait que le pK_a de la pyridine est de 5,29 alors que celui des autres molécules est plus élevé. Enfin, certains halogènes sont au coeur des particules, puisqu'ils sont introduits au moment de la polymérisation, et leur substitution est très difficile car l'amine doit diffuser dans le NL pour pouvoir réagir avec l'halogène. Le maximum réel de fonctions greffables est donc inférieur au nombre calculé. Cependant, la quantité de fonctions accessibles est suffisamment importante pour que le nombre de fonctions greffées soit satisfaisant.

Si on assimile un pyridinium à un hexagone régulier de côté 1,35 Å, cette molécule occupe une surface d'environ 5 Å². Les amines éthoxylates peuvent être vues comme des triangles ayant pour sommet les oxygènes de la fonction alcool terminale. Le logiciel Chem3D permet de calculer les distances entre ces atomes. La surface occupée par ces molécules est, à partir de ces valeurs, de 17 Å² pour la tea et de 57 Å² pour la teao. Ces valeurs correspondent au cas où les groupes éthoxylates sont adsorbés sur la surface. Dans le cas contraire, la surface occupée par la molécule est plus petite. Toujours à partir de Chem3D, l'acide phénylboronique occupe au maximum un rectangle de côtés 4,2 × 7,5 Å, soit 32 Å². D'après les valeurs du tableau 9.1, la surface réelle occupée par un ammonium est donc inférieure à la surface disponible calculée à partir du nombre de molécules sur la surface (100 à 270 Å²). La surface des nanolatex peut donc être assimilée à une surface de polymère sur laquelle sont greffés de manière ponctuelle des ammoniums. En

Nom	Fonction	% masse initial ¹	% masse final ²	Quantité introduite (mmol/g)	Quantité greffée (mmol/g)	Nombre de fonctions par bille	Quantité Br + Cl (mmol/g)	Quantité introduite / quantité Br + Cl	Nombre de fonctions/ nombre Br + Cl	Surface totale / nombre de molécules	Surface d'une molécule
NL-pyr-0,1	PYR	4,07	4,75	0,14							
NL-pyr-0,5	PYR	4,07	4,80	0,71							
NL-pyr-1	PYR	4,07	4,96	1,43							
NL-pyr-2	PYR	4,07	4,75	2,86	0,46	630	0,94	3,0	0,49	128 Å ²	5 Å ²
NL-pyr	PYR	3,9	4,8	3,14	0,58	790	0,85	3,7	0,68	102 Å ²	5 Å ²
NL-tea	TEA	3,9	4,3	6,87	0,28	400	0,77	8,9	0,36	201 Å ²	17 Å ²
			2,4 ³								
NL-teaao	TEAEO	3,9	3,6	5,02	0,29	390	0,83	6,0	0,35	206 Å ²	57 Å ²
			ε ³								
NL-pba ⁴	PBA	4,0		2,69	0,22 ⁵	300	0,74	3,6	0,30	268 Å ²	32 Å ²

^aMesuré en dialysant la suspension de nanolatex non fonctionnalisés contre de l'eau.

^bCalculé à partir de la variation de volume lors de la dialyse qui est effectuée pour éliminer les amines (ou l'acide aminophénylboronique) qui n'ont pas réagit.

^cMesuré en dialysant la suspension de nanolatex fonctionnalisés contre de l'eau.

^dLes résultats obtenus sont similaires à ceux de la synthèse réalisée par Caroline Cannizzo pendant sa thèse [187, 192].

^eCalculé à partir de la quantité de Bore. La quantité d'azote donne 0,31 mmol / g, la différence peut être due à la précipitation du DTAB, qui n'a pas été totalement éliminé par les lavages, ou à l'imprécision de la mesure de la quantité d'azote par analyse élémentaire.

TAB. 9.1 – Fonctionnalisation des nanolatex

particulier, il reste de la place pour adsorber d'autres molécules.

La fonctionnalisation a permis de préparer des nanolatex chargés, avec un taux de charges positives par NL compris entre 400 et 800, selon le type de particule. Comme la stabilité colloïdale des suspensions de NL s'est avérée être un paramètre important lors des tests de quenching, des expériences ont été réalisées pour caractériser celle des différents types de NL.

9.2.2.2 Amélioration de la stabilité colloïdale

Les premières billes pyridinium synthétisées (NL-pyr0,1 ; 0,5 ; 1 et 2) se sont avérées peu stables dans le temps par rapport aux billes habituellement synthétisées dans l'équipe de Chantal Larpent. En effet, après 3 mois environ, un dépôt est apparu au fond du récipient contenant la suspension, alors que les nanolatex sont en général stables pendant au moins un an. De plus, lors des premiers essais de quenching de la fluorescence des billes NL-Pyr, une floculation des billes, caractérisée par une augmentation de l'absorbance à 800 nm de la solution a été observée.

La stabilité colloïdale d'une suspension de particules chargées est décrite par la théorie DLVO³ [195]. Deux types de forces interviennent : les forces de VanDerWalls, qui sont attractives et les forces de répulsion électrostatique entre les doubles couches électriques qui se forment à la surface des sphères. Le potentiel résultant de la combinaison de ces deux forces présente un minimum au contact, puis il augmente avec la distance et passe par un maximum avant de diminuer. Un minimum secondaire peut apparaître à plus grande distance dans certains cas. Si la barrière d'énergie est suffisamment importante, les particules ne peuvent pas atteindre l'état thermodynamiquement le plus stable, i.e. celui où elles sont en contact. La suspension colloïdale est alors stable cinétiquement. Si le système atteint le second minimum, une coagulation lente est observée. Si la charge de surface diminue ou si la force ionique augmente, la répulsion électrostatique sera moins importante et la barrière de potentiel va diminuer, jusqu'à ce que les particules floculent. Quand du BC est ajouté aux NL étudiés, il s'adsorbe à la surface des billes. Comme cette molécule est chargée négativement, une partie des charges de surface de la bille va être neutralisée, et la stabilité colloïdale de la suspension sera moins bonne.

Pour pallier à ce problème il fallait donc trouver un autre moyen de stabiliser les nanoparticules, tout en conservant des charges de surface positives, puisqu'elles permettent d'améliorer l'interaction avec le BC. L'ajout d'une couche hydrophile permet de stabiliser les billes par encombrement stérique [157]. On parle alors de particules chevelues. En effet, lorsque deux billes sont proches l'une de l'autre, elles peuvent s'agréger par interactions hydrophobes. Si la surface est hydrophile, l'interaction bille / solvant sera prépondérante par rapport à l'interaction bille / bille et la stabilité de la suspension sera meilleure. En particulier, la fonctionnalisation par des polyéthylènes glycol a été beaucoup étudiée car elle présente de nombreux avantages pour des applications en biologie : les microsphères obtenues sont non toxiques et furtives [157]. Il a donc été choisi d'utiliser des

³Pour Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek.

amines portant des groupes éthoxylates. Deux molécules commerciales, la triéthanolamine et la triéthanolamineéthoxylate, ont été utilisées afin de valider la stratégie adoptée.

Pour les échantillons NL-pyr et NL-tea, préparés en février 2006, un dépôt au fond du récipient a aussi été observé après quelques mois. Après dialyse des NL-tea contre de l'eau, jusqu'à élimination complète du tensio-actif, la masse de polymère récupérée correspond à seulement 2,4% de la masse initiale, au lieu des 4,3% attendus (cf. table 9.1). Une partie des nanolatex est donc restée en suspension même en l'absence de tensio-actif. La stabilité colloïdale des billes NL-teaeo s'est avérée bien meilleure. En effet, la suspension est toujours stable plus d'un an après sa synthèse, alors que la concentration de DTAB n'est que de 0,5% en masse. Il a été très difficile de faire précipiter le polymère avec du méthanol et la dialyse de la suspension contre de l'eau millipore jusqu'à élimination du DTAB n'a conduit qu'à une légère floculation des billes.

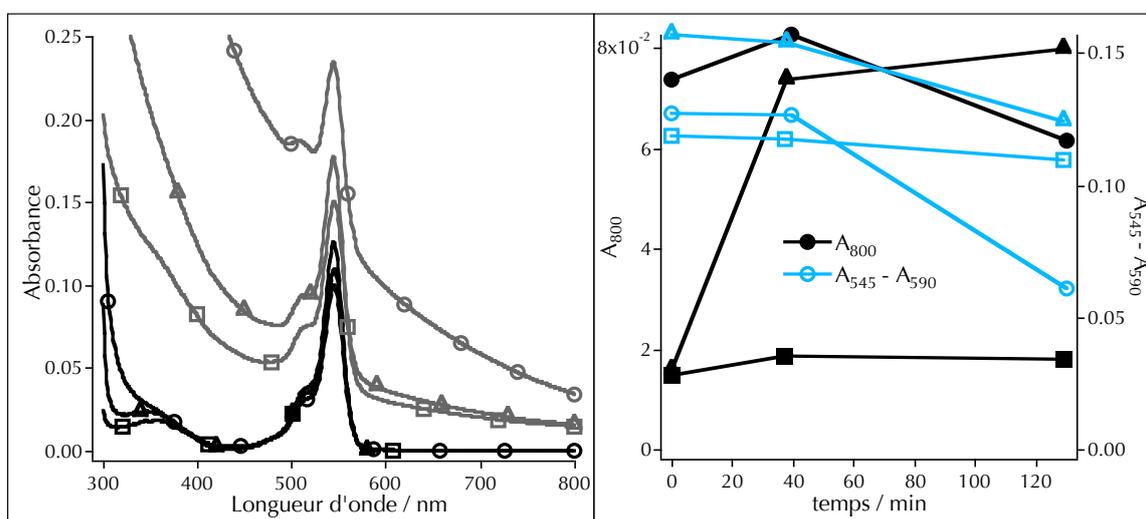


FIG. 9.9 – À gauche : spectre d'absorption des suspensions de latex, dopées par du TMB, diluées dans l'eau (noir) et dans une solution de KCl à 10^{-1} mol.L⁻¹ (gris); ○ : NL-pyr; △ : NL-tea; □ : NL-teaeo; La concentration de DTAB est comprise entre 0,15 et 0,025 % en masse selon la suspension. À droite : Évolution temporelle de l'absorbance à 800 nm, qui est d'autant plus élevée que les agrégats de NL sont gros, et de la différence d'absorbance entre 543 nm (maximum d'absorption du TMB) et 590 nm (pied de la bande), qui correspond à la quantité de matière en suspension, pour les NL dans la solution de KCl à 10^{-1} mol.L⁻¹.

Pour caractériser de manière plus précise la stabilité colloïdale des billes, des études spectroscopiques ont été réalisées dans des solutions de KCl, ce qui permet de faire varier la force ionique. Quand celle-ci augmente, la barrière de potentiel diminue et les NL peuvent être déstabilisés.

L'absorbance des suspensions de nanolatex, dopées avec du TMB, diluées dans l'eau (au moins par 100) et dans des solutions de KCl a été mesurée. La concentration de DTAB initiale est de

15 % en masse. Dans les solutions utilisées pour mesurer les spectres, cette concentration est comprise entre 0,150 % (NL-pyr) et 0,025 % en masse (NL-teaeo), ce qui est inférieur à la cmc. Les spectres dans l'eau et dans le KCl à 10^{-1} mol.L⁻¹ sont présentés figure 9.9, à gauche. La description détaillée de ces spectres sera faite dans la section suivante (9.2.3.2). Dans l'eau, il y a une bande centrée à 543 nm, qui correspond à l'absorption du TMB, et entre 700 et 800 nm, l'absorbance est constante et proche de zéro ; cela signifie que les nanolatex ne forment pas de gros agrégats. Tant que la concentration de KCl est inférieure à 10^{-2} mol.L⁻¹, soit $I = 10^{-2}$ mol.L⁻¹, le spectre d'absorption des suspensions est comparable à celui mesuré dans l'eau quand la concentration de DTAB est inférieure à la cmc.

Au delà de $I = 10^{-1}$ mol.L⁻¹, l'absorbance à 800 nm augmente et un fond de diffusion apparaît sur les spectres d'absorption des billes (cf. figure 9.9, à gauche). Cela est dû à la formation d'agrégats suffisamment gros pour diffuser la lumière. La déstabilisation des NL-pyr est plus importante que celle des NL-tea, et celle des NL-tea plus importante que celle des NL-teaeo. Si on regarde l'évolution des spectres d'absorption avec le temps (figure 9.9, à droite), le fond de diffusion des NL-pyr diminue mais cela s'accompagne d'une diminution de la différence d'absorbance entre 545 et 590 nm, ce qui correspond à l'amplitude de la bande d'absorption du TMB. Il y a donc une diminution de la quantité de TMB, c'est à dire du nombre de NL en suspension dans la cuve. Cette évolution est visible à l'oeil : des agrégats rosâtres sédimentent au fond la cuve en quelques heures. L'évolution des NL-tea est similaire mais plus lente. Par contre, le spectre des NL-teaeo évolue très peu dans le temps et l'amplitude de la bande d'absorption du TMB ne diminue que très légèrement. Les spectres mesurés dans le KCl à 0,2 mol.L⁻¹ et 1 mol.L⁻¹, sont similaires et n'évoluent quasiment pas dans le temps, (i.e. en 2 heures à $2 \cdot 10^{-1}$ mol.L⁻¹ et 45 min à 1 mol.L⁻¹). Ces expériences montrent que les NL-teaeo ont une meilleure stabilité colloïdale que les autres nanolatex.

L'ajout de fonctions éthoxylate à la surface des billes a donc permis d'améliorer leur stabilité colloïdale. Cependant, le système n'est pas suffisamment robuste à force ionique élevée ou après élimination du surfactant. La stabilisation peut encore être améliorée, par exemple en allongeant la longueur des chaînes éthoxylate.

9.2.3 Dopage par un fluorophore

Les NL sont rendus fluorescents par incorporation d'un fluorophore dans la matrice polymère [158, 48]. Le principe de ce dopage est présenté figure 9.10. Un petit volume d'une solution de fluorophore dans le dichlorométhane est introduit dans la suspension de latex. Pour les dopages présentés ici, 12 μ L de solution de colorant dans le dichlorométhane ont été introduits pour 300 μ L de suspension de latex. Le dichlorométhane va pénétrer dans la matrice et la gonfler, ce qui permet d'y incorporer le colorant. Après 48 h d'agitation, le dichlorométhane s'est évaporé alors que les molécules fluorescentes sont restées piégées dans la matrice polymère. Les billes ont

retrouvé leur forme initiale grâce à leur fort taux de réticulation. Le TMB a été incorporé dans les NL-ammonium, et le TMB, l'IP-BDY, le PM567 et le PM-597 dans les NL-pba.

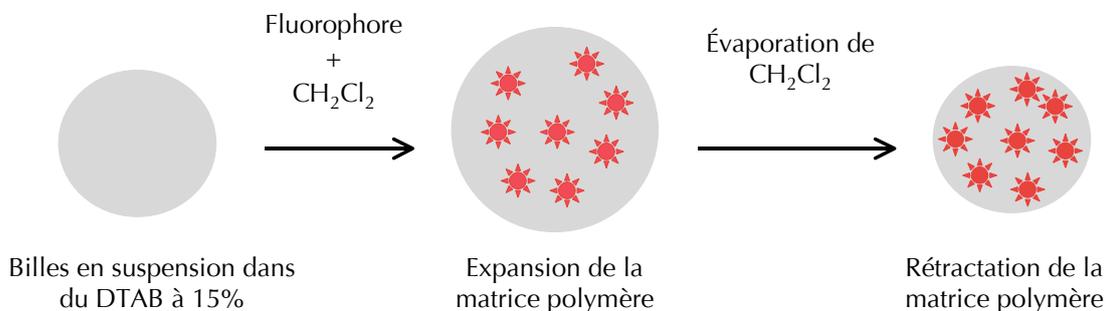


FIG. 9.10 – Principe du dopage des nanolatex par un fluorophore

L'efficacité du dopage est ensuite évaluée en mesurant le spectre d'absorption de la suspension diluée dans l'eau. En considérant que le coefficient d'absorption molaire du colorant dans la matrice polymère est similaire à celui mesuré dans le dichlorométhane⁴, la quantité de Bodipy dans les billes est déduite de l'absorbance grâce à la loi de Beer-Lambert. Le taux de dopage est calculé en divisant cette valeur par la quantité de Bodipy introduite dans la suspension. Après l'incorporation, il faut vérifier que le colorant a bien été introduit dans la matrice polymère, et ce de manière stable. La fluorescence des Bodipy dans la matrice polymère a aussi été caractérisée et, en particulier, l'anisotropie de fluorescence a permis d'évaluer le transfert d'énergie entre les fluorophores.

9.2.3.1 Incorporation dans la matrice polymère

Afin de vérifier que le colorant est bien introduit dans les billes, un blanc a été réalisé. Le même volume de la solution de TMB dans le dichlorométhane a été ajouté à une solution de DTAB à 15% en masse, ne contenant pas de particules. La solution obtenue est colorée, translucide et il n'y a pas d'agrégats de TMB apparents. Les spectres d'absorption et de fluorescence de cette solution diluée dans du DTAB à 15% en masse et dans de l'eau millipore ont été comparés à ceux des nanolatex correspondant. Dans le DTAB les spectres présentent les mêmes maxima et les intensités sont similaires. Par contre si le blanc est dilué dans l'eau, de manière à ce que la concentration de DTAB soit inférieure à la cmc, il y a un déplacement vers le rouge des maxima d'absorption et de fluorescence, un élargissement du spectre d'absorption et l'intensité de fluorescence est dix fois plus faible par rapport aux spectres des latex dopés correspondants. Les spectres bruts et normalisés sont présentés figure 9.11. Le suivi de l'évolution des spectres d'absorption et de fluorescence pendant 24h montre que le spectre d'absorption s'élargit encore et que l'intensité de fluorescence continue à diminuer. L'élargissement du spectre d'absorption et la diminution de l'intensité de

⁴Comme cela a été évoqué dans le chapitre 3, le solvatochromisme des Bodipy est faible.

fluorescence sont caractéristiques de la formation d'agrégats non fluorescents de TMB. Quand on dilue le blanc dans le DTAB à 15% en masse, les molécules de TMB sont dans les micelles, ce qui constitue un environnement hydrophobe dans lequel elles sont solubles. Par contre, lorsque l'échantillon est dilué dans l'eau, la concentration de DTAB est inférieure à la cmc et le TMB forme des agrégats car il n'est pas soluble dans l'eau. Quand la suspension de latex fluorescents est diluée dans l'eau et que la concentration de DTAB devient inférieure à la cmc, la spectroscopie du TMB n'est pas celle d'un agrégat, ce qui montre que le TMB reste sous forme de monomère dans la solution, et que le fluorophore est bien lié au NL.

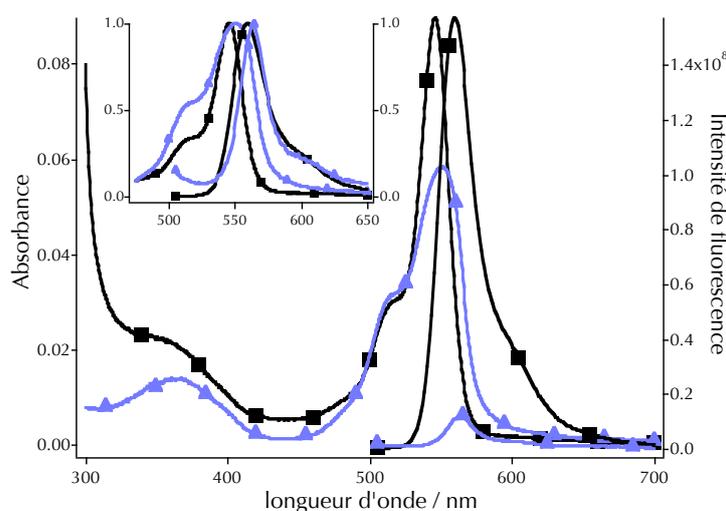


FIG. 9.11 – Spectres d'absorption et de fluorescence des NL-pyr-1 dopés avec du TMB (■) et du blanc correspondant (▲), dilué dans l'eau ($[DTAB] = 0,025\%$ en masse \ll cmc). Encart : spectres normalisés.

Le tableau 9.2 présente les taux de dopage des NL par du TMB en fonction de la concentration en DTAB de la suspension initiale. Ce taux est dans la majorité des cas inférieur à 100%. Il reste donc des molécules de TMB dans les micelles de la suspension concentrée. Lorsque les NL sont dilués dans l'eau ces molécules peuvent, soit venir s'adsorber à la surface des NL, soit former des agrégats, qui ne seront pas visibles en fluorescence. La concentration en DTAB d'une suspension de NL-tea, dopés par du TMB, a été amenée à 0,5 % en masse par dialyse. Ceci permet d'éliminer de la suspension les TMB qui n'étaient pas incorporés dans les NL car ils sont suffisamment petits pour passer à travers les pores de la membrane de dialyse⁵. Le nombre de TMB par bille mesuré est de $8,3 \pm 0,5$ pour la suspension à 15% en masse de DTAB et de $7,5 \pm 0,5$ pour la suspension à 0,5% en masse. En tenant compte de l'erreur sur la mesure, la dialyse ne modifie pas de manière significative le nombre de TMB par bille. Les spectres d'absorption, et de fluorescence, sont donc a priori représentatifs des TMB liés aux particules et les molécules présentes dans les micelles de

⁵Le seuil de coupure de la membrane est de 12 000 à 14 000 Da.

la suspension non diluée ne sont pas visibles en spectroscopie. Cette expérience montre aussi que les fluorophores sont bien incorporés dans la matrice puisque la diminution de la concentration de TMB libre n'entraîne pas de détachement du colorant.

Les NL fluorescents ont été conservés dans une solution à 15% en masse de DTAB et dilués au moment de faire les études spectroscopiques. Ces études ont été principalement réalisées sur une suspension de NL-teaeo dopée avec du TMB. La valeur moyenne du nombre de TMB par bille, pour cette suspension, a été calculée à partir de 14 spectres d'absorption mesurés sur une période de 3 mois. Cette moyenne est de $28,7 \pm 0,9$ TMB par bille. Il n'y a pas d'évolution évidente de ce nombre dans le temps. Si on compare le nombre de TMB par bille mesuré juste après le dopage et plusieurs mois après, 4 mois pour les NL-teaeo, 8 mois pour les NL-pyr et les NL-tea, il passe de 8 à 11 pour les NL-pyr, de 13 à 15 pour les NL-tea et de 28 à 31 pour les NL-teaeo. Il n'y a pas de diminution de la quantité de TMB par bille dans le temps, ce qui signifie qu'il n'y a pas de relargage du colorant. La quantité de TMB incorporée semble augmenter, peut-être à cause d'une concentration progressive de la suspension due à l'évaporation de l'eau.

Échantillon	[DTAB] % masse	Concentration théorique (mM)	Taux de dopage (%)	Nombre de TMB par bille	ϕ_F relatif	Nombre de N ⁺ par bille
NP-pyr	0,5	0,49	24	4	0,56	790
NP-pyr	15	0,49	60	8	1,06	
NP-tea	0,5	0,49	26	6	0,64	400
NP-tea	15	0,49	89	14	1,08	
NP-teaeo	0,5	0,49	36	7	0,70	390
NP-teaeo	15	0,49	73	13	1	
NP-teaeo	0,5	0,2	31	2	0,77	390
NP-teaeo	4	0,2	41	3	0,80	
NP-teaeo	15	0,2	100	8	1	

TAB. 9.2 – Efficacité du dopage des nanolatex en fonction de la concentration en DTAB de la suspension. Le dopage est effectué en introduisant 12 μL de colorant dans le CH_2Cl_2 dans 300 μL de NL. La concentration théorique est exprimée en mol par litre de suspension. Le taux de dopage est évalué en divisant la quantité de TMB incorporé, évaluée à partir du spectre d'absorption, par cette concentration théorique. ϕ_F , rendement quantique de fluorescence (cf. paragraphe 9.2.3.2).

L'influence de la concentration en surfactant lors du dopage des NL-amines dopées avec du TMB a été testée. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 9.2. À 15% en masse de DTAB, les suspensions obtenues sont homogènes et translucides. Par contre, pour des concentrations plus faibles en DTAB, lors de l'introduction de la solution de dichlorométhane, l'homogénéisation de la solution n'a pas été immédiate et des agrégats de TMB ont été observés dans le tube. Par ailleurs le tableau 9.2 montre que le taux de dopage augmente avec la concentration

en DTAB. Ceci peut s'expliquer par le fait que, plus il y a de surfactant plus la solubilisation du dichlorométhane dans les micelles est importante, ce qui favorise l'incorporation du colorant.

La nature du fluorophore a aussi une influence sur l'efficacité du dopage. Lors de la préparation des NL-pba fluorescents, la concentration en Bodipy des solutions de dichlorométhane était similaire pour les quatre fluorophores utilisés : le TMB, l'IP-BDY, le PM567 et le PM-597. Pour l'IP-BDY, le taux de dopage n'est que de 26 % alors qu'il est en général supérieur à 50 % pour les autres colorants. En fait, cette molécule est moins soluble que les autres dans le dichlorométhane et, lorsque le colorant a été introduit dans la suspension, celle-ci est devenue trouble. Des agrégats d'IP-BDY étaient visibles dans la suspension à l'issue du dopage. L'incorporation dans les nanolatex est plus facile pour les deux dernières molécules, le PM567 et le PM597.

La figure 9.12 présente les taux de dopage ainsi que le nombre de TMB incorporé par NL en fonction de la quantité de Bodipy introduite dans la suspension en $\mu\text{mol} / \text{g}$ de polymère, pour les échantillons préparés au cours de cette thèse ainsi que pour des NL fonctionnalisés par des cyclames et dopés avec du Mésitylbodipy (MB) (cf. figure 8.1) [48, 196]. Dans tous les cas la suspension contient 15 % en masse de DTAB. Même si les concentrations de fluorophore dans la solution de dichlorométhane sont similaires, le taux de dopage n'est pas toujours proche de 100%, pour un type de NL donné. Au cours de certains dopages, la suspension est devenue trouble au moment de l'ajout du dichlorométhane puis est redevenue translucide. L'homogénéisation de la suspension n'est pas toujours immédiate. Le dopage ne semble pas très reproductible.

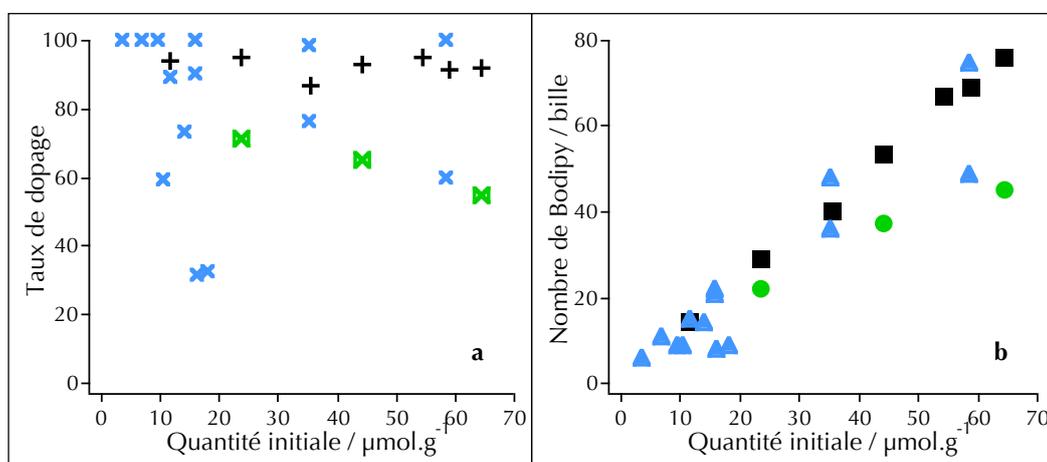


FIG. 9.12 – **a** : taux de dopage en fonction de la quantité initiale de Bodipy introduite, en $\mu\text{mol} / \text{g}$ de polymère; +, TMB dans NL-amine; x : MB dans NL-cyclame [48]; \boxtimes : MB dans NL-cyclame [196]. **b** : nombre de Bodipy par NL en fonction de la quantité initiale de Bodipy introduite; \blacktriangle : TMB dans NL-amine; \blacksquare : MB dans NL-cyclame (copolymérisés) [48]; \bullet : MB dans NL-cyclame (post-fonctionnalisés) [196].

Dans le cas du MB [48], le nombre maximal de molécule que l'on peut incorporer est de 110 molécules / bille et à partir d'une concentration de fluorophores de $60 \mu\text{mol} / \text{g}$ de polymère, soit environ 75 MB / bille, un relargage du colorant a été observé après quelques semaines. Pour le TMB, le nombre maximal de molécules par bille n'a pas été atteint, puisque lorsque la quantité de fluorophore initiale augmente, la concentration finale de TMB dans les billes augmente aussi. Par contre, un relargage du colorant a été observé dès $30 \mu\text{mol} / \text{g}$ de polymère, soit une quarantaine de TMB / bille. Il semble donc que le nombre maximum de molécule qu'il est possible d'incorporer dans la matrice polymère sans qu'il ne soit relargé soit plus important pour le MB que pour le TMB. Il y a deux explications :

- Comme le TMB est plus volumineux que le MB, le nombre de molécules que l'on peut mettre dans le volume des billes est plus faible. En effet, d'après la structure cristallographique, le TMB occupe un parallélépipède de dimension $15 \times 10 \times 5 \text{ \AA}$. Il est donc possible de placer environ 2 800 TMB dans une sphère de rayon 8 nm. Comme le MB a deux groupes mésityl en moins par rapport au TMB, ses dimensions sont de $10 \times 10 \times 5 \text{ \AA}$, et dans cette même sphère on peut mettre environ 4300 MB soit 1,5 fois plus de molécules. Ce calcul ne tient pas compte de la présence du polymère dans la sphère, mais dans les deux cas il occupe le même volume. On peut donc supposer que le rapport des quantités de molécules incorporées est conservé.
- La matrice polymère est différente. Pour les NL dopés avec du MB, étudiés par Rachel Méallet-Renault [48], le cyclame était introduit par copolymérisation. Il y avait donc des cyclames au cœur des billes, ce qui distend la matrice polymère et laisse plus de place au colorant. Dans les deux autres cas, la fonctionnalisation est réalisée après la synthèse, et la composition de la matrice fait qu'elle est plus compacte. Même pour le MB, il semble que le nombre de molécules incorporées dans ce type de matrice soit plus faible.

L'incorporation du TMB dans la matrice polymère par gonflement du polystyrène est donc possible et le colorant reste piégé dans les particules. Le taux de dopage est optimal quand la concentration de DTAB est de 15 % en masse, mais le taux de dopage n'est pas très reproductible. Il est préférable d'incorporer un nombre de fluorophores inférieur au nombre maximal afin qu'il n'y ait pas de relargage. La nature du fluorophore et celle du polymère influent sur le nombre de molécules incorporées. Enfin, bien que les TMB qui n'ont pas été incorporés dans les billes ne semblent pas modifier la spectroscopie des nanolatex fluorescents il serait préférable de les éliminer par dialyse.

9.2.3.2 Propriétés spectroscopiques

Spectroscopie stationnaire Trois types de NL ont été dopés avec des Bodipy : les billes fonctionnalisées par des amines par du TMB, les billes acides boroniques par du TMB, de l'IP-BDY, du PM567 et du PM597 et les billes NL-CI, i.e. les billes non fonctionnalisées après la synthèse, par du PM597. Les spectres d'absorption et de fluorescence du TMB dans les NL-teaeo sont présentés figure 9.13. Les positions des maxima d'absorption et de fluorescence pour les différents NL fluorescents sont rassemblées dans le tableau 9.3.

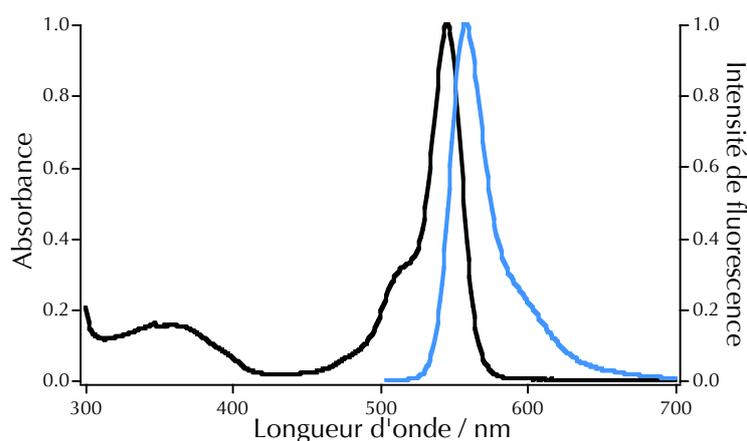


FIG. 9.13 – Spectres d'absorption (à gauche) et de fluorescence (à droite) des NL-teaeo, dopés avec du TMB. La suspension initiale est diluée entre 100 et 600 fois de manière à ce que le maximum d'absorption soit inférieur à 0,1.

Dans tous les cas, les spectres d'absorption et d'émission et d'excitation de fluorescence de la suspension diluée dans l'eau (dilution par 100 ou plus) ont la même forme que les spectres mesurés dans le dichlorométhane, mais un déplacement vers le rouge de 2 à 3 nm est observé. Sur les spectres d'absorption, il peut y avoir un fond de diffusion si les nanolatex sont déstabilisés, comme cela a été vu précédemment. En plus des transitions correspondant à l'absorption du Bodipy, il y a une augmentation de l'absorbance vers 300 nm, qui est due au polystyrène. Les positions des maxima sont indépendantes de la composition du nanolatex et de la quantité de fluorophore introduite. Le déplacement vers le rouge des spectres des Bodipy, par rapport aux spectres en solution, a aussi été observé pour les sphères commercialisées par Molecular Probes et les nanolatex contenant du MésitylBodipy préparés au laboratoire [41, 4, 48]. Il peut s'expliquer par le changement d'environnement de la molécule entre le solvant organique et la matrice de polystyrène.

Bodipy	Nanolatex ^a		CH ₂ Cl ₂		DTAB (%masse) ^b
	$\lambda_{abs}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	$\lambda_{abs}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	
TMB	545	559	543	556	≤1
IP-BDY	530	544	527	541	0,022
PM567	523	542	520	537	0,025
PM597	529	570	526	565	0,050

^aLes données présentées ici correspondent à des dopages réalisés en présence de 15% en masse de DTAB.

^bConcentration dans la solution utilisée pour faire les spectres

TAB. 9.3 – Maxima des spectres d'absorption ($\lambda_{abs}(nm)$) et de fluorescence ($\lambda_{em}(nm)$) des Bodipy dans les nanolatex et le dichlorométhane.

Le rendement quantique de fluorescence absolu ϕ_F des billes a été difficile à évaluer. La méthode la plus simple consiste à mesurer les spectres d'absorption et de fluorescence d'une référence et de la molécule étudiée dans les mêmes conditions et d'utiliser la formule :

$$\phi = \phi_{ref} * \frac{S}{S_{ref}} * \frac{A_{ref}}{A} * \left(\frac{n}{n_{ref}} \right)^2$$

Où S représente la surface sous le spectre de fluorescence, A l'absorbance de la solution à la longueur d'onde d'excitation de fluorescence et n l'indice de réfraction du solvant utilisé. Le rendement quantique du TMB incorporé dans les nanolatex fonctionnalisés par des ammonium a été mesuré en utilisant comme référence le TMB dans le dichlorométhane. La valeur de l'indice de réfraction de la suspension de nanolatex a été choisie égale à celle de l'eau. En effet, lors du passage solvant / air, les rayons lumineux sont déviés différemment selon le solvant et comme le spectrofluorimètre collecte la lumière émise avec une ouverture numérique fixe, il faut inclure cet effet dans le calcul du rendement quantique. Dans le cas des NL, la fluorescence est émise dans le polystyrène puis passe dans l'eau. Compte tenu de la taille des nanolatex, on assimile la suspension à des molécules de TMB dissoutes dans l'eau pour calculer ϕ . Le rendement quantique du TMB, mesuré avec cette formule, est de 1,3 dans les billes fonctionnalisées par des ammonium, ce qui n'est pas physiquement possible. L'origine de ce résultat n'a pas pu être déterminée.

Les rendements quantiques relatifs, mesurés en prenant une des suspensions comme référence ($\phi_F = 1$), ont aussi été calculés, ce qui permet de s'affranchir des effets d'indice de réfraction. Pour les NL fonctionnalisés par des ammonium, les rendements quantiques relatifs sont similaires pour les trois types de particules. Le rendement quantique du TMB dans les NL-teao ne dépend pas de la quantité de fluorophore introduite. Par contre, pour les NL-pba, le rendement quantique par rapport au NL-teao dopés avec du TMB est beaucoup plus faible (cf. tableau 9.4) ; il est de 10% pour le TMB et d'environ 40% pour les trois autres colorants. Les spectres d'absorption et de fluorescence indiquent que les Bodipy ne sont pas agrégés dans la matrice polymère, donc le quenching de la fluorescence est dû à la composition des NL, et en particulier à la présence d'acide phénylboronique à la surface des billes.

Fluorescence résolue en temps Les déclin de fluorescence des Bodipy dans les nanolatex sont présentés figure 9.14.

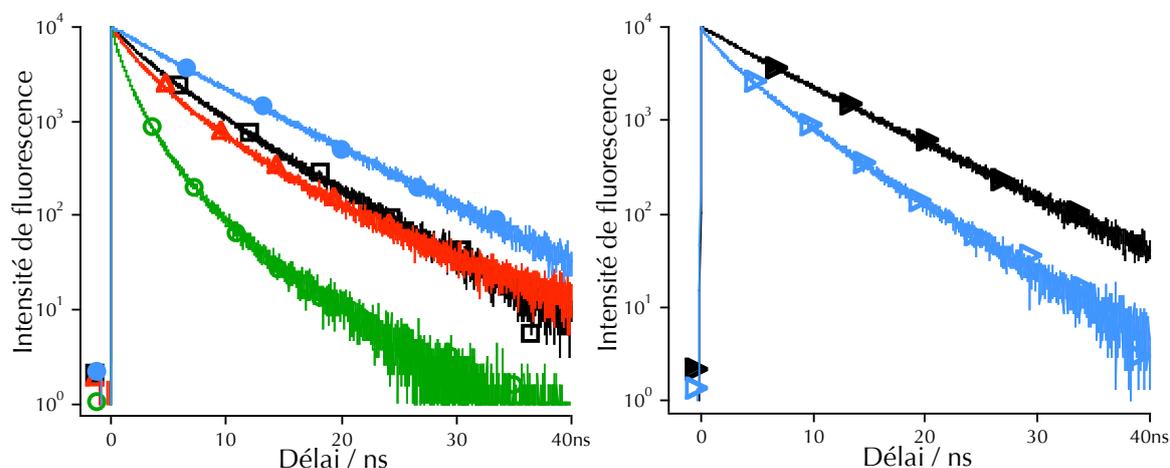


FIG. 9.14 – Déclins de fluorescence des nanolatex dopés avec des Bodipy. À gauche; ● : billes NL-teaeo et TMB; ○ : billes NL-pba et TMB; □ : billes NL-pba et IP-BDY; △ : billes NL-pba et PM567; À droite; ▶ : billes NL-Cl et PM597; ▷ : billes NL-pba et PM597

La durée de vie de fluorescence du TMB et du PM7597 dans les NL-ammonium et NL-Cl est de l'ordre de 7 ns, alors que les durées de vie de fluorescence mesurées dans le dichlorométhane sont de 6,30 et 4,57 ns. Cette augmentation de la durée de vie peut s'expliquer par une diminution des transitions non radiatives dues à l'incorporation dans la matrice polymère. La molécule est plus rigide et elle est protégée des collisions avec les molécules de solvant. Le déclin peut être ajusté avec une fonction monoexponentielle dans la plupart des cas (17 / 20 déclin mesurés). Mais dans tous les cas elle peut être ajustée par une fonction biexponentielle, les deux durées de vie étant assez différentes. L'environnement des fluorophores est donc variable à l'intérieur des billes.

Par contre pour les billes NL-pba, le déclin de fluorescence est visiblement bi-exponentiel, avec une durée de vie moyenne de 2,17 ns pour le TMB, de 5,05 ns pour l'IP-BDY, de 4,70 ns pour le PM567 et de 4,80 ns pour le PM597. Les constantes de temps correspondant à l'ajustement des déclin par une fonction bi-exponentielle sont rassemblées table 9.2.3.2. Ceci confirme que l'incorporation des Bodipy dans du polystyrène contenant des fonctions acide phényl-boronique induit un quenching de leur fluorescence. Le spectre d'absorption des NL-pba non dopés ne présente pas de bande d'absorption ayant un recouvrement significatif avec le spectre de fluorescence des Bodipy : l'absorbance est nulle entre 500 et 800 nm, puis en dessous de 500 nm, elle augmente un peu et il y a une bande centrée à 310 nm. Il ne peut donc pas y avoir de quenching par transfert d'énergie de type Förster. L'extinction de la fluorescence nécessite donc que le fluorophore et l'acide phénylboronique soient proches l'un de l'autre ($d < 10\text{\AA}$). Suivant la distance entre le

Bodipy et la surface, la fluorescence sera plus ou moins quenchée, ce qui contribue au caractère bi-exponentiel du déclin de fluorescence.

Nanolatex	Bodipy	Nombre de Bodipy / NL	Rendement quantique relatif	$\langle \tau \rangle$ (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
NL-teaeo	TMB	27	1	6,81	7,05 (87%)	2,61 (13%)	1,00
NL-pba	TMB	19	0,09	2,17	3,22 (21%)	1,12 (79%)	1,10
NL-pba	IP-BDY	4	0,38	5,05	5,89 (54%)	2,39 (46%)	1,04
NL-pba	PM567	16	0,42	4,70	6,26 (31%)	2,33 (69%)	1,11
NL-pba	PM597	11	0,44	4,80	5,68 (53%)	2,40 (47%)	1,06
NL-CI	PM597			7,02	7,32 (85%)	2,92 (15%)	1,04

TAB. 9.4 – Rendements quantiques relatifs (référence TMB dans les NL-teaeo) et durées de vie des Bodipy incorporés dans les nanolatex. $\langle \tau \rangle$: durée de vie moyenne, τ_1 et τ_2 , ajustement par une fonction biexponentielle, les chiffres entre parenthèses correspondent au poids de chaque durée de vie, χ^2 : valeur correspondant à l'ajustement par une fonction biexponentielle.

Anisotropie de fluorescence L'anisotropie de fluorescence permet de caractériser l'efficacité du transfert d'énergie entre les Bodipy dans les particules. En effet, les molécules étant incorporées dans la matrice polymère, elles sont a priori immobiles et l'anisotropie mesurée est due soit au mouvement des billes, soit à un transfert d'énergie entre les molécules dans les particules. Pour qu'ils modifient l'anisotropie mesurée, il faut que l'échelle de temps de ces phénomènes soit similaire à la durée de vie du fluorophore. Le temps de corrélation rotationnelle τ_r d'une sphère est égal à $1/6D_r$, où D_r est le coefficient de diffusion rotationnelle, qui est déterminé par la relation de Stokes-Einstein⁶ : $D_r = kT/6V\eta$ [9]. Pour une sphère de 16 nm de diamètre dans l'eau et à température ambiante, $\tau_r = 470$ ns. La rotation des particules ne peut donc pas être observée en mesurant l'anisotropie de fluorescence du TMB, dont la durée de vie est environ 100 fois plus faible.

La figure 9.15 présente l'anisotropie de fluorescence stationnaire en fonction de la longueur d'onde pour les NL-teaeo, pour trois concentrations de TMB différentes. Les valeurs obtenues varient entre 0,022 et 0,146, ce qui est inférieur à la valeur de l'anisotropie maximale du TMB dans le PMMA qui est de 0,29. Le rapport r/r_0 en fonction de γ^7 est présenté figure 9.16. Comme cela a été présenté dans le chapitre 8, la relation entre ce rapport et γ est :

$$\frac{r}{r_0} = 1 - \sqrt{\pi}\gamma \exp(\gamma^2)[1 - \text{erf}(\gamma)], \quad \gamma = \frac{\sqrt{\pi}}{2} C_A \frac{4}{3} \pi R_0^3 \quad (9.1)$$

La valeur de l'anisotropie limite, r_0 , du TMB qui a été mesurée dans le PMMA est probablement sous-estimée (cf. chapitre 8). Les points présentés figure 9.16 ont été calculés avec r_0 variant entre

⁶Avec k la constante de Planck, T la température en Kelvin, V le volume du NL et η la viscosité du solvant.

⁷ γ est proportionnel au nombre de molécules dans une sphère de rayon R_0 , le rayon de Förster

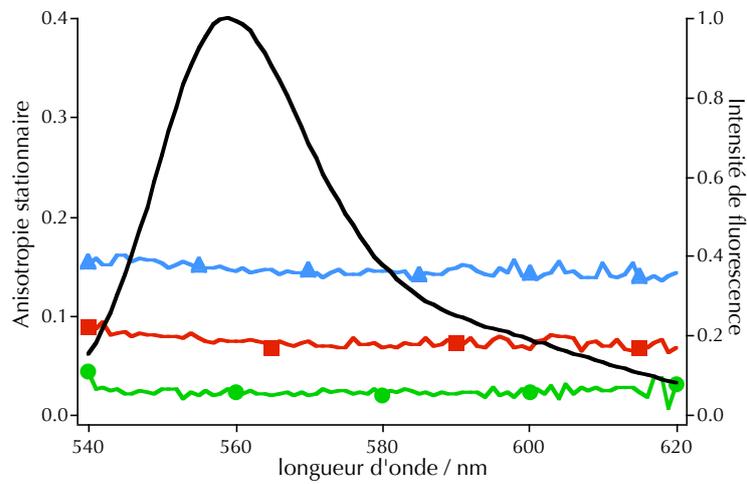


FIG. 9.15 — : Fluorescence des NL-teaeo dopés avec du TMB, Anisotropie stationnaire : \blacktriangle : 5 TMB / particule - $\langle r \rangle = 0,146$, \blacksquare : 10 TMB / particule - $\langle r \rangle = 0,073$, \bullet : 27 TMB / particule - $\langle r \rangle = 0,022$.

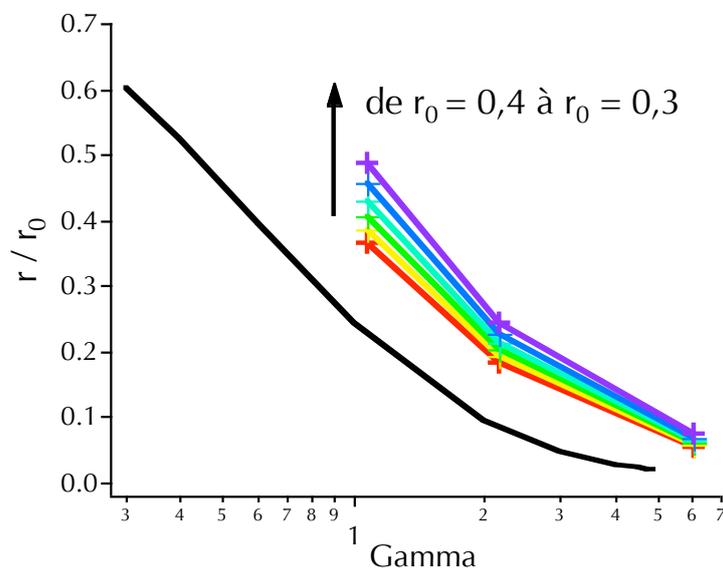


FIG. 9.16 – Évolution du rapport r/r_0 en fonction du paramètre γ . — : courbe théorique ; + : résultats expérimentaux pour différentes valeurs de r_0 .

0,4 et 0,3. Dans tous les cas, le rapport r/r_0 ne correspond pas à la valeur théorique attendue. Ceci semble indiquer que le modèle d'une répartition des molécules dans tout le volume des billes n'est pas tout à fait adapté. Les valeurs d'anisotropie sont plus faibles que celles attendues, ce qui indique que les TMB sont plutôt répartis à proximité de la surface des particules, où les distances intermoléculaires sont plus faibles que si les fluorophores étaient répartis de manière homogène dans le volume. D'autres résultats vont dans ce sens : l'amplitude du quenching de la fluorescence par les acides phénylboroniques est plus importante pour le TMB que pour les autres molécules. Ce qui indique que la proportion de molécules proches de la surface est plus importante pour le TMB. Ceci est cohérent avec le fait que le TMB est plus volumineux donc il rentre moins bien dans la matrice polymère.

Les études spectroscopiques présentées ici montrent que les colorants incorporés dans la matrice polymère se comportent comme des molécules isolées. La nature de la matrice modifie les propriétés de fluorescence par rapport à la molécule en solution. Le polystyrène protège les fluorophores des interactions avec le solvant mais la présence de fonctions à la surface des billes peut éteindre la fluorescence d'une partie des molécules incorporées. L'anisotropie de fluorescence montre qu'il existe un transfert d'énergie entre les fluorophores, ce qui pourrait permettre d'amplifier l'efficacité du quenching de la fluorescence par le bleu de cibacron.

Il semble que les fluorophores soient assez proches de la surface. Cependant, les résultats présentés dans cette section indiquent que les Bodipy sont dans le polymère et non pas adsorbés à la surface. En effet, l'expérience de dialyse de la suspension indique qu'il est difficile de diminuer la concentration dans les NL, de plus, cette concentration est stable dans le temps, et enfin pour des fluorophores adsorbés à la surface, la molécule pourrait tourner sur elle même, ce qui entraînerai une diminution de l'anisotropie. Mais la valeur mesurée serait alors indépendante de la concentration de fluorophore, ce qui n'est pas le cas ici.

Les NL-ammonium dopés par du TMB sont donc des nanoparticules ayant des propriétés de fluorescence satisfaisantes pour passer à l'étape suivante du développement du capteur d'ATP, c'est à dire tester le quenching de la fluorescence par le bleu de cibacron. Par ailleurs, la stabilité colloïdale a aussi été optimisée et les NL-teaeo sont les particules les plus stables.

9.3 Capteur d'ATP

Comme cela a été décrit dans l'introduction, le capteur d'ATP que nous cherchons à développer fait intervenir le quenching de la fluorescence des nanolatex par le bleu de cibacron, puis le déplacement des interactions entre la bille et le colorant par une enzyme. Dans un premier temps j'ai testé le quenching des billes par le bleu de cibacron, puis j'ai testé l'effet de l'ajout d'une enzyme dans la suspension.

9.3.1 Dilution du bleu de cibacron dans l'eau

La solubilité du bleu de cibacron dans l'eau est de $5,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, mais il a été montré que des dimères se forment à partir de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ [179]. Lors des expériences de quenching de la fluorescence des nanolatex, un petit volume, inférieur à $30 \mu\text{L}$, d'une solution de BC dans l'eau à $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ou $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ est introduit dans la solution. Il y a très probablement des agrégats de BC dans ces solutions 'mères'. Afin d'évaluer le devenir de ces agrégats lors de la dilution, l'absorbance de solutions de BC, à des concentrations similaires à celles utilisées pour les expériences de quenching, a été suivie pendant les premières heures suivant leur préparation. Un spectre a aussi été mesuré après 24 heures. Les résultats sont présentés figure 9.17.

L'évolution des spectres dépend de la concentration en DTAB de la solution. Lorsque celle-ci est de 0,109 % en masse ($0,2 \cdot \text{cmc}$), la forme du spectre d'absorption se stabilise en une dizaine de minutes et évolue peu ensuite. Sur la figure 9.17-a, l'amplitude du spectre évolue légèrement mais les spectres normés, qui ne sont pas présentés, sont superposés. D'après la figure 9.17-c, le spectre mesuré 5h après la dilution est similaire à celui d'une solution à la même concentration de BC et à 0,244% en masse de DTAB, mesuré après 24h.

Par contre, si la concentration de DTAB est plus faible, ici 0,025 % en masse ($0,05 \cdot \text{cmc}$), le spectre d'absorption continue à évoluer après plusieurs heures : l'absorbance à 635 nm augmente et un épaulement apparaît vers 700 nm (figure 9.17-b). Ce déplacement vers le rouge du spectre peut être attribué à des agrégats de BC. Le spectre d'absorption d'une solution de BC à $0,66 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et 0,025 % en masse de DTAB, c'est à dire moins concentrée, évolue de manière similaire. La présence d'agrégats n'est donc pas liée à la concentration finale de la solution. La figure 9.17-d montre que le spectre d'absorption après 5h est très différent des spectres mesurés dans l'eau ou en présence de DTAB 24h environ après la préparation de la solution. Lorsque la quantité de DTAB est faible, le nombre et la nature des agrégats de BC en solution continuent à évoluer plusieurs heures après la dilution de la solution mère, alors qu'en présence d'une quantité plus importante de DTAB, un état stationnaire est atteint en une dizaine de minutes.

Les spectres d'absorption mesurés après 24h (figure 9.17-c et -d) montrent que le spectre d'absorption du BC n'est pas le même dans l'eau et en présence de DTAB, ce qui traduit une interaction entre le colorant et le tensio-actif. Or, il a été montré qu'un tensio-actif (non-ionique)

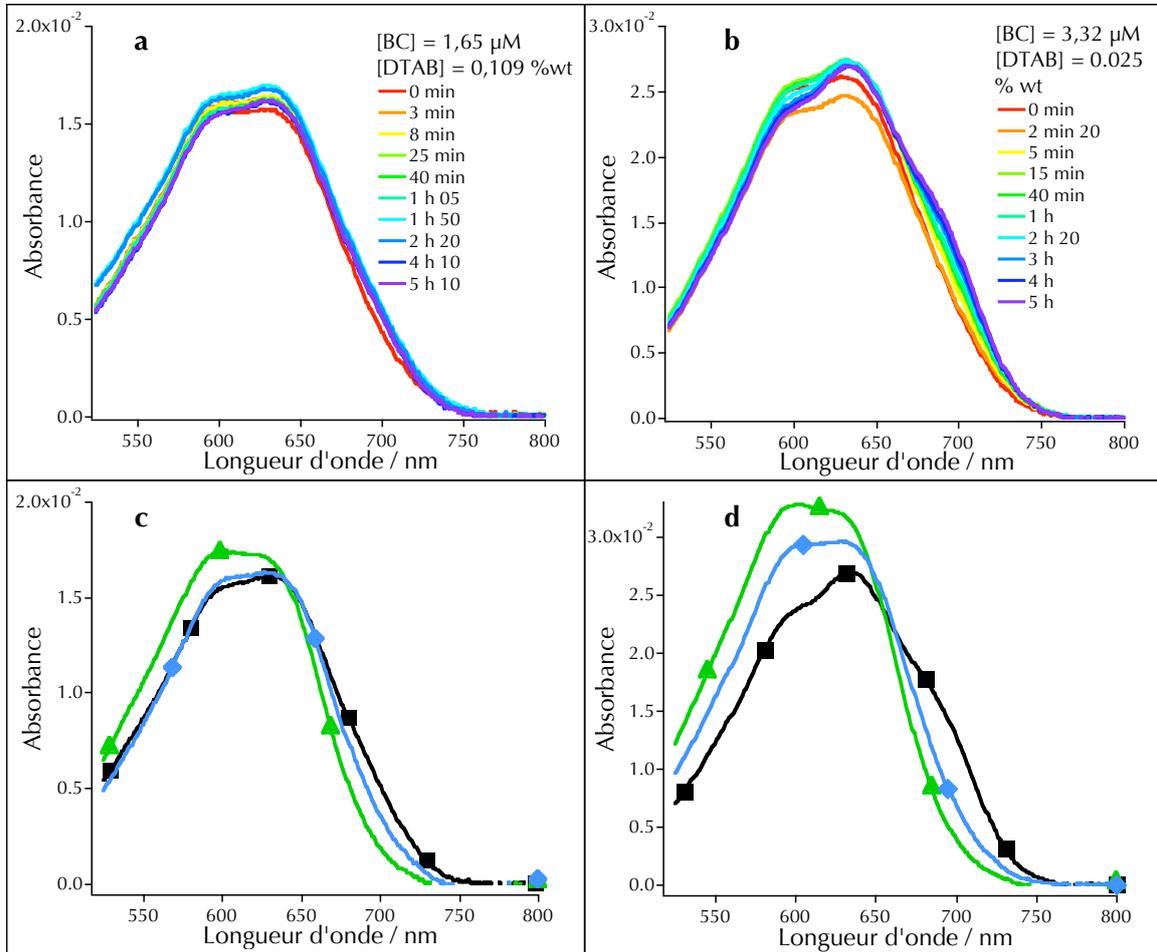


FIG. 9.17 – Spectres d'absorption du BC dilué dans l'eau, en présence de DTAB. **a** : Évolution du spectre d'absorption d'une solution de BC à $1,65 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en présence de DTAB à $0,109 \%$ en masse ($\approx 0,2 \text{ cmc}$). **b** : Évolution du spectre d'absorption d'une solution de BC à $3,32 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en présence de DTAB à $0,025 \%$ en masse ($\approx 0,05 \text{ cmc}$). **c** : BC à $\approx 1,63 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ■ dernier spectre de **a**; ▲ : dilution dans l'eau après 24h; ◆ : dilution dans du DTAB à $0,244 \%$ en masse ($\approx 0,5 \text{ cmc}$), après 24h. **d** : BC à $\approx 3,32 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ■ dernier spectre de **b**; ▲ : dilution dans l'eau, après 24h; ◆ : dilution dans le DTAB à $0,244 \%$ en masse, après 24h.

pouvait limiter la formation d'agrégats de BC [179]. En présence de DTAB, le BC va interagir avec ce surfactant, ce qui va faciliter la dissolution des agrégats présents dans les solutions concentrées. Par contre dans l'eau, ou quand la quantité de DTAB est très faible, ces agrégats se dissolvent plus lentement. Lorsque l'équilibre est atteint, il n'y a plus de gros agrégats, puisque la quantité de BC présente dans le milieu est trop faible.

Comme les concentrations maximales utilisées pour le quenching de la fluorescence des nanolatex sont de l'ordre de la concentration à laquelle apparaissent des agrégats de BC, i.e., $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la spectroscopie d'absorption différentielle a été utilisée pour rechercher la présence éventuelle d'agrégats dans la solution, suivant la procédure décrite par Federici et al. [179]. Cette technique consiste à comparer le spectre d'absorption d'une solution à la concentration C dans une cuve de longueur l à celui d'une solution de concentration $C * 10$ dans une cuve de longueur $l/10$. S'ils sont différents, cela signifie qu'il y a des agrégats dans la solution. Il est aussi possible de mesurer les spectres des solutions à C et $C * 10$ dans des cuves de même longueur et de comparer les spectres multipliés par le facteur adéquat. Le spectre d'une solution à $6,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$, divisé par 10, a été comparé à celui d'une solution à $0,66 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Une différence est observée dans l'eau et en présence de DTAB à 0,244 % en masse. Le spectre de différence d'absorption correspond à ceux présentés dans la littérature pour une agrégation du BC. La différence d'absorption est au maximum de 0,015 pour un spectre d'amplitude 0,08. Aux concentrations maximales utilisées pour le quenching il peut donc se former des agrégats de BC dans la solution, mais en quantité limitée. En dessous de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, l'absorbance est trop faible pour que les spectres soient exploitables.

Pour les expériences de quenching, une solution concentrée de BC est ajoutée dans la suspension de NL. La dissociation des agrégats présents dans la solution mère peut prendre plusieurs heures, mais elle est facilitée par la présence de DTAB. Lorsque l'équilibre est atteint, il reste probablement des agrégats de BC dans la suspension.

9.3.2 Cinétique d'adsorption du bleu de cibacron sur les billes

Adsorption Les premiers tests de quenching de la fluorescence des NL par le BC ont été réalisés en ajoutant au fur et à mesure le colorant dans la cuvette de spectroscopie contenant la suspension et en mesurant les spectres d'absorption et de fluorescence juste après l'ajout. Les résultats obtenus se sont avérés être peu reproductibles, et une évolution de l'intensité de fluorescence après l'ajout de BC a été observée. Un suivi de l'évolution de l'intensité de fluorescence des suspensions dans le temps a donc été réalisé.

Lorsque la suspension de NL est diluée dans l'eau, une légère augmentation ($\approx 5\%$) de l'intensité de fluorescence est observée puis celle-ci se stabilise après une heure environ. Ce phénomène peut s'expliquer par le changement d'environnement des nanoparticules, puisque la concentration de DTAB devient inférieure ou proche de la cmc. Pour étudier l'évolution de la fluorescence des

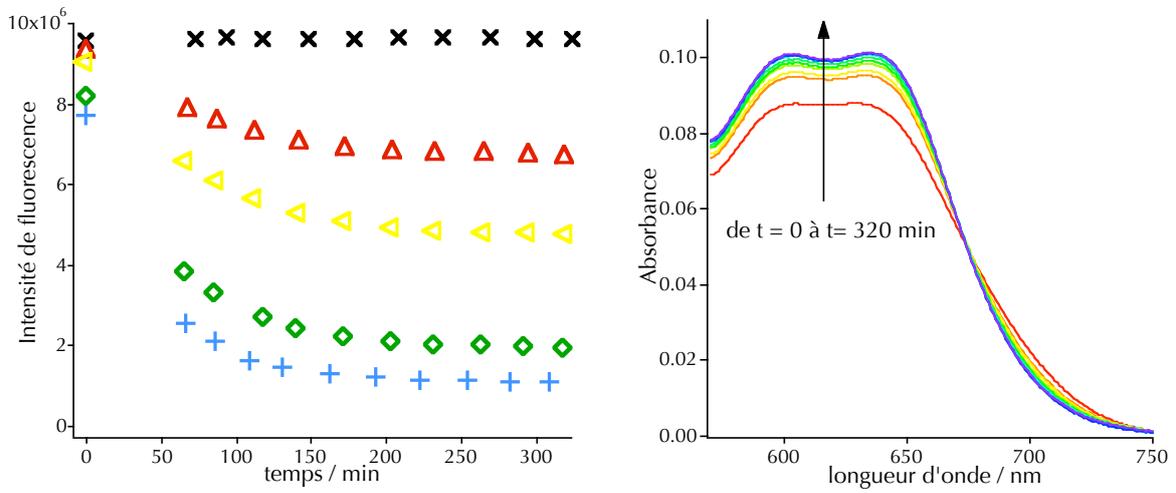


FIG. 9.18 – À droite : Évolution, en fonction du temps, du maximum de fluorescence de billes de latex NL-teaeo dopées avec du trimésitylbodipy, sans BC : \times , avec du BC : $1,3 \mu M$: Δ , $2,7 \mu M$: \triangleleft , $5,3 \mu M$: \diamond , $8,0 \mu M$: $+$ À gauche : spectres d'absorbance de la solution avec du BC à $8,0 \mu M$

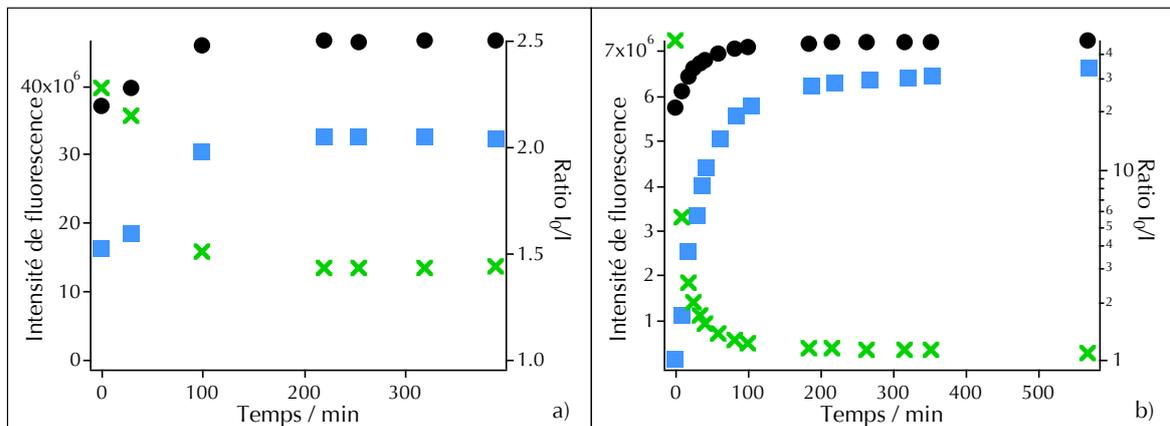


FIG. 9.19 – Évolution de la fluorescence ; \bullet : NL-teaeo 28 TMB / NL ; \blacksquare : NL-teaeo 28 TMB / NL + BC ; et du ratio $I_{\text{sans BC}}/I_{\text{avec BC}}$; \times en fonction du temps ; a) $[DTAB] = 0,025 \%$ masse, $[BC] = 0,50 \mu mol. L^{-1}$, ajout de $5 \mu L$ de NL-teaeo non dopés ; b) $[DTAB]_{\text{initial}} = 0,37 \%$ en masse ($< cmc$), $[BC] = 1,66 \mu mol. L^{-1}$, ajout de DTAB pour avoir $[DTAB]_{\text{initial}} = 0,95 \%$ en masse ($> cmc$).

billes après l'ajout du BC, l'expérience suivante a été réalisée : la suspension de NL a été diluée dans 16 mL d'eau millipore, de manière à avoir une absorbance de 0,1 au maximum du spectre. Après environ une heure, cette solution mère a été divisée en 5 cuves de 3 mL. Dans 4 de ces cuves, des petits volumes d'une solution concentrée de bleu de cibacron ont été ajoutés et la fluorescence des 5 cuves a été suivie pendant plusieurs heures. L'évolution de l'intensité au maximum des spectres est présentée figure 9.18.

La fluorescence de la cuve ne contenant pas de BC est restée constante pendant la durée de l'expérience. Par contre, en présence de BC, l'intensité de fluorescence diminue avec le temps. Il y a deux régimes ; dans les deux premières heures, elle diminue fortement puis la décroissance est moins marquée et l'intensité se stabilise après environ 5h30. L'absorbance à 800 nm reste stable pendant l'expérience, ce qui indique que la suspension n'a pas été déstabilisée et que le quenching observé est bien dû au BC. Par ailleurs, la zone des spectres d'absorption entre 560 et 750 nm, qui correspond à l'absorption du BC montre que cette molécule change d'environnement. En effet, comme le montre la figure 9.18, il y a une diminution de l'absorbance au-delà de 675 nm et une augmentation en deçà, avec l'apparition de deux maxima dans la zone 560 - 650 nm. Il y a un point isobestique à 675 nm. La cinétique observée pourrait être due à la présence de dimères de BC quand on ajoute la solution concentrée, qui doivent se dissocier avant de pouvoir interagir avec les billes. Mais le suivi de l'absorption de la solution concentrée diluée de la même manière montre qu'il n'y a pas d'évolution significative du spectre (cf. figure 9.17-a). La modification de la forme du spectre d'absorption semble plutôt être due à l'adsorption du colorant sur la bille. La figure 9.18 montre donc que le bleu de cibacron s'adsorbe sur les billes en 5 heures.

Pour tenir compte de cet effet, les mesures de quenching ont par la suite été faites en préparant une solution mère, divisée en plusieurs tubes de 3 mL dans lesquels ont été ajoutés différents volumes de solution de BC à 10^{-3} ou 10^{-4} mol.L⁻¹. Afin d'éviter les effets de dilution sur la fluorescence le volume ajouté était toujours inférieur ou égal à 30 μ L. Les spectres d'absorption et de fluorescence de ces échantillons étaient ensuite mesurés le lendemain de leur préparation. Les spectres d'une même solution sont identiques pour des mesures réalisées au cours de la même journée. Par ailleurs, les résultats obtenus pour deux expériences identiques réalisées à deux semaines d'intervalle sont reproductibles, comme le montrent les deux courbes à $[DTAB] = 0,025\%$ présentées figure 9.23.

Désorption Afin de déterminer la manière dont le BC se désorbe des billes, les expériences suivantes ont été réalisées :

- Des NL-teaeo 'blancs', c'est à dire non fluorescents, à 0,5 % en masse de DTAB ont été ajoutés, d'une part à une solution contenant des NL-teaeo à 28 TMB par bille et d'autre part à une solution contenant des NL-teaeo à 28 TMB par bille et 0,50 μ mol. L⁻¹ de bleu de cibacron. La concentration en DTAB de ces solutions est de 0,025 % en masse et n'est pas modifiée par l'ajout de NL. S'il y a un équilibre entre le BC libre et le BC adsorbé, une

partie du BC va s'adsorber sur les NL blancs et la quantité de BC sur les NL fluorescents va diminuer, on s'attend donc à ce que l'intensité de fluorescence de l'échantillon contenant du BC augmente.

- La concentration en DTAB d'une solution de référence et d'une solution avec $1,66 \mu\text{mol. L}^{-1}$ de BC a été augmentée jusqu'à une concentration supérieure à la cmc. Ici, on s'affranchit de l'effet de l'adsorption du BC sur les nanoparticules non fluorescentes, car le BC va aller dans les micelles de DTAB. Le suivi de l'absorbance d'une solution ne contenant que du BC, à la même concentration, à laquelle on ajoute du DTAB pour passer au dessus de la cmc montre que l'équilibre est immédiat ; le premier spectre après ajout de DTAB est différent de celui avant l'ajout, mais ensuite il ne varie pas. L'incorporation du BC dans les micelles n'est donc pas une étape limitante pour cette expérience.

L'évolution de l'intensité de fluorescence et du ratio $I_{\text{sansBC}}/I_{\text{avecBC}}$ est présentée figure 9.19. Dans les deux cas, la fluorescence des solutions avec et sans BC augmente avec le temps mais le ratio $I_{\text{sansBC}}/I_{\text{avecBC}}$ diminue aussi, ce qui signifie que le quenching de la fluorescence est moins important et donc qu'il y a moins de BC adsorbé sur les billes. Comme pour l'adsorption, la fluorescence évolue rapidement pendant une centaine de minutes puis se stabilise lentement. La cinétique de désorption du BC semble donc être similaire à la cinétique d'adsorption.

L'augmentation de la fluorescence de la solution sans BC pourrait s'expliquer dans le second cas au moins par une diminution du nombre d'agrégats dans la solution. En effet, avant l'ajout du tensio-actif, l'absorbance à 800 nm est d'environ 5.10^{-3} , mais elle diminue après l'ajout du DTAB. Cela peut signifier qu'il existe des agrégats nanoparticules dans la suspension initiale qui sont dispersés quand on ajoute du tensio-actif. Si les molécules de TMB sont près de la surface des particules, elles peuvent se trouver proches d'un autre fluorophore appartenant à une autre particule et un quenching de la fluorescence par homotransfert d'énergie peut se produire. Si la distance entre particules augmente, ce quenching disparaît.

Lorsqu'on ajoute du BC dans une suspension de NL fluorescents, un équilibre s'établit en plusieurs heures. L'augmentation de l'efficacité du quenching indique que la distance entre le fluorophore et le quencheur diminue. Le BC peut interagir avec les nanoparticules, soit par une interaction électrostatique entre les ammonium des billes et les sulfates du BC, soit par une interaction hydrophobe entre le polystyrène et le groupe anthraquinone. La lenteur de l'évolution pourrait être due à une modification de la géométrie tridimensionnelle du colorant qui conduit à une meilleure orientation entre l'anthraquinone et le TMB. Il est aussi possible que la présence d'agrégats de BC dans la solution influence la cinétique d'adsorption, qui serait due à leur dissociation. Enfin, il semble peu probable que le colorant pénètre dans la matrice polymère puisque l'adsorption est réversible.

Le nombre de molécules de BC effectivement adsorbées sur les billes pour une concentration donnée dans la solution est un paramètre important pour l'analyse du quenching de la fluorescence. Pour des particules dont le diamètre est supérieur à 100 nanomètres, il peut être déterminé

grâce à la mesure de l'isotherme d'adsorption de Langmuir [2]. Les particules sont séparées de la suspension par centrifugation et la quantité de colorant non adsorbé est évaluée à partir du spectre d'absorption du surnageant. La quantité de molécules adsorbées est donnée par la différence entre cette valeur et la quantité totale de colorant introduite. Pour les NL que j'ai étudiés, cette technique n'est pas applicable, car les billes sont trop petites et la différence de densité entre le polystyrène et l'eau est trop faible pour que la séparation soit efficace avec les centrifugeuses couramment utilisées dans les laboratoires de recherche. Différentes techniques ont été envisagées pour déterminer la quantité de BC libre, comme l'utilisation de filtres lors de la centrifugation ou la mesure de l'absorption différentielle du BC, mais aucune n'a donné de résultats satisfaisants. L'évolution de l'intensité de fluorescence a donc été étudiée en fonction du nombre de BC introduits dans la suspension, divisé par le nombre de particules, ce qui correspond au nombre maximum de molécules adsorbées par particule.

9.3.3 Quenching de la fluorescence des nanolatex

Données expérimentales Les spectres de fluorescence et les déclin d'une suspension de NL-teaeo contenant 8 TMB par particule en présence de BC sont présentés figure 9.20. Le graphe de Stern-Volmer, i.e. l'évolution du ratio $I_0/I - 1$ en fonction de la concentration de quencheur est présenté figure 9.21.

En présence de BC, une diminution de l'intensité et de la durée de vie de fluorescence des NL sont observées. Cette variation est observée dès $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en BC, ce qui correspond à moins de 1 quencheur adsorbé par bille. Lorsque la concentration en BC est de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, soit une quinzaine de molécules adsorbées par bille, la diminution de l'intensité est de 87%. Avec un nombre limité de quencheurs, on arrive donc à éteindre de manière significative la fluorescence des NL.

Cependant, comme la position relative de l'accepteur (le BC), par rapport au donneur (le TMB) est déterminée par le fait qu'ils sont liés aux billes, il existe une distribution de distances donneur - accepteur et les résultats obtenus ne sont pas analysables avec les modèles définis pour un quenching par transfert d'énergie en solution. En effet, le graphe de Stern-Volmer est incurvé vers le haut et le déclin de fluorescence en présence de BC ne peut plus être ajusté par une fonction monoexponentielle.

Dans le cas des NL fonctionnalisés par des cyclames, le graphe de Stern-Volmer est incurvé vers le bas, ce qui traduit la présence d'une population de fluorophores au coeur de la matrice polymère dont la fluorescence n'est pas éteinte [48]. Ceci n'a pas été observé pour les expériences réalisées pendant ma thèse. On peut donc supposer que les fluorophores sont proches de la surface, ce qui est cohérent avec les observations décrites dans la section 9.2.

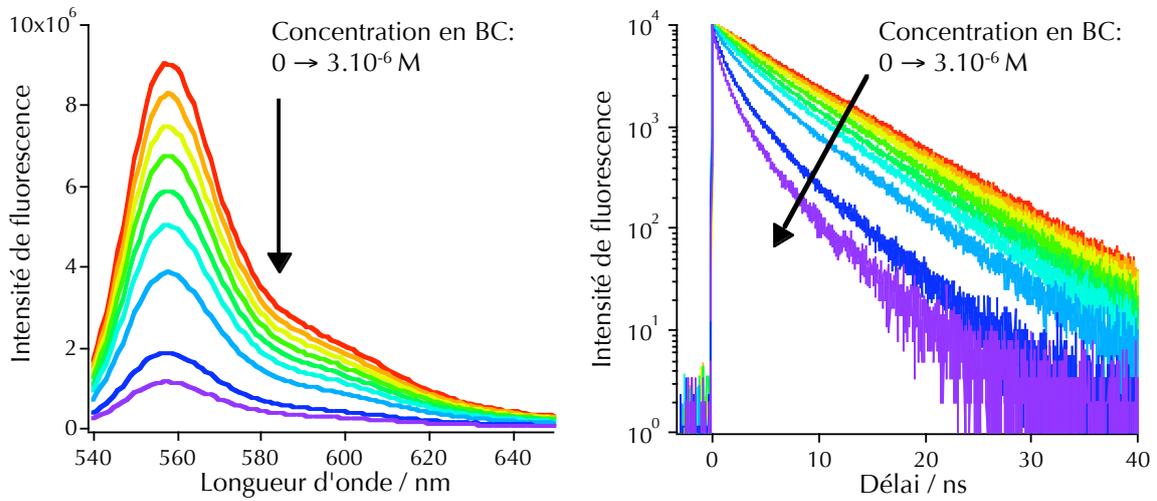


FIG. 9.20 – Spectres (à gauche) et déclin normalisés (à droite) de fluorescence des NL-teaeo contenant 8 TMB / particule, en présence de BC.

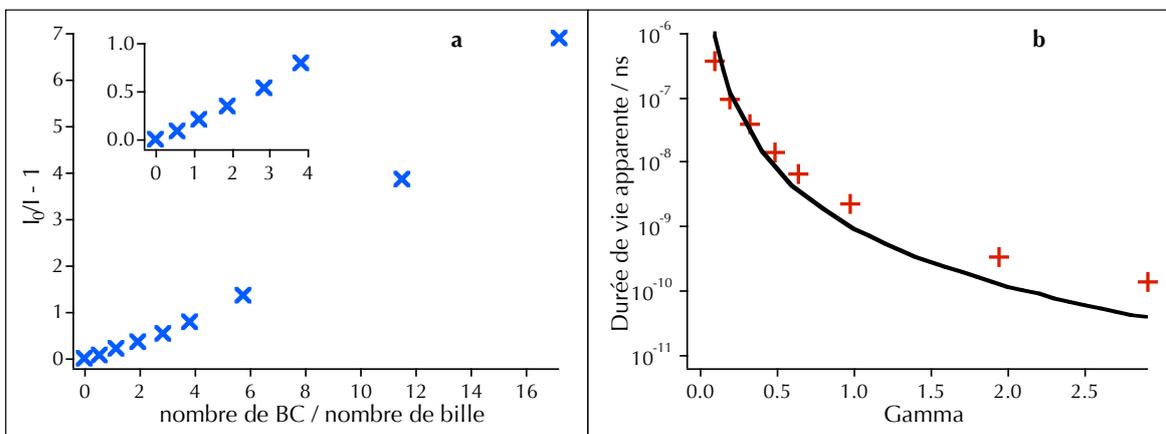


FIG. 9.21 – **a** : Évolution de $I_0/I - 1$ en fonction du nombre de BC présents dans la solution divisé par le nombre de billes, correspondant aux spectres de fluorescence présentés figure 9.20. **b** : Évolution de la durée de vie apparente obtenue en ajustant les déclin par une fonction en $\exp(-(t/\tau_{app})^{1/3})$ en fonction du paramètre γ , qui est proportionnel au nombre de molécules de BC sur un disque de rayon R_0 . — : valeur théorique, +, valeur expérimentale.

Klafter et Blumen ont étudié le transfert d'énergie non radiatif dans des systèmes qui ne peuvent pas être décrits par un réseau régulier et invariant par symétrie [20, 19]. Ce modèle a été appliqué à des systèmes ayant une symétrie sphérique par Yeka et al.. L'évolution de l'intensité de fluorescence est donnée par la relation [197] :

$$I_D(t, \vec{r}_0) = \exp(-t/\tau_D) * \varphi(t, \vec{r}_0) \quad (9.2)$$

τ_D est la durée de vie de l'état excité du donneur et φ la probabilité de survie du donneur à l'état excité. Ce paramètre dépend de la géométrie du système et de la probabilité de transfert déterminée par la théorie de Förster. Dans le cas où le donneur et l'accepteur sont répartis à la surface d'une sphère de rayon R_S , le calcul de $\phi(t, \vec{r}_0)$ conduit à :

$$I_D(t) = \exp(-t/\tau_D) \exp(-g(t)) \quad (9.3)$$

$$g(t) = 2\pi C_A \int_0^{2R_S} r dr \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_D} (R_0/r)^6\right) \right) \quad (9.4)$$

$$g(t) = g_{2D}(t)(1 + 0.0231(R_0/R_S)^4(t/\tau_D)^{2/3} - 7.21 \cdot 10^{-5}(R_0/R_S)^{10}(t/\tau_D)^{5/3} + \dots) \quad (9.5)$$

C_A est le nombre d'accepteurs par unité de surface, R_0 le rayon de Förster. Dans le cas où le rayon de la sphère est supérieur ou égal au rayon de Förster, $g(t)$ peut être approximé par $g_{2D}(t)$, qui correspond à un transfert d'énergie sur une surface plane.

$$g_{2D}(t) = 2\gamma_2 \left(\frac{t}{\tau_D}\right)^{1/3}, \quad \gamma_2 = \frac{\pi}{2} \Gamma(2/3) C_A R_0^2 = 2,127 C_A R_0^2 \quad (9.6)$$

Dans le système étudié ici, $R_S \approx R_0$. Les déclinés présentés figure 9.20 ont donc été ajustés par la fonction suivante :

$$I(t) = A + B \exp(-t/\tau - (t/\tau_{app})^{1/3}) \quad (9.7)$$

Tous les déclinés peuvent être ajustés par cette fonction avec un χ^2 inférieur à 1,2. De plus, $\tau = 7,3 \pm 0,04$ ns pour les six premières concentrations et $\tau = 7,54$ et $7,81$ ns pour les deux derniers déclinés qui sont déjà assez courts. Cette valeur est proche de la valeur attendue, i.e. la durée de vie du TMB dans les NL, qui est de 6,96 ns pour le premier déclin de la figure 9.20-a. La durée de vie apparente, τ_{app} , passe de 370 ns à 0,13 ns quand la concentration de BC augmente. Cette grandeur peut être reliée à la concentration surfacique de BC, via γ_2 , selon l'équation :

$$\tau_{app} = \frac{\tau_D}{8\gamma_2^3} \quad (9.8)$$

γ_2 a été calculé à partir de la concentration surfacique de BC correspondant à la quantité introduite. L'évolution des valeurs expérimentales de τ_{app} , ainsi que des valeurs calculées en fonction de γ_2 est présentée figure 9.21-b. Les valeurs expérimentales sont proches des valeurs attendues. La différence peut être due à plusieurs paramètres : le calcul de $I(t)$ présenté ici correspond au cas

où le facteur d'orientation κ^2 est de $2/3$, c'est à dire quand les molécules sont en rotation rapide, alors que $\kappa^2 = 0,476$ serait plus adapté ici ; de plus C_A est probablement surestimé et enfin il y a peut-être une erreur sur la valeur de R_0 car le coefficient d'absorption molaire du BC ne peut pas être défini de manière précise à cause de la présence d'agrégats.

Il est donc possible d'éteindre la fluorescence des NL par le BC. Les déclin de fluorescence peuvent être analysés avec le modèle décrivant un transfert d'énergie non radiatif entre des molécules réparties sur une surface. Les fluorophores sont donc proches de la surface des billes. L'effet de la concentration de TMB, de la concentration de DTAB et de la force ionique sur l'efficacité du quenching ont ensuite été étudiés. Pour ces études, seule la fluorescence stationnaire a été utilisée. Les résultats présentés ont été obtenus avec les NL-teao mais ceux correspondant aux NL-pyr et aux NL-tea sont similaires.

Effet du nombre de TMB par nanolatex Les courbes de Stern-Volmer pour des NL-teao contenant différentes quantités de TMB par nanolatex sont présentées figure 9.22.

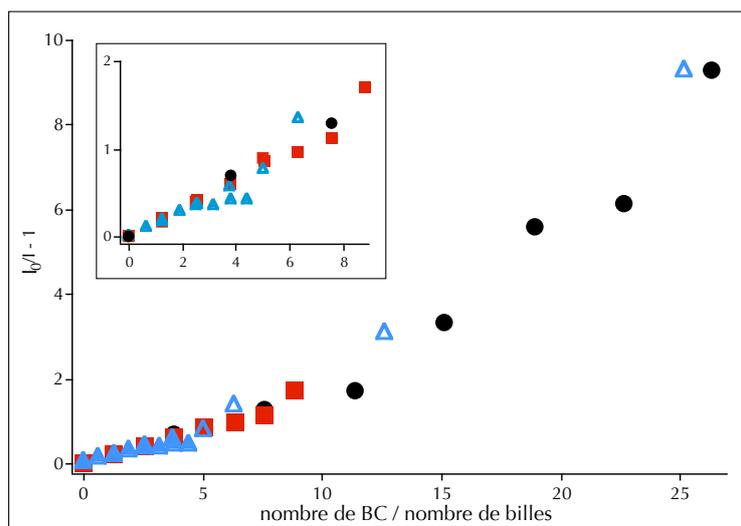


FIG. 9.22 – $I_0/I - 1$ en fonction du nombre total de bleu de cibacron rapporté au nombre de billes, pour différentes concentrations de TMB dans les NL-teao. ● : 28 TMB / bille ; ■ : 10 TMB / bille ; ▲ : 5 TMB / bille. Encart : zoom sur les faibles concentrations de BC.

Lorsque la quantité de BC adsorbée est faible, les données sont superposées quelque soit la quantité de TMB dans les billes. Cela signifie que la proportion de fluorophores éteints par une molécule de BC ne dépend pas du nombre de fluorophores introduits dans les particules. Elle correspond aux fluorophores qui sont dans un disque de rayon R_0 . S'il y avait un homotransfert d'énergie entre les TMB, le quenching serait amplifié. L'effet coopératif dû à la migration de l'énergie est d'autant plus important que la concentration en fluorophore est élevée car la probabi-

lité de transfert augmente quand la distance intermoléculaire diminue. Par conséquent, l'extinction de la fluorescence des NL par le BC n'est due qu'à un transfert d'énergie direct entre le TMB et le colorant. Quand la concentration de BC augmente, il y a de plus en plus de BC à la surface des particules et il peut y avoir un recouvrement des zones d'action de deux quencheurs. L'amplitude du quenching est alors plus aléatoire et la superposition des tracés de Stern-Volmer est moins bonne.

Effet de la concentration en DTAB Les expériences de quenching des billes fluorescentes ont été réalisées en présence de différentes concentrations de DTAB. La figure 9.23 présente les résultats obtenus avec des NL-teaeo à 28 TMB par bille.

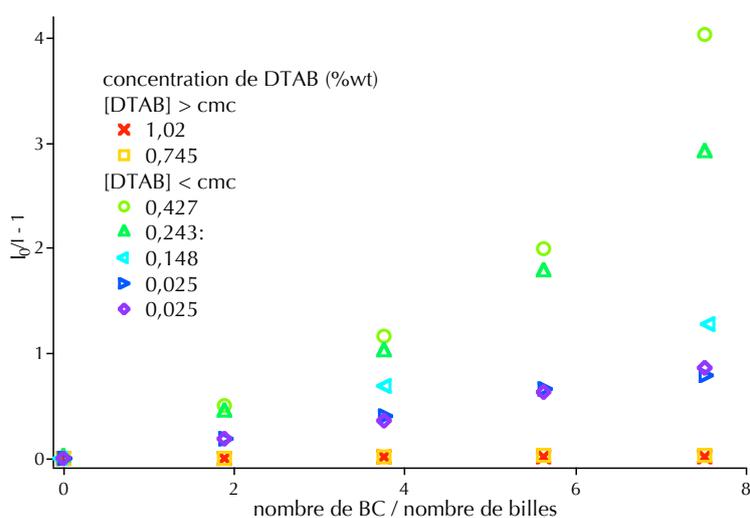


FIG. 9.23 – $I_0/I - 1$ en fonction du nombre total de bleu de cibacron rapporté au nombre de billes, pour différentes concentrations de DTAB dans le milieu

Deux comportements différents apparaissent suivant la valeur de la concentration en DTAB par rapport à la concentration micellaire critique ($cmc = 0,49$ % wt) :

- Si la concentration en DTAB est supérieure à la cmc, l'intensité de fluorescence en présence de BC ne diminue quasiment pas. Comme il y a des micelles dans le milieu, on peut supposer que le BC va être majoritairement piégé dans les micelles au lieu d'être adsorbé sur les billes. Dans ce cas, la distance entre le TMB et le BC est trop importante pour qu'un transfert d'énergie ait lieu.
- Si la concentration en DTAB est inférieure à la cmc, alors un quenching efficace de la fluorescence des billes se produit. Dans ce cas il n'y a pas de micelles et le bleu de cibacron peut être adsorbé sur les billes. De plus, la figure 9.23 montre que, plus il y a de tensio-actif plus le quenching est efficace. En effet, le DTAB a tendance à s'adsorber à la surface des billes, ce qui augmente la charge de surface positive de celles-ci. Comme le BC est chargé

négativement, il aura une meilleure affinité pour des billes ayant une charge de surface plus élevée. Le quenching est donc plus efficace. L'interaction entre le DTAB et le BC pourrait aussi intervenir.

Effet de la force ionique Les expériences faisant intervenir l'enzyme doivent être réalisées dans des conditions où celle-ci est stable, c'est à dire dans un milieu où le pH est fixé par un tampon. Des expériences de quenching de la fluorescence des billes par le bleu de cibacron ont donc été réalisées dans du tampon TRIS - HCl à pH 8. Les concentrations en TRIS étaient de 10, 20 ou 50 mM. Les résultats obtenus avec les NL-teaeo contenant 28 TMB par bille sont présentés figure 9.24. Il y a deux effets observés :

- Par rapport à la même expérience réalisée dans l'eau, le quenching est moins efficace en présence de tampon. Ceci peut s'expliquer par une moins bonne solubilité du bleu de cibacron dans le tampon. En effet, il a été montré que, quand la force ionique du milieu augmente, la formation d'agrégats est plus probable [179]. La quantité de BC adsorbée est donc moins importante.
- En présence de TRIS, le quenching est d'autant plus efficace que la concentration est élevée. Ceci traduit une meilleure adsorption du BC sur les billes quand la force ionique augmente.

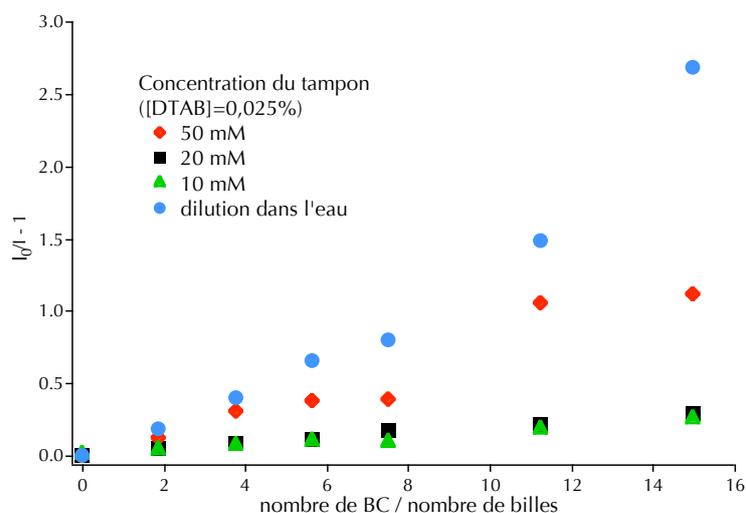


FIG. 9.24 – $I_0/I - 1$ en fonction du nombre total de bleu de cibacron rapporté au nombre de billes, pour différentes concentrations de tampon TRIS - HCl dans le milieu

9.3.4 Tests en présence d'enzyme

L'effet de l'ajout d'une enzyme dans le milieu sur la fluorescence des billes a été testé. Dans un premier temps, la suspension NL-teaeo à 28 TMB par bille a été diluée dans du tampon TRIS - HCl à $\text{pH} = 7,9$ (20mM), de manière à ce que l'absorbance de la solution soit proche de 0,1. Cette suspension a été divisée en deux et du BC a été introduit dans un de ces tubes, de manière à avoir une diminution de la fluorescence de 40% environ. Le lendemain, de l'ATCase puis de l'ATP ont été ajoutés dans ces deux suspensions. L'évolution de l'intensité de fluorescence des deux solutions après l'ajout ainsi que du rapport de ces deux intensités sont présentées 9.25.

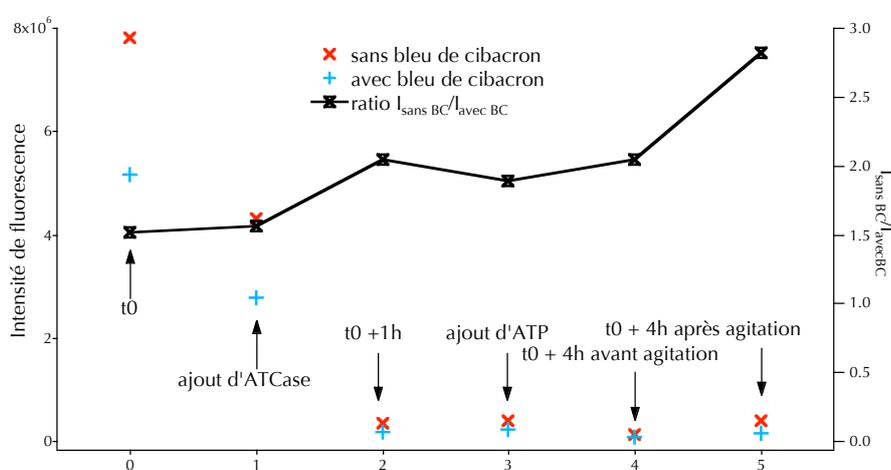


FIG. 9.25 – Évolution de l'intensité de fluorescence d'une suspension de NL-teaeo à 28 TMB / bille et de la même suspension contenant du BC, ainsi que du rapport entre ces deux intensités, après ajout d'ATCase. $[NL] = 25 \text{ nmol.L}^{-1}$, $[BC] = 1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, $[ATCase] = 9,8 \text{ nmol.L}^{-1}$, $[ATP] = 16 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Lorsque l'enzyme est introduite dans la suspension, la fluorescence des deux solutions diminue et un fond de diffusion apparaît sur les spectres d'absorption. Une heure après l'ajout, la fluorescence de la solution sans BC est égale à 4,3 % de la valeur initiale et celle de la solution avec BC est de 3,2 %. Cette diminution est due à la floculation des particules. De l'ATP en très large excès par rapport à la quantité d'enzyme a ensuite été introduit dans le milieu. L'intensité de fluorescence continue à diminuer. Le rapport $I_{\text{sans BC}}/I_{\text{avec BC}}$ augmente, ce qui signifie que la suspension contenant du BC est plus déstabilisée que celle qui n'en contient pas. La même expérience a été répétée en utilisant dix fois moins d'enzyme, i.e. $0,98 \text{ nmol.L}^{-1}$ au lieu de $9,8 \text{ nmol.L}^{-1}$. Une déstabilisation de la suspension a aussi été observée.

L'introduction de l'enzyme dans la suspension entraîne donc une floculation irréversible des NL. Il semble que l'enzyme interagisse avec les particules et que cela déstabilise la suspension.

9.4 Conclusion et perspectives

Des nanolatex fonctionnalisés par des groupements pyridinium et ammonium polyéthylène glycol ont été préparés. Les particules obtenues sont chargées positivement, et les chaînes hydrophyles permettent de limiter la déstabilisation de la suspension quand ces charges sont neutralisées. Ces nanolatex peuvent être rendus fluorescents en incorporant un fluorophore dans la matrice polymère. Les propriétés de fluorescence des NL contenant du TMB, et en particulier l'anisotropie, indiquent que le fluorophore est plutôt à proximité de la surface des particules. Cette répartition est confirmée par l'analyse du quenching de la fluorescence des NL. Si le fluorophore est moins volumineux, il semble pénétrer plus profondément dans le polymère.

L'extinction de la fluorescence des NL par transfert d'énergie a été mise en évidence. Une diminution importante de l'intensité de fluorescence est observée en présence d'un faible nombre de molécules de BC : avec une quinzaine de quencheurs il est possible d'éteindre 87% de la fluorescence d'une particule. Cependant, ce quenching n'est pas amplifié par un transfert d'énergie entre les fluorophores. Des expériences réalisées par Rachel Méallet-Renault montrent que pour les NL-cyclame dopés avec du mésityl-bodipy, l'effet coopératif ne se produit qu'avec des concentrations plus élevées de fluorophore.

Cependant, le système envisagé pour détecter l'ATP n'a pas pu être réalisé car les contraintes pour obtenir un système stable sont trop nombreuses. De plus, l'interaction entre le BC et les billes se stabilise en plusieurs heures, ce qui empêche une réponse rapide du système. Il est donc préférable de développer des systèmes où l'interaction entre l'analyte et le nano-objet se fait de manière spécifique. Ainsi, des expériences préliminaires ont été réalisées avec les NL-pba. Les acides boroniques forment des complexes avec les catéchols. Deux molécules, qui sont susceptibles d'éteindre la fluorescence des Bodipy par transfert d'énergie ont été introduites dans une suspension de NL-pba dopés avec du PM597 : le Rouge de Bromopyrogallol et la Gallocyanine. Un quenching de la fluorescence est observé et il est beaucoup plus important que celui mesuré pour des NL non fonctionnalisés. L'interaction spécifique entre le colorant et l'acide boronique permet donc d'amplifier le quenching. Il serait ensuite possible de restaurer la fluorescence en dissociant le complexe.

La préparation de nanolatex fonctionnalisés, qui s'effectue dans l'équipe de Chantal Larpent, est bien maîtrisée. Ces NL peuvent être rendus fluorescents et la possibilité de moduler le signal de fluorescence en présence d'un analyte a été prouvée. L'intérêt d'incorporer des nanoparticules dans des senseurs fluorescents est donc indéniable mais un travail important reste à faire pour mieux maîtriser les interactions entre l'analyte et les particules.

Conclusion générale

Le travail de thèse présenté ici a consisté à étudier la fluorescence de dérivés de Bodipy à l'état solide et en matrice polymère, dans le but de réaliser des nanocapteurs fluorescents. Une vingtaine de molécules ont été étudiées de manière plus ou moins poussée selon leur intérêt.

L'objectif principal de l'étude des solides était de trouver des molécules qui pourraient être utilisées pour préparer des nanocristaux fluorescents. La fluorescence de cristaux macroscopiques mais aussi celle de particules plus petites ont donc été étudiées.

D'une manière générale, pour l'ensemble des dérivés de Bodipy étudiés, les interactions qui existent entre les molécules à l'état solide sont suffisamment fortes pour qu'il y ait une délocalisation de l'énergie d'excitation sur plusieurs molécules, ce qui conduit à la formation d'un exciton. Pour un même dérivé de Bodipy, il y a une dispersion importante des propriétés observées. Les impuretés et les défauts de structure piègent l'excitation, ce qui conduit à un quenching de la fluorescence. À l'état cristallin, une bonne corrélation a pu être établie entre les propriétés spectroscopiques observées et la structure cristallographique des molécules.

Certains des Bodipy étudiés sont fonctionnalisés avec des groupements encombrés, de manière à limiter les interactions entre les fluorophores dans le solide. Il s'agit du Trimésityl-Bodipy (TMB) et des paracyclophanyl-Bodipy (pcp-BDY). Dans les films préparés par évaporation d'une solution contenant le fluorophore sur une lamelle de microscope, le spectre de fluorescence possède une bande proche de celle de la molécule en solution, mais pour le TMB et l'un des pcp-BDY, il y a aussi des bandes à des longueurs d'onde plus élevées, ce qui traduit la formation d'agrégats. Le spectre de fluorescence des cristaux macroscopiques de TMB indique quand à lui qu'il se forme également un agrégat fluorescent, qui est différent de celui observé dans la phase amorphe. La stratégie adoptée a donc partiellement fonctionné, puisque pour certaines molécules la fluorescence des films, qui sont plutôt amorphes, est similaire à celle du monomère.

L'iodophényl-Bodipy a ici fait l'objet d'une étude particulièrement complète. Il apparaît effectivement qu'il possède de bonnes propriétés de fluorescence à l'état solide : à l'état massif, il se forme un agrégat de type J dont les spectres d'absorption et de fluorescence sont déplacés vers les grandes longueurs d'onde. Des nanocristaux en matrice sol-gel ont également été préparés. Dans ce cas, la formation d'un agrégat de type J a aussi été mise en évidence, mais le déplacement des

spectres est moins important. La durée de vie de cette espèce est de plus très courte et l'intensité de fluorescence est importante. D'autre part, en présence de bleu de cibacron, la fluorescence de ces cristaux ne varie pas, peut être à cause de la taille trop importante des cristaux dans l'échantillon utilisé. Il sera donc intéressant de réaliser un nouvel essai avec des cristaux plus petits.

L'un des intérêts d'étudier les dérivés de Bodipy en matrice polymère est lié au fait que l'incorporation de fluorophores dans un tel milieu permet d'augmenter leur densité tout en limitant les interactions intermoléculaires. Dans un premier temps, des films de PMMA contenant des Bodipy ont été étudiés. J'ai utilisé ces films comme modèle pour caractériser le transfert d'énergie non radiatif entre les fluorophores. Il a aussi été démontré que la fluorescence de ces films pouvait être modulée par un quencheur comme le bleu de cibacron, ou par une molécule photochrome.

Les nanoparticules de polymère considérées peuvent permettre d'amplifier l'efficacité de l'interaction entre un fluorophore et son quencheur en contrôlant la géométrie de la paire donneur-accepteur. Malheureusement, le capteur d'ATP envisagé initialement s'est révélé être trop compliqué et nécessite de maîtriser trop de paramètres difficilement contrôlables pour être réalisable. Cependant, l'étude présentée ici montre que la fluorescence des nanolatex peut être éteinte de manière efficace, et d'autres capteurs, ayant pour cible des ions métalliques ou des sucres sont en cours de développement.

En conclusion, j'ai pu mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation de certains Bodipy pour préparer des nanoobjets fluorescents dont la fluorescence peut être modulée en présence d'un analyte, mais un travail important de développement reste à faire pour mettre au point des nanocapteurs utilisant ces fluorophores.

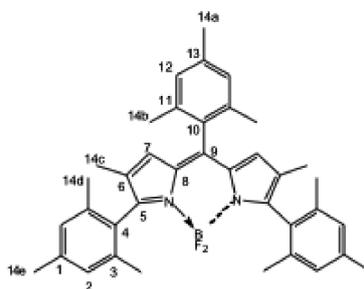
Annexe A

Synthèse du TMB et des pcp-BDY

TMB



$$M = 576,82 \text{ g.mol}^{-1}$$



405 mg (2,03 mmol) de pyrrole sont solubilisés dans 70 mL de dichlorométhane rectapur et placés dans un bicol propre et sec. La solution est dégazée et placée sous argon. 100 mg (0,67 mmol) de benzaldéhyde puis 2 gouttes d'acide trifluoroacétique sont ajoutés à la solution. Après 3 heures 30, 4 gouttes d'acide trifluoroacétique sont additionnées. Le mélange est agité 24h, jusqu'à disparition du pyrrole. 235 mg (1,03 mmol) de 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone (DDQ), solubilisés dans 20 mL de dichlorométhane dégazé sont introduits dans le ballon. Après 30 minutes, de la diisopropyl-éthyl-amine puis 3 mL d'éthérate de trifluorure de Bore sont ajoutés au mélange. La purification du brut réactionnel par chromatographie flash sur silice préalablement séchée (dichlorométhane / éther de pétrole 15 : 85) fournit 250 mg d'un produit rouge (45%).

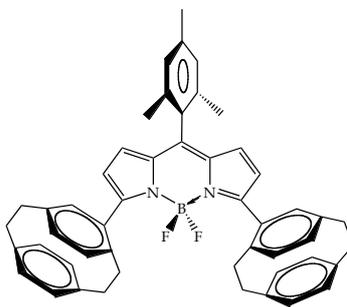
RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : 7,00 (s, 2H, H_{12}); 6,84 (s, 4H, H_2); 6,42 (s, 2H, H_7); 2,40 (s, 3H, H_{14a}); 2,26 (s, 6H, $\text{H}_{14b \text{ ou } e}$); 2,24 (s, 6H, $\text{H}_{14b \text{ ou } e}$); 2,06 (s, 12H, H_{14d}); 1,65 (s, 6H, H_{14c}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 72,5MHz) : 157,8; 141,6; 138,3; 137,4 (CH aromatique); 136,8; 134,2;

131,1; 129,0; 128,5 (q, $J_{C-B}=2,8\text{Hz}$); 128,1 (CH aromatique); 127,8 (CH aromatique); 127,0; 29,8 (C_{14a}); 21,4 (C_{14e}); 20,1 (C_{14d} ou C_{14b}); 20,0 (C_{14d} ou C_{14b}); 11,0 (C_{14c}).

SM (EIMS, m/z) : 526 ($M - \text{BF}_2$)⁺

hpcp-BDY



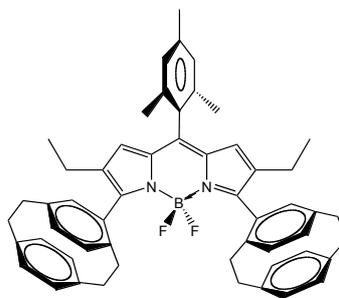
Le protocole expérimental est le même que celui utilisé pour le TMB, avec :

- 100 mg de pyrrole, pur à 90% ($\approx 0,452 \text{ mmol}$) dans 10mL de dichlorométhane rectapur.
- 0,020 mL de mésitylaldéhyde (0,135 mmol) et 2 gouttes d'acide trifluoroacétique puis 4 gouttes d'aldéhyde et 3 gouttes d'acide trifluoroacétique après une nuit. La solution est marron.
- 40 mg (0,176 mmol) dans 4mL de CH_2Cl_2 dégazé. La solution est gris-vert
- 0,5 mL de diisopropyl-éthyl-amine et 0,5 mL d'éthérate de trifluorure de Bore. La solution est orange - sombre

La purification a été réalisée par chromatographie sur plaque préparative (éther de pétrole / Et2O : 80/20). Une solution concentrée dans le dichlorométhane est déposée sur la plaque. Trois fractions ont été isolées : la première n'est pas du Bodipy, les deux autres, qui ont des R_f similaires donnent un solide violet foncé ($\approx 10 \text{ mg}$). Les pics caractéristiques de tous les atomes du Bodipy sont présents sur le spectre RMN.

epcp-BDY

$$M = 744 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$



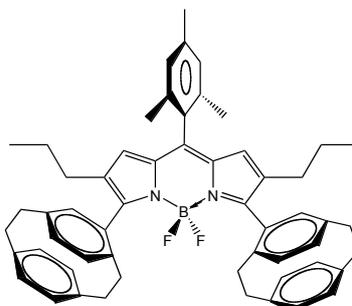
Le pyrrole de départ (245 mg) n'est pas pur, d'après la RMN. Pour cette réaction, 0,060 mL de mésitylaldéhyde (0,4 mmol), 95 mg de DDQ (0,418 mmol), 2 mL de diisopropyl-éthyl-amine et 2 mL d'éthérate de trifluorure de Bore ont été utilisés.

La purification a été réalisée par chromatographie sur plaques préparatives. Trois fractions sont isolées : seule deux correspondent au Bodipy. Quelques mg de chaque isomère (solide violet) ont été récupéré.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : 6,89-7,21 (m, 4H), 6,60-6,83 (m, 6H), 6,21-6,55 (m, 8H) 2,75-3,55 (m, 20H), 2,40 (s, 6H, Me), 2,27 (s, 3H, Me), 0,84 (t, $J = 7,90\text{Hz}$, 6H, CH_2CH_3).

ppcp-BDY

$$M = 774 \text{ g.mol}^{-1}$$



Le pyrrole de départ (220 mg) n'est pur qu'à 80 %. Pour cette réaction, 0,055 mL de mésitylaldéhyde (0,371 mmol), 80 mg de DDQ (0,352 mmol), 2 mL de diisopropyl-éthyl-amine et 2 mL d'éthérate de trifluorure de Bore ont été utilisés.

La purification a été réalisée par chromatographie sur plaques préparatives (éther de pétrole / CH_2Cl_2 20/80). Trois fractions sont isolées : seules deux correspondent au Bodipy. Quelques mg de chaque isomère (solide violet) ont été récupérés.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) : 6,93-7,37 (m, 4H), 6,54-6,86 (m, 6H), 6,23-6,52 (m, 8H) 2,72-3,61 (m, 20H), 2,42 (s, 6H, Me), 2,28 (s, 3H, Me), 1,13 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,63 (t, $J=7,35\text{Hz}$, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Annexe B

Structures cristallographiques

Trimésitylbodipy - TMB

Groupe d'espace : $Pc a 2_1$

Paramètres de maille :

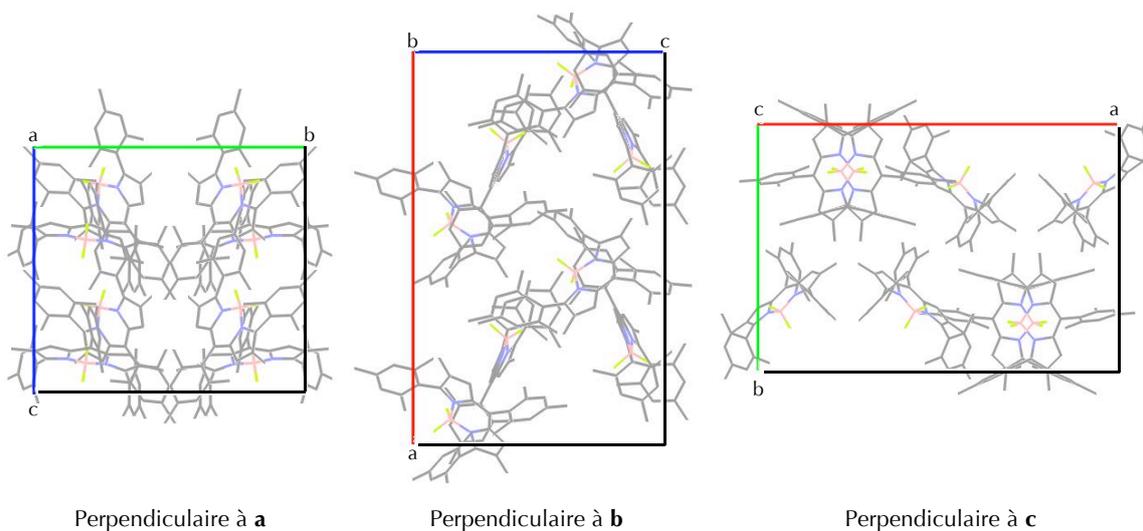
$a = 24,843 \text{ \AA}$; $b = 17,152 \text{ \AA}$; $c = 15,644 \text{ \AA}$

$\alpha = 90^\circ$; $\beta = 90^\circ$; $\gamma = 90^\circ$

Volume de la maille élémentaire : $6668,7 \text{ \AA}^3$

Nombre de molécules par maille élémentaire : 8

Projection de la structure selon les trois axes du réseau cristallin :



Iodophénylbodipy - IP-BDY

Groupe d'espace : $P2_1/c$

Paramètres de maille :

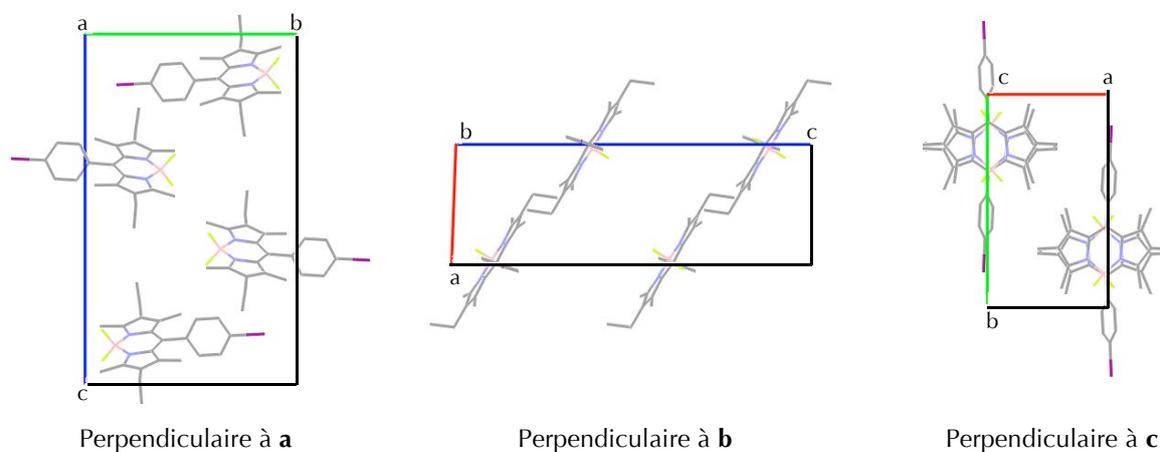
$a = 7,506 \text{ \AA}$; $b = 13,175 \text{ \AA}$; $c = 22,073 \text{ \AA}$

$\alpha = 90^\circ$; $\beta = 92,06^\circ$; $\gamma = 90^\circ$

Volume de la maille élémentaire : $2181,42 \text{ \AA}^3$

Nombre de molécules par maille élémentaire : 2

Projection de la structure selon les trois axes du réseau cristallin :



BDY-1

Groupe d'espace : $P1$

Paramètres de maille :

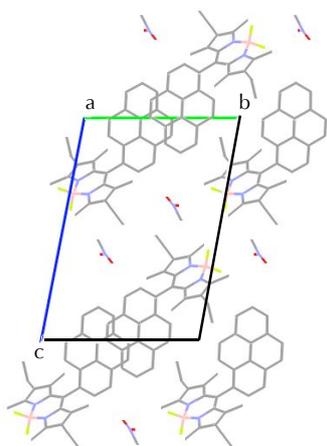
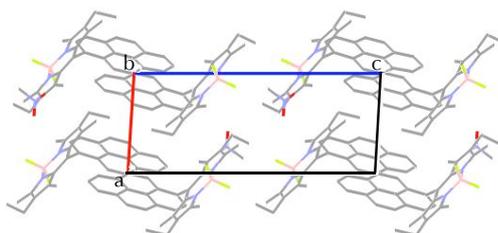
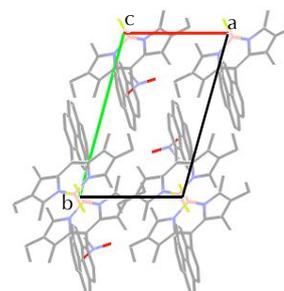
$a = 7,266 \text{ \AA}$; $b = 12,168 \text{ \AA}$; $c = 17,628 \text{ \AA}$

$\alpha = 100,33^\circ$; $\beta = 90,79^\circ$; $\gamma = 104,64^\circ$

Volume de la maille élémentaire : $1480,63 \text{ \AA}^3$

Nombre de molécules par maille élémentaire : 2

Projection de la structure selon les trois axes du réseau cristallin :

Perpendiculaire à **a**Perpendiculaire à **b**Perpendiculaire à **c**

BDY-2

Groupe d'espace : $C1\ 2/c\ 1$

Paramètres de maille :

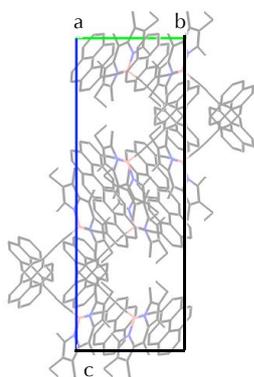
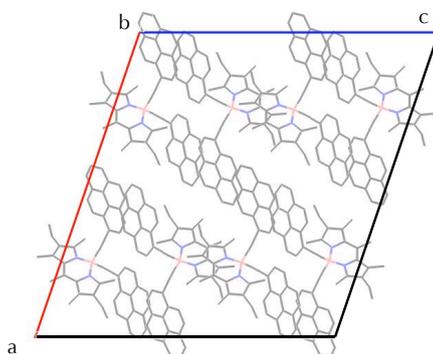
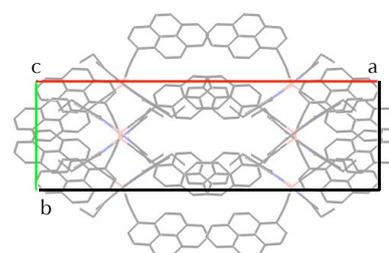
$a = 31,005\ \text{\AA}$; $b = 9,391\ \text{\AA}$; $c = 28,5\ \text{\AA}$

$\alpha = 90^\circ$; $\beta = 108,75^\circ$; $\gamma = 90^\circ$

Volume de la maille élémentaire : $7857,9\ \text{\AA}^3$

Nombre de molécules par maille élémentaire : 8

Projection de la structure selon les trois axes du réseau cristallin :

Perpendiculaire à **a**Perpendiculaire à **b**Perpendiculaire à **c**

BDY-3

Groupe d'espace : $P1$

Paramètres de maille :

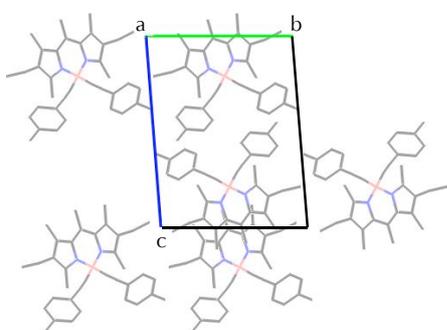
$$a = 9,267 \text{ \AA}; b = 11,443 \text{ \AA}; c = 14,650 \text{ \AA}$$

$$\alpha = 85,49^\circ; \beta = 89,08^\circ; \gamma = 76,81^\circ$$

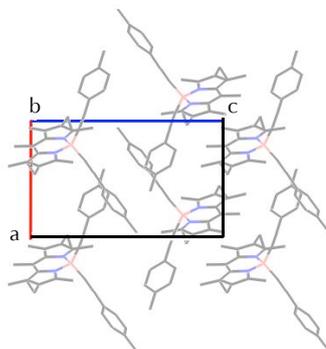
Volume de la maille élémentaire : $1507,9 \text{ \AA}^3$

Nombre de molécules par maille élémentaire : 2

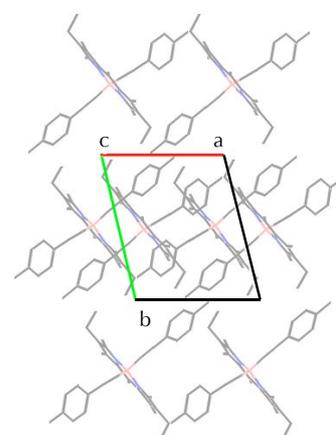
Projection de la structure selon les trois axes du réseau cristallin :



Perpendiculaire à **a**



Perpendiculaire à **b**



Perpendiculaire à **c**

BDY-4

Groupe d'espace : $P1$

Paramètres de maille :

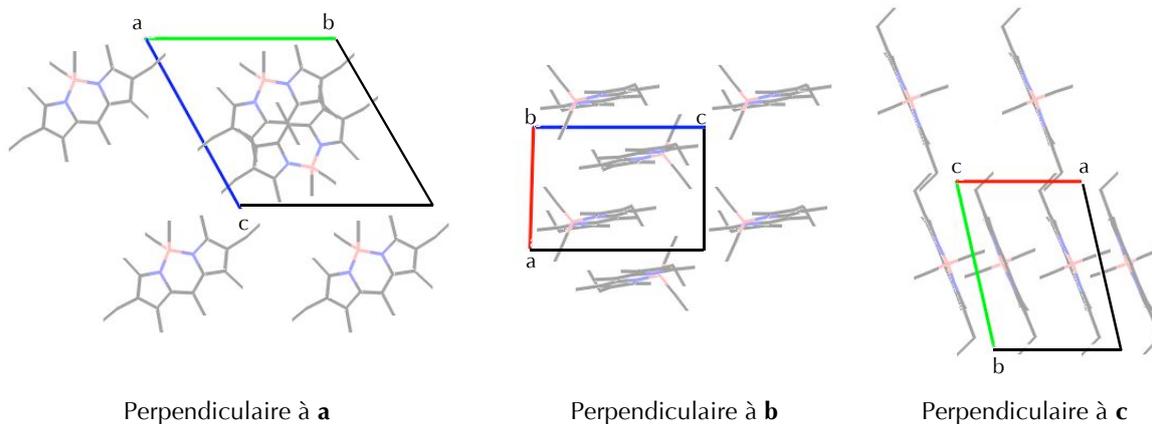
$$a = 7,702 \text{ \AA}; b = 11,950 \text{ \AA}; c = 12,067 \text{ \AA}$$

$$\alpha = 60,69^\circ; \beta = 84,75^\circ; \gamma = 76,397^\circ$$

Volume de la maille élémentaire : $940,948 \text{ \AA}^3$

Nombre de molécules par maille élémentaire : 2

Projection de la structure selon les trois axes du réseau cristallin :



BDY-5

Groupe d'espace : $C1\ 2/c\ 1$

Paramètres de maille :

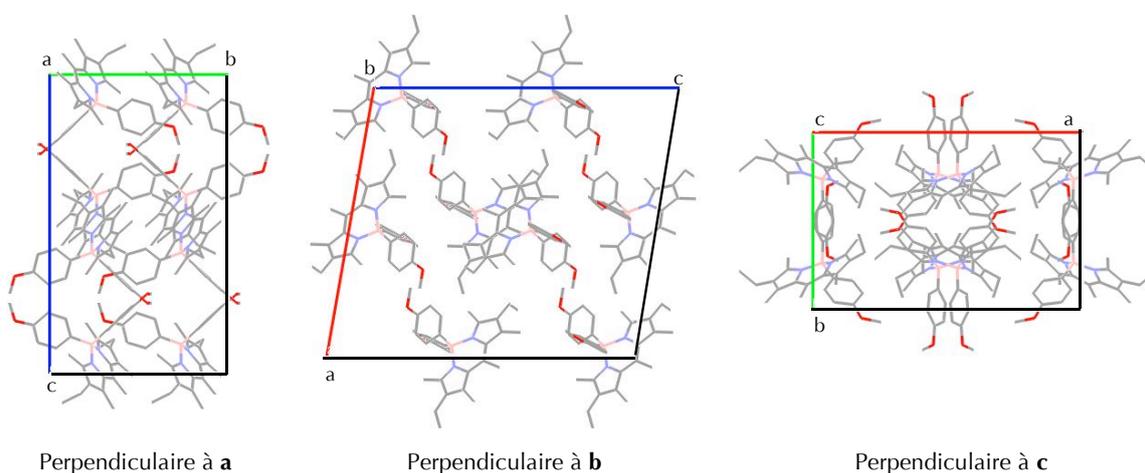
$a = 19,719\ \text{Å}$; $b = 12,854\ \text{Å}$; $c = 22,012\ \text{Å}$

$\alpha = 90^\circ$; $\beta = 99,871^\circ$; $\gamma = 90^\circ$

Volume de la maille élémentaire : $5497,17\ \text{Å}^3$

Nombre de molécules par maille élémentaire : 8

Projection de la structure selon les trois axes du réseau cristallin :



Les structures du TMB et de l'IP-BDY ont été déterminées par le Pr. Isabelle Gautier Luneau du département Matière condensée, matériaux et fonctions de l'institut Néel de Grenoble. Les données sur les molécules BDY-1 à BDY-5 proviennent de la thèse de Christine Goze [80].

Annexe C

Synthèse des nanolatex

Synthèse des NL-CI

333 mg (0,016 mol / mol de monomère) de 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone sont ajoutés à un mélange contenant 3,5 g (31,2 mmol) de styrène, 4,5 g (34,5 mmol) de divinylbenzène et 1,83 (12,0 mmol) de chlorométhylstyrène. Ce mélange est ajouté goutte à goutte à 220 g d'une solution aqueuse de DTAB à 15 % en masse. La solution est placée dans un tube de Schlenck réfrigéré et dégazée pendant 30 min avec de l'argon. Le mélange est agité pendant 24h à 20°C sous irradiation avec deux lampes blanches de 50W. La disparition complète des monomères est mise en évidence par une chromatographie sur couche mince (CCM). Une suspension translucide et légèrement bleutée est obtenue.

Fonctionnalisation

NL-pyr-0,1 5 μL de pyridine (0,06 mmol, 0,1 équiv. / Cl¹) sont introduits dans 10 g de NL-CL.

NL-pyr-0,5 23 μL de pyridine (0,29 mmol, 0,5 équiv. / Cl) sont introduits dans 10 g de NL-CL.

NL-pyr-1 46 μL de pyridine (0,57 mmol, 1 équiv. / Cl) sont introduits dans 10 g de NL-CL.

NL-pyr-2 92 μL de pyridine (1,15 mmol, 2 équiv. / Cl) sont introduits dans 10 g de NL-CL.

NL-pyr 100 μL de pyridine (1,25 mmol, 2,17 équiv. / Cl) sont introduits dans 10 g de NL-CL.

NL-tea 1g de triéthanolamine (6,70 mmol, 4,64 équiv. / Cl) sont introduits dans 25 g de NL-CL.

NL-teaeo 1,1 g de triéthanolamine éthoxylate (3,93 mmol, 3.41 équiv. / Cl) sont introduits dans 20 g de NL-CL.

NL-pba 1,67 g d'acide 3-amino-phénylboronique monohydraté (10,77 mmol, 2,35 équiv. / Cl) et deux mL de NaOH à 5 mol.L⁻¹ sont introduits dans 100 g de NL-CL.

¹ Il s'agit de la quantité de chlore initialement présente dans le mélange de monomère.

Le mélange est agité pendant plusieurs jours. Les solutions sont ensuite dialysées contre une solution de DTAB (à 15 ou 0,5 % en masse) pour éliminer les réactifs qui n'ont pas réagi.

Caractérisation des suspensions

Le pourcentage en masse de polymère de la suspension NL-CI est déterminé en dialysant la suspension contre de l'eau déionisée, ce qui fait précipiter les particules. La masse du solide sec obtenu est comparée à la masse de la solution initiale. Le pourcentage en masse des NL fonctionnalisés est estimé à partir de la variation de volume qui se produit lors de la dialyse.

L'extrait sec pour l'analyse élémentaire est préparé en précipitant le polymère avec du méthanol, ce qui permet de récupérer une quantité plus importante que par dialyse. La solution est centrifugée de manière à séparer le polymère du surnageant. Le solide est ensuite redispersé dans de l'eau desionisée, puis après environ une heure d'agitation, la solution est centrifugée et le solide est récupéré. Cette opération est répétée une dizaine de fois afin d'éliminer tout le DTAB.

La taille des particules est évaluée par diffusion quasi élastique de la lumière. Elle est de 16 nm pour les particules qui ont été utilisées pendant ma thèse.

Les pourcentages en masse avant et après la dialyse ainsi que le résultat des analyses élémentaires sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Nom	Fonction	% masse initial	% masse final	Analyse élémentaire (%)
NL-pyr-0,1	PYR	4,07	4,75	
NL-pyr-0,5	PYR	4,07	4,80	
NL-pyr-1	PYR	4,07	4,96	
NL-pyr-2	PYR	4,07	4,75	C 82,38 H 7,24 N 0,65 Cl 0,99 Br 5,37 $\Sigma = 96.63$
NL-pyr	PYR	3,9	4,8	C 82,79 H 7,21 N 0,81 Cl 0,87 Br 4,85 $\Sigma = 96.53$
NL-tea	TEA	3,9	4,3	C 80,50 H 7,34 N 0,40 Cl 1,14 Br 2,83 $\Sigma = 92.21$
NL-teaéo	TEAEO	3,9	3,6	C 84,95 H 7,52 N 0,41 Cl 1,45 Br 4,14 $\Sigma = 98.47$
NL-pba	PBA	4,0		C 85,93 H 7,53 N 0,37 Cl 1,52 Br 2,38 B 0,24 $\Sigma = 97.97$

Bibliographie

- [1] L. Prodi. Luminescent chemosensors : from molecules to nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 29(1) :20–31, 2005.
- [2] R. Méallet-Renault. *Caractérisation de billes de latex fluorescentes pour l'élaboration de nanocapteurs*. PhD thesis, ENS Cachan, 2000.
- [3] X. J. Zhao, R. Tapeç-Dytioco, and W. H. Tan. Ultrasensitive dna detection using highly fluorescent bioconjugated nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125(38) :11474–11475, 2003.
- [4] R. Méallet-Renault, R. Pansu, S. Amigoni-Gerbier, and C. Larpent. Metal-chelating nanoparticles as selective fluorescent sensor for Cu^{2+} . *Chemical Communications*, (20) :2344–2345, 2004.
- [5] V. Monnier. *Elaboration et caractérisation structurale de nanocristaux moléculaires fluorescents inclus dans des couches minces sol-gel : Application à la réalisation de capteurs chimiques et biologiques*. PhD thesis, Grenoble, 2006.
- [6] F. L. Arbeloa, J. Banuelos, V. Martinez, T. Arbeloa, and I. P. Arbeloa. Structural, photophysical and lasing properties of pyrromethene dyes. *International Reviews in Physical Chemistry*, 24(2) :339–374, 2005.
- [7] R. Ziessel, G. Ulrich, and A. Harriman. The chemistry of Bodipy : a new El Dorado for fluorescence tools. *New Journal of Chemistry*, 31(4) :496–501, 2007.
- [8] M. Pope and C.E. Swenberg. *Electronic processes in organic crystals*. Oxford University Press, 1982.
- [9] B. Valeur. *Molecular fluorescence Principles and applications*. Wiley VCH, 2001.
- [10] J.B Birks. *Photophysics of aromatic molecules*. Wiley, 1970.
- [11] J. F. Callan, A. P. de Silva, and D. C. Magri. Luminescent sensors and switches in the early 21st century. *Tetrahedron*, 61(36) :8551–8588, 2005.
- [12] L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, A. Perotti, A. Taglietti, and D. Sacchi. Fluorescent sensors for transition metals based on electron-transfer and energy-transfer mechanisms. *Chemistry-a European Journal*, 2(1) :75–82, 1996.
- [13] Y. Kanekiyo, R. Naganawa, and H. Tao. Fluorescence detection of ATP based on the ATP-mediated aggregation of pyrene-appended boronic acid on a polycation. *Chemical Communications*, (8) :1006–1007, 2004.
- [14] H. Sunahara, Y. Urano, H. Kojima, and T. Nagano. Design and Synthesis of a Library of BODIPY-Based Environmental Polarity Sensors Utilizing Photoinduced Electron-Transfer-Controlled Fluorescence ON/OFF Switching. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(17) :5597–5604, 2007.

- [15] J Fraxedas. *Molecular organic materials - From molecule to crystalline solids*. Cambridge University Press, 2006.
- [16] M. Kasha. Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates. *Radiation research*, 20 :55–71, 1963.
- [17] W.T. Simpson and D.L. Peterson. Coupling strength for resonance force transfer of electronic energy in Van der Waals solids. *Journal of Chemical Physics*, 26(3) :588–593, 1957.
- [18] M. Tramier. *Imagerie des déclins de fluorescence pour l'étude de la dynamique et des interactions de macromolécules en cellules vivantes*. PhD thesis, Université Paris 6, 2001.
- [19] J. Klafter and A. Blumen. Fractal behavior in trapping and reaction. *The Journal of Chemical Physics*, 80(2) :875–877, 1984.
- [20] A. Blumen, J. Klafter, and G. Zumofen. Influence of restricted geometries on the direct energy transfer. *The Journal of Chemical Physics*, 84(3) :1397–1401, 1986.
- [21] D. P. Millar, R. J. Robbins, and A. H. Zewail. Picosecond dynamics of electronic-energy transfer in condensed phases. *Journal of Chemical Physics*, 75(8) :3649–3659, 1981.
- [22] J.B. Birks. The photophysics of aromatic excimers. In *The exciplex*. Academic Press, 1975.
- [23] R. G. Stomphorst, G. van der Zwan, M. van Zandvoort, A. B. Sieval, H. Zuilhof, F. J. Vergeldt, and T. J. Schaafsma. Spectroscopic study of erythrosin B in PVA films. *Journal of Physical Chemistry A*, 105(17) :4235–4240, 2001.
- [24] F. D. Lewis and J. S. Yang. Solid-state fluorescence of aromatic dicarboxamides. dependence upon crystal packing. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(10) :1775–1781, 1997.
- [25] T. Forster. Energiewanderung und fluoreszenz. *Naturwissenschaften*, 33(6) :166–175, 1946.
- [26] H. Langhals, R. Ismael, and O. Yuruk. Persistent fluorescence of perylene dyes by steric inhibition of aggregation. *Tetrahedron*, 56(30) :5435–5441, 2000.
- [27] Y. Ooyama, T. Okamoto, T. Yamaguchi, T. Suzuki, A. Hayashi, and K. Yoshida. Heterocyclic quinol-type fluorophores : Synthesis, X-ray crystal structures, and solid-state photophysical properties of novel 5-hydroxy-5-substituent-benzo b naphtho 1,2-d furan-6-one and 3-hydroxy-3-substituent-benzo kl xanthen-2-one derivatives. *Chemistry-a European Journal*, 12(30) :7827–7838, 2006.
- [28] B. K. An, S. K. Kwon, S. D. Jung, and S. Y. Park. Enhanced emission and its switching in fluorescent organic nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 124(48) :14410–14415, 2002.
- [29] M. L. Ferrer and F. del Monte. Enhanced emission of Nile red fluorescent nanoparticles embedded in hybrid sol-gel glasses. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(1) :80–86, 2005.
- [30] S. Y. Li, L. M. He, F. Xiong, Y. Li, and G. Q. Yang. Enhanced fluorescent emission of organic nanoparticles of an intramolecular proton transfer compound and spontaneous formation of one-dimensional nanostructures. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(30) :10887–10892, 2004.
- [31] K. E. Sapsford, T. Pons, I. L. Medintz, and H. Mattoussi. Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. *Sensors*, 6(8) :925–953, 2006.
- [32] B. O. Dabbousi, J. Rodriguez Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, and M. G. Bawendi. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots : Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(46) :9463–9475, 1997.

- [33] W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. H. Gao, R. E. Bailey, M. Y. Han, and S. M. Nie. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(1) :40–46, 2002.
- [34] A. R. Clapp, I. L. Medintz, and H. Mattoussi. Forster resonance energy transfer investigations using quantum-dot fluorophores. *Chemphyschem*, 7(1) :47–57, 2006.
- [35] A. H. Fu, W. W. Gu, C. Larabell, and A. P. Alivisatos. Semiconductor nanocrystals for biological imaging. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(5) :568–575, 2005.
- [36] N. C. Tansil and Z. Q. Gao. Nanoparticles in biomolecular detection. *Nano Today*, 1(1) :28–37, 2006.
- [37] L. Wang and W. H. Tan. Multicolor FRET silica nanoparticles by single wavelength excitation. *Nano Letters*, 6(1) :84–88, 2006.
- [38] M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Battistini, S. Marcuz, F. Mancin, E. Rampazzo, and U. Tonellato. Size effect on the fluorescence properties of dansyl-doped silica nanoparticles. *Langmuir*, 22(13) :5877–5881, 2006.
- [39] X. J. Zhao, R. P. Bagwe, and W. H. Tan. Development of organic-dye-doped silica nanoparticles in a reverse microemulsion. *Advanced Materials*, 16(2) :173–176, 2004.
- [40] R. P. Bagwe, C. Y. Yang, L. R. Hilliard, and W. H. Tan. Optimization of dye-doped silica nanoparticles prepared using a reverse microemulsion method. *Langmuir*, 20(19) :8336–8342, 2004.
- [41] B. P. Wittmershaus, J. J. Skibicki, J. B. McLafferty, Y. Z. Zhang, and S. Swan. Spectral properties of single BODIPY dyes in polystyrene microspheres and in solutions. *Journal of Fluorescence*, 11(2) :119–128, 2001.
- [42] H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, and U. Wiesner. Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles. *Nano Letters*, 5(1) :113–117, 2005.
- [43] W. Lian, S. A. Litherland, H. Badrane, W. H. Tan, D. H. Wu, H. V. Baker, P. A. Gulig, D. V. Lim, and S. G. Jin. Ultrasensitive detection of biomolecules with fluorescent dye-doped nanoparticles. *Analytical Biochemistry*, 334(1) :135–144, 2004.
- [44] D. V. Roberts, B. P. Wittmershaus, Y. Z. Zhang, S. Swan, and M. P. Klinosky. Efficient excitation energy transfer among multiple dyes in polystyrene microspheres. *Journal of Luminescence*, 79(4) :225–231, 1998.
- [45] M. Montalti, L. Prodi, N. Zacheroni, A. Zettoni, P. Reschiglian, and G. Falini. Energy transfer in fluorescent silica nanoparticles. *Langmuir*, 20(7) :2989–2991, 2004.
- [46] M. King and R. Kopelman. Development of a hydroxyl radical ratiometric nanoprobe. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 90(1-3) :76–81, 2003.
- [47] R. Méallet-Renault, P. Denjean, and R. B. Pansu. Polymer beads as nano-sensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 59(2-3) :108–112, 1999.
- [48] R. Méallet-Renault, A. Herault, J. J. Vachon, R. B. Pansu, S. Amigoni-Gerbier, and C. Larpent. Fluorescent nanoparticles as selective cu(ii) sensors. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 5(3) :300–310, 2006.
- [49] E. Brasola, F. Mancin, E. Rampazzo, P. Tecilla, and U. Tonellato. A fluorescence nanosensor for Cu²⁺ on silica particles. *Chemical Communications*, (24) :3026–3027, 2003.

- [50] Z. X. Wang, H. X. Shao, J. C. Ye, L. Tang, and P. Lu. Dibenzosuberonylidene-ended fluorophores : Rapid and efficient synthesis, characterization, and aggregation-induced emissions. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(42) :19627–19633, 2005.
- [51] D. B. Xiao, X. Lu, W. S. Yang, H. B. Fu, Z. G. Shuai, Y. Fang, and J. N. Yao. Size-tunable emission from 1,3-diphenyl-5-(2-anthryl)-2-pyrazoline nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125(22) :6740–6745, 2003.
- [52] V. Duzhko, H. F. Shi, K. D. Singer, A. N. Semyonov, and R. J. Twieg. Controlled self-assembly of triphenylene-based molecular nanostructures. *Langmuir*, 22(19) :7947–7951, 2006.
- [53] F. Treussart, E. Botzung-Appert, N. T. Ha-Duong, A. Ibanez, J. F. Roch, and R. Pansu. Second harmonic generation and fluorescence of CMONS dye nanocrystals grown in a sol-gel thin film. *Chemphyschem*, 4(7) :757–760, 2003.
- [54] H. Y. Kim, T. G. Bjorklund, S. H. Lim, and C. J. Bardeen. Spectroscopic and photocatalytic properties of organic tetracene nanoparticles in aqueous solution. *Langmuir*, 19(9) :3941–3946, 2003.
- [55] E. Botzung-Appert, V. Monnier, T. H. Duong, R. Pansu, and A. Ibanez. Polyaromatic luminescent nanocrystals for chemical and biological sensors. *Chemistry of Materials*, 16(9) :1609–1611, 2004.
- [56] F. Debuigne, L. Jeunieu, M. Wiame, and J. B. Nagy. Synthesis of organic nanoparticles in different W/O microemulsions. *Langmuir*, 16(20) :7605–7611, 2000.
- [57] P. Kang, C. N. Chen, L. Y. Hao, C. L. Zhu, Y. Hu, and Z. Y. Chen. A novel sonication route to prepare anthracene nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, 39(4-5) :545–551, 2004.
- [58] X. J. Zhang, X. H. Zhang, W. S. Shi, X. M. Meng, C. Lee, and S. Lee. Morphology-controllable synthesis of pyrene nanostructures and its morphology dependence of optical properties. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(40) :18777–18780, 2005.
- [59] F. Bertorelle, D. Lavabre, and S. Fery-Forgues. Dendrimer-tuned formation of luminescent organic microcrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 125(20) :6244–6253, 2003.
- [60] L. Birla, F. Bertorelle, F. Rodrigues, S. Badré, R. Pansu, and S. Fery-Forgues. Effects of DNA on the growth and optical properties of luminescent organic microcrystals. *Langmuir*, 22(14) :6256–6265, 2006.
- [61] M. Abyan, L. Birla, F. Bertorelle, F. Rodrigues, and S. Fery-Forgues. Free-standing microcrystals of a fluorescent organic dye : Preparation and spectroscopic study. *International Journal of Photoenergy*, 2006.
- [62] M. Abyan, L. Birla, F. Bertorelle, and S. Fery-Forgues. Morphology control of organic luminescent microcrystals and approach of their optical properties. *Comptes Rendus Chimie*, 8(8) :1276–1281, 2005.
- [63] H. B. Fu and J. N. Yao. Size effects on the optical properties of organic nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 123(7) :1434–1439, 2001.
- [64] S. I. Dolgaev, A. V. Simakin, V. V. Voronov, G. A. Shafeev, and F. Bozon-Verduraz. Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment. *Applied Surface Science*, 186(1-4) :546–551, 2002.
- [65] Y. Tamaki, T. Asahi, and H. Masuhara. Tailoring nanoparticles of aromatic and dye molecules by excimer laser irradiation. *Applied Surface Science*, 168(1-4) :85–88, 2000.

- [66] B. Li, T. Kawakami, and M. Hiramatsu. Enhancement of organic nanoparticle preparation by laser ablation in aqueous solution using surfactants. *Applied Surface Science*, 210(3-4) :171–176, 2003.
- [67] M. C. Gutierrez, M. J. Hortiguera, M. L. Ferrer, and F. del Monte. Highly fluorescent rhodamine B nanoparticles entrapped in hybrid glasses. *Langmuir*, 23(4) :2175–2179, 2007.
- [68] F. Balzer and H. G. Rubahn. Growth control and optics of organic nanoaggregates. *Advanced Functional Materials*, 15(1) :17–24, 2005.
- [69] A. J. Gesquiere, T. Uwada, T. Asahi, H. Masuhara, and P. F. Barbara. Single molecule spectroscopy of organic dye nanoparticles. *Nano Letters*, 5(7) :1321–1325, 2005.
- [70] A. Patra, N. Hebalkar, B. Sreedhar, M. Sarkar, A. Samanta, and T. R. Radhakrishnan. Tuning the size and optical properties in molecular nano/microcrystals : Manifestation of hierarchical interactions. *Small*, 2(5) :650–659, 2006.
- [71] T. Seko, K. Ogura, Y. Kawakami, H. Sugino, H. Toyotama, and J. Tanaka. Excimer emission of anthracene, perylene, coronene and pyrene microcrystals dispersed in water. *Chemical Physics Letters*, 291(3-4) :438–444, 1998.
- [72] A. Treibs and F.H. Kreuzer. Di- and tri-pyrrylmethene complexes with di-fluoro boron. *Annalen Der Chemie-Justus Liebig*, 718 :208–223, 1968.
- [73] R.P. Haugland and H.C. Kang. Chemically reactive dipyrrometheneboron difluoride dyes. Number : US Patent number 4,774,339, 1988.
- [74] J.H. Boyer and L.R. Morgan. Lasing composition and methods for using the same. Number : US Patent number 4,916,711, 1990.
- [75] J.H. Boyer and L.R. Morgan. Indacene compounds and methods for using the same. Number : US Patent number 5,189,029, 1993.
- [76] G. Ulrich and R. Ziessel. Functional dyes : bipyridines and bipyrimidine based boradiazaindacene. *Tetrahedron Letters*, 45(9) :1949–1953, 2004.
- [77] M. Kollmannsberger, K. Rurack, U. Resch-Genger, and J. Daub. Ultrafast charge transfer in amino-substituted boron dipyrromethene dyes and its inhibition by cation complexation : A new design concept for highly sensitive fluorescent probes. *Journal of Physical Chemistry A*, 102(50) :10211–10220, 1998.
- [78] M. Dahim, N. K. Mizuno, X. M. Li, W. E. Momsen, M. M. Momsen, and H. L. Brockman. Physical and photophysical characterization of a BODIPY phosphatidylcholine as a membrane probe. *Biophysical Journal*, 83(3) :1511–1524, 2002.
- [79] A. B. Zaitsev, R. Méallet-Renault, E. Y. Schmidt, A. I. Mikhaleva, S. Badré, C. Dumas, A. M. Vasil'tsov, N. V. Zorina, and R. B. Pansu. Synthesis of 2-mesityl-3-methylpyrrole via the trofimov reaction for a new BODIPY with hindered internal rotation. *Tetrahedron*, 61(10) :2683–2688, 2005.
- [80] C. Goze. *Systèmes luminescents construits autour de l'unité pyrène : application au transfert d'énergie*. PhD thesis, Strasbourg, 2005.
- [81] G. Ulrich, C. Goze, S. Goeb, P. Retailleau, and R. Ziessel. New fluorescent aryl- or ethynylaryl-boron-substituted indacenes as promising dyes. *New Journal of Chemistry*, 30(7) :982–986, 2006.
- [82] H. Kim, A. Burghart, M. B. Welch, J. Reibenspies, and K. Burgess. Synthesis and spectroscopic properties of a new 4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) dye. *Chemical Communications*, (18) :1889–1890, 1999.

- [83] C. Tahtaoui, C. Thomas, F. Rohmer, P. Klotz, G. Duportail, Y. Mely, D. Bonnet, and M. Hibert. Convenient method to access new 4,4-dialkoxy- and 4,4-diaryloxy-diaza-s-indacene dyes : Synthesis and spectroscopic evaluation. *Journal of Organic Chemistry*, 72(1) :269–272, 2007.
- [84] E. Y. Schmidt, N. V. Zorina, A. B. Zaitsev, A. I. Mikhaleva, A. M. Vasil'tsov, P. Audebert, G. Clavier, R. Méallet-Renault, and R. B. Pansu. A selective synthesis of 2-(2,2 paracyclophan-5-yl)pyrrole from 5-acetyl 2,2 paracyclophane via the Trofimov reaction. *Tetrahedron Letters*, 45(28) :5489–5491, 2004.
- [85] S. Badré, V. Monnier, R. Méallet-Renault, C. Dumas-Verdes, E. Y. Schmidt, A. I. Mikhaleva, G. Laurent, G. Levi, A. Ibanez, B. A. Trofimov, and R. B. Pansu. Fluorescence of molecular micro- and nanocrystals prepared with Bodipy derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 183(3) :238–246, 2006. Sp. Iss. SI.
- [86] A. A. Gorman, I. Hamblett, T. A. King, and M. D. Rahn. A pulse radiolysis and pulsed laser study of the pyromethene 567 triplet state. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 130(2-3) :127–132, 2000.
- [87] L. Porres, O. Mongin, and M. Blanchard-Desce. Synthesis, fluorescence and two-photon absorption properties of multichromophoric boron-dipyrromethene fluorophores for two-photon-excited fluorescence applications. *Tetrahedron Letters*, 47(12) :1913–1917, 2006.
- [88] N. J. Meltola, R. Wahlroos, and A. E. Soini. Hydrophilic labeling reagents of dipyrromethene-BF₂ dyes for two-photon excited fluorometry : Syntheses and photophysical characterization. *Journal of Fluorescence*, 14(5) :635–647, 2004.
- [89] H. L. Kee, C. Kirmaier, L. H. Yu, P. Thamyongkit, W. J. Youngblood, M. E. Calder, L. Ramos, B. C. Noll, D. F. Bocian, W. R. Scheidt, R. R. Birge, J. S. Lindsey, and D. Holten. Structural control of the photodynamics of boron-dipyrin complexes. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(43) :20433–20443, 2005.
- [90] K. Rurack, M. Kollmannsberger, and J. Daub. Molecular switching in the near infrared (NIR) with a functionalized boron - Dipyrromethene dye. *Angewandte Chemie-International Edition*, 40(2) :385–387, 2001.
- [91] A. Coskun and E. U. Akkaya. Signal ratio amplification via modulation of resonance energy transfer : Proof of principle in an emission ratiometric Hg(II) sensor. *Journal of the American Chemical Society*, 128(45) :14474–14475, 2006.
- [92] S. Atilgan, Z. Ekmekci, A. L. Dogan, D. Guc, and E. U. Akkaya. Water soluble distyryl-boradiazaindacenes as efficient photosensitizers for photodynamic therapy. *Chemical Communications*, (42) :4398–4400, 2006.
- [93] J. Chen, A. Burghart, A. Derecskei-Kovacs, and K. Burgess. 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) dyes modified for extended conjugation and restricted bond rotations. *Journal of Organic Chemistry*, 65(10) :2900–2906, 2000.
- [94] N. Ono, T. Yamamoto, N. Shimada, K. Kuroki, M. Wada, R. Utsunomiya, T. Yano, H. Uno, and T. Murashima. A new synthesis of functional dyes from 2-acenaphtho 1,2-c pyrrole. *Heterocycles*, 61 :433–+, 2003.
- [95] Z. Shen, H. Rohr, K. Rurack, H. Uno, M. Spieles, B. Schulz, G. Reck, and N. Ono. Boron-diindomethene (BDI) dyes and their tetrahydrobicyclo precursors - en route to a new class of highly emissive fluorophores for the red spectral range. *Chemistry-a European Journal*, 10(19) :4853–4871, 2004.

- [96] W. L. Zhao and E. M. Carreira. Conformationally restricted aza-bodipy : A highly fluorescent, stable, near-infrared-absorbing dye. *Angewandte Chemie-International Edition*, 44(11) :1677–1679, 2005.
- [97] M. Baruah, W. W. Qin, N. Basaric, W. M. De Borggraeve, and N. Boens. BODIPY-based hydroxyaryl derivatives as fluorescent pH probes. *Journal of Organic Chemistry*, 70(10) :4152–4157, 2005.
- [98] Y. Gabe, Y. Urano, K. Kikuchi, H. Kojima, and T. Nagano. Highly sensitive fluorescence probes for nitric oxide based on boron dipyrromethene chromophore-rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe. *Journal of the American Chemical Society*, 126(10) :3357–3367, 2004.
- [99] J. P. Malval, I. Leray, and B. Valeur. A highly selective fluorescent molecular sensor for potassium based on a calix 4 bisazacrown bearing boron-dipyrromethene fluorophores. *New Journal of Chemistry*, 29(8) :1089–1094, 2005.
- [100] Y. J. Mei and P. A. Bentley. A ratiometric fluorescent sensor for Zn^{2+} based on internal charge transfer (ICT). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(12) :3131–3134, 2006.
- [101] S. Y. Moon, N. R. Cha, Y. H. Kim, and S. K. Chang. New Hg^{2+} -selective chromo- and fluoroionophore based upon 8-hydroxyquinoline. *Journal of Organic Chemistry*, 69(1) :181–183, 2004.
- [102] X. Qi, E. J. Jun, L. Xu, S. J. Kim, J. S. J. Hong, Y. J. Yoon, and J. Y. Yoon. New BODIPY derivatives as OFF-ON fluorescent chemosensor and fluorescent chemodosimeter for Cu^{2+} : Cooperative selectivity enhancement toward Cu^{2+} . *Journal of Organic Chemistry*, 71(7) :2881–2884, 2006.
- [103] Z. G. Li, E. Mintzer, and R. Bittman. First synthesis of free cholesterol - BODIPY conjugates. *Journal of Organic Chemistry*, 71(4) :1718–1721, 2006.
- [104] M. A. Hink, A. van Hoek, and A. Visser. Dynamics of phospholipid molecules in micelles : Characterization with fluorescence correlation spectroscopy and time-resolved fluorescence anisotropy. *Langmuir*, 15(4) :992–997, 1999.
- [105] F. Tokumasu, J. Hwang, and J. A. Dvorak. Heterogeneous molecular distribution in supported multicomponent lipid bilayers. *Langmuir*, 20(3) :614–618, 2004.
- [106] D. K. Sharma, A. Choudhury, R. D. Singh, C. L. Wheatley, D. L. Marks, and R. E. Pagano. Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9) :7564–7572, 2003.
- [107] G. Y. Ma and Q. Cheng. Manipulating FRET with polymeric vesicles : Development of a "mix-and-detect" type fluorescence sensor for bacterial toxin. *Langmuir*, 22(16) :6743–6745, 2006.
- [108] A. T. Da Poian, A. M. O. Gomes, and T. Coelho-Sampaio. Kinetics of intracellular viral disassembly and processing probed by Bodipy fluorescence dequenching. *Journal of Virological Methods*, 70(1) :45–58, 1998.
- [109] V. F. Thompson, S. Saldana, J. Y. Cong, and D. E. Goll. A BODIPY fluorescent microplate assay for measuring activity of calpains and other proteases. *Analytical Biochemistry*, 279(2) :170–178, 2000.
- [110] H. S. Hendrickson, E. K. Hendrickson, I. D. Johnson, and S. A. Farber. Intramolecularly quenched BODIPY-labeled phospholipid analogs in phospholipase A(2) and platelet-activating factor acetylhydrolase assays and in vivo fluorescence imaging. *Analytical Biochemistry*, 276(1) :27–35, 1999.
- [111] P. Jiang and A. Mellors. Membrane protein proteolysis assayed by fluorescence quenching : Assay of O-sialoglycoprotein endopeptidase. *Analytical Biochemistry*, 259(1) :8–15, 1998.

- [112] X. K. Liu and Y. Hong. Q-priming PCR : A quantitative real-time PCR system using a self-quenched BODIPY FL-labeled primer. *Analytical Biochemistry*, 360(1) :154–156, 2007.
- [113] A. Burghart, H. J. Kim, M. B. Welch, L. H. Thoresen, J. Reibenspies, K. Burgess, F. Bergstrom, and L. B. A. Johansson. 3,5-diaryl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (bodipy) dyes : Synthesis, spectroscopic, electrochemical, and structural properties. *Journal of Organic Chemistry*, 64(21) :7813–7819, 1999.
- [114] C. Goze, G. Ulrich, L. Charbonniere, M. Cesario, T. Prange, and R. Ziessel. Cation sensors based on terpyridine-functionalized boradiazaindacene. *Chemistry-a European Journal*, 9(16) :3748–3755, 2003.
- [115] R. Ziessel, C. Goze, G. Ulrich, M. Cesario, P. Retailleau, A. Harriman, and J. P. Rostron. Intramolecular energy transfer in pyrene-bodipy molecular dyads and triads. *Chemistry-a European Journal*, 11(24) :7366–7378, 2005.
- [116] G. Ulrich, C. Goze, M. Guardigli, A. Roda, and R. Ziessel. Pyromethene dialkynyl borane complexes for "cascadelle" energy transfer and protein labeling. *Angewandte Chemie-International Edition*, 44(24) :3694–3698, 2005.
- [117] R. D. Singh, Y. D. Liu, C. L. Wheatley, E. L. Holicky, A. Makino, D. L. Marks, T. Kobayashi, G. Subramaniam, R. Bittman, and R. E. Pagano. Caveolar endocytosis and microdomain association of a glycosphingolipid analog is dependent on its sphingosine stereochemistry. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41) :30660–30668, 2006.
- [118] F. Camerel, L. Bonardi, G. Ulrich, L. Charbonniere, B. Donnio, C. Bourgogne, D. Guillon, P. Retailleau, and R. Ziessel. Self-assembly of fluorescent amphipathic borondipyrromethene scaffoldings in mesophases and organogels. *Chemistry of Materials*, 18(21) :5009–5021, 2006.
- [119] F. Bergstrom, I. Mikhalyov, P. Hagglof, R. Wortmann, T. Ny, and L. B. A. Johansson. Dimers of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) with light spectroscopic applications in chemistry and biology. *Journal of the American Chemical Society*, 124(2) :196–204, 2002.
- [120] I. Mikhalyov, N. Gretskeya, F. Bergstrom, and L. B. A. Johansson. Electronic ground and excited state properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) : Dimers with application to biosciences. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4(22) :5663–5670, 2002.
- [121] D. Marushchak, S. Kalinin, I. Mikhalyov, N. Gretskeya, and L. B. A. Johansson. Pyromethene dyes (BODIPY) can form ground state homo and hetero dimers : Photophysics and spectral properties. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 65(1) :113–122, 2006.
- [122] D. Tleugabulova, Z. Zhang, and J. D. Brennan. Characterization of bodipy dimers formed in a molecularly confined environment. *Journal of Physical Chemistry B*, 106(51) :13133–13138, 2002.
- [123] N. Saki, T. Dinc, and E. U. Akkaya. Excimer emission and energy transfer in cofacial boradiazaindacene (BODIPY) dimers built on a xanthene scaffold. *Tetrahedron*, 62(11) :2721–2725, 2006.
- [124] M. vandeVen, M. Ameloot, B. Valeur, and N. Boens. Pitfalls and their remedies in time-resolved fluorescence spectroscopy and microscopy. *Journal of Fluorescence*, 15(3) :377–413, 2005.
- [125] N. Coste. *Microscopie de fluorescence résolue en temps pour l'étude de la diffusion de molécules dans la cuticule des feuilles*. PhD thesis, ENS Cachan, 1999.
- [126] K. Suhling, P. M. W. French, and D. Phillips. Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 4(1) :13–22, 2005.

- [127] S. Lévêque-Fort, M. P. Fontaine-Aupart, G. Roger, and P. Georges. Fluorescence-lifetime imaging with a multifocal two-photon microscope. *Optics Letters*, 29(24) :2884–2886, 2004.
- [128] L. Schouffet. *Photophysique et photochimie du calcium green in vitro et ex vivo*. PhD thesis, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 1997.
- [129] K. Kemnitz, L. Pfeifer, and M. R. Ainbund. Detector for multichannel spectroscopy and fluorescence lifetime imaging on the picosecond timescale. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment*, 387(1-2) :86–87, 1997.
- [130] V. Emiliani, D. Sanvitto, M. Tramier, T. Piolot, Z. Petrasek, K. Kemnitz, C. Durieux, and M. Coppey-Moisan. Low-intensity two-dimensional imaging of fluorescence lifetimes in living cells. *Applied Physics Letters*, 83(12) :2471–2473, 2003.
- [131] J-A. Spitz. *Etude et imagerie de la polymérisation de l'actine*. PhD thesis, ENS Cachan, 2006.
- [132] J-A. Spitz, R. Yasukuni, N. Sandeau, M. Takano, J-J. Vachon, R. Méallet-Renault, and R.B. Pansu. Wide-field single photon counting device for fluorescence intensity, lifetime and time-resolved anisotropy imaging microscopy. *Journal of microscopy*, *Accepté*, 2007.
- [133] J-A. Spitz, V. Polard, A. Maksimenko, F. Subra, C. Baratti-Elbaz, R. Méallet-Renault, R. B. Pansu, P. Tauc, and C. Auclair. Assessment of cellular actin dynamics by measurement of fluorescence anisotropy. *Analytical Biochemistry*, 367(1) :95–103, 2007.
- [134] G. Laurent, N.T. Ha-Duong, R. Méallet-Renault, and R.B. Pansu. Effect of size and light power on the fluorescence yield of rubrene nanocrystals. In *Nanophotonics : Integrating Photochemistry, Optics, and Nano/Bio Materials Studies*. Elsevier, 2004.
- [135] K.A. Levenberg. A method for the solution of certain problems in least squares. *Quarterly of applied mathematics*, 2 :164–168, 1944.
- [136] J. Baumann and M. D. Fayer. Excitation transfer in disordered two-dimensional and anisotropic 3-dimensional systems - effects of spatial geometry on time-resolved observables. *Journal of Chemical Physics*, 85(7) :4087–4107, 1986.
- [137] S. Bernacchi and Y. Mely. Exciton interaction in molecular beacons : a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure. *Nucleic Acids Research*, 29(13) :e62, 2001.
- [138] M. Van der Auweraer and I. Scheblykin. One-dimensional j-aggregates : Dependence of the properties of the exciton band on the model of the intermolecular coupling. *Chemical Physics*, 275(1-3) :285–306, 2002.
- [139] Y. Sonoda, M. Goto, S. Tsuzuki, and N. Tamaoki. Fluorescence spectroscopic properties and crystal structure of a series of donor - acceptor diphenylpolyenes. *Journal of Physical Chemistry A*, 110(50) :13379–13387, 2006.
- [140] J. Yang, R. S. Roller, and M. A. Winnik. Energy migration study of random immobile anthracene derivatives by time-resolved fluorescence anisotropy decays. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(24) :11739–11745, 2006.
- [141] M. Berberan-Santos. On the distribution of the nearest neighbor. *American Journal of Physics*, 54(12) :1139–1141, 1986.
- [142] S. Badré. *Etude de nouvelles molécules fluorescentes pour la mise au point de nanocapteurs*. Master's thesis, Université Paris - Sud, 2004.

- [143] A. Bergmann, W. Holzer, R. Stark, H. Gratz, A. Penzkofer, F. Amat-Guerri, A. Costela, I. Garcia-Moreno, and R. Sastre. Photophysical characterization of pyrromethene dyes in solid matrices of acrylic copolymers. *Chemical Physics*, 271(1-2) :201–213, 2001.
- [144] T. Susdorf, D. Del Agua, A. Tyagi, A. Penzkofer, O. Garcia, R. Sastre, A. Costela, and I. Garcia-Moreno. Photophysical characterization of pyrromethene 597 laser dye in silicon-containing organic matrices. *Applied Physics B-Lasers and Optics*, 86(3) :537–545, 2007.
- [145] W. Holzer, H. Gratz, T. Schmitt, A. Penzkofer, A. Costela, I. Garcia-Moreno, R. Sastre, and F. J. Duarte. Photophysical characterization of rhodamine 6G in a 2-hydroxyethyl-methacrylate methyl-methacrylate copolymer. *Chemical Physics*, 256(1) :125–136, 2000.
- [146] J. B. Prieto, F. L. Arbeloa, V. M. Martinez, T. A. Lopez, and I. L. Arbeloa. Photophysical properties of the pyrromethene 597 dye : Solvent effect. *Journal of Physical Chemistry A*, 108(26) :5503–5508, 2004.
- [147] P. Bojarski, A. Kaminska, L. Kulak, and M. Sadownik. Excitation energy migration in uniaxially oriented polymer films. *Chemical Physics Letters*, 375(5-6) :547–552, 2003.
- [148] S. H. Lee, J. Kumar, and S. K. Tripathy. Thin film optical sensors employing polyelectrolyte assembly. *Langmuir*, 16(26) :10482–10489, 2000.
- [149] Y. C. Liang, A. S. Dvornikov, and P. M. Rentzepis. A novel non-destructible readout molecular memory. *Optics Communications*, 223(1-3) :61–66, 2003.
- [150] M. Giraud. *Nouveaux diaryléthènes photochromes et Photocommutation des propriétés optiques et magnétiques à l'échelle moléculaire*. PhD thesis, Université Paris - Sud, UFR Scientifique d'Orsay, 2005.
- [151] F. M. Raymo and M. Tomasulo. Electron and energy transfer modulation with photochromic switches. *Chemical Society Reviews*, 34(4) :327–336, 2005.
- [152] T. A. Golovkova, D. V. Kozlov, and D. C. Neckers. Synthesis and properties of novel fluorescent switches. *Journal of Organic Chemistry*, 70(14) :5545–5549, 2005.
- [153] S. Murase, M. Teramoto, H. Furukawa, Y. Miyashita, and K. Horie. Photochemically induced fluorescence control with intermolecular energy transfer from a fluorescent dye to a photochromic diarylethene in a polymer film. *Macromolecules*, 36(4) :964–966, 2003.
- [154] J. Gonzales. Synthèse et caractérisation de nanomatériaux organiques pour la commutation optique. Master's thesis, Université Paris - Sud ENS Cachan, 2006.
- [155] M. Four. Synthèse et propriétés des éléments d'assemblages moléculaires : vers la photocommutation amplifiée. Master's thesis, Université Paris - Sud ENS Cachan, 2007.
- [156] Molecular Probes. Working with fluospheres fluorescent microspheres. Product information, Molecular Probes, 2004.
- [157] C. Pichot. Surface-functionalized latexes for biotechnological applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9(3-4) :213–221, 2004.
- [158] Bangs Laboratories. Fluorescent / dyed microspheres. Technote, Bangs Laboratories, 2003.
- [159] T. Ihara, S. Tanaka, Y. Chikaura, and A. Jyo. Preparation of DNA-modified nanoparticles and preliminary study for colorimetric SNP analysis using their selective aggregations. *Nucleic Acids Research*, 32(12), 2004.

- [160] J. R. Taylor, M. M. Fang, and S. M. Nie. Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 72(9) :1979–1986, 2000.
- [161] Molecular Probes. Fluospheres fluorescent microspheres. Product information, Molecular Probes, 2005.
- [162] W. J. Yang, D. Trau, R. Renneberg, N. T. Yu, and F. Caruso. Layer-by-layer construction of novel bifunctional fluorescent microparticles for immunoassay applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 234(2) :356–362, 2001.
- [163] R. Wilson, A. R. Cossins, and D. G. Spiller. Encoded microcarriers for high-throughput multiplexed detection. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45(37) :6104–6117, 2006.
- [164] Molecular Probes. Transfluospheres fluorescent microspheres. Product information, Molecular Probes, 2005.
- [165] W.K. Purves, G. Horiens, and H.C. Heller. *Le monde du vivant, traité de biologie*. Flammarion Médecine - Sciences, 1992.
- [166] Molecular Probes. ATP Determination Kit (A22066) . Product information, Molecular Probes, 2005.
- [167] A. Ishida, T. Yoshikawa, and T. Kamidate. Firefly bioluminescence assay of ATP using diethylaminoethyl-dextran as an enhancer in the presence of sodium chloride and ATP extranctant. *Analytical Biochemistry*, 316(1) :127–130, 2003.
- [168] Z. Q. Wang, P. G. Haydon, and E. S. Yeung. Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Analytical Chemistry*, 72(9) :2001–2007, 2000.
- [169] E. Llaudet, S. Hatz, M. Droniou, and N. Dale. Microelectrode biosensor for real-time measurement of ATP in biological tissue. *Analytical Chemistry*, 77(10) :3267–3273, 2005.
- [170] P. E. Michel, S. M. Gautier-Sauvigne, and L. J. Blum. Luciferin incorporation in the structure of acrylic microspheres with subsequent confinement in a polymeric film : A new method to develop a controlled release-based biosensor for ATP, ADP and AMP. *Talanta*, 47(1) :169–181, 1998.
- [171] J. A. Cruz-Aguado, Y. Chen, Z. Zhang, N. H. Elowe, M. A. Brook, and J. D. Brennan. Ultrasensitive ATP detection using firefly luciferase entrapped in sugar-modified sol-gel-derived silica. *Journal of the American Chemical Society*, 126(22) :6878–6879, 2004.
- [172] Z. Kejik, K. Zaruba, D. Michalik, J. Sebek, J. Dian, S. Pataridis, K. Volka, and V. Kral. Optical sensing system for ATP using porphyrin-alkaloid conjugates. *Chemical Communications*, (14) :1533–1535, 2006.
- [173] C. Li, M. Numata, M. Takeuchi, and S. Shinkai. A sensitive colorimetric and fluorescent probe based on a polythiophene derivative for the detection of ATP. *Angewandte Chemie-International Edition*, 44(39) :6371–6374, 2005.
- [174] S. E. Schneider, S. N. O’Neil, and E. V. Anslyn. Coupling rational design with libraries leads to the production of an ATP selective chemosensor. *Journal of the American Chemical Society*, 122(3) :542–543, 2000.
- [175] S. C. McCleskey, M. J. Griffin, S. E. Schneider, J. T. McDevitt, and E. V. Anslyn. Differential receptors create patterns diagnostic for ATP and GTP. *Journal of the American Chemical Society*, 125(5) :1114–1115, 2003.
- [176] A. Denizli and E. Piskin. Dye-ligand affinity systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1-3) :391–416, 2001.

- [177] G. Alberghina, R. Bianchini, M. Fichera, and S. Fisichella. Dimerization of Cibacron Blue F3GA and other dyes : influence of salts and temperature. *Dyes and Pigments*, 46(3) :129–137, 2000.
- [178] R. N. Puri and R. Roskoski. Inactivation of Yeast Hexokinase by Cibacron-Blue-3GA - Spectral, Kinetic and Structural Investigations. *Biochemical Journal*, 300 :91–97, 1994. Part 1.
- [179] M. M. Federici, P. B. Chock, and E. R. Stadtman. Interaction of Cibacron Blue F3GA with Glutamine-Synthetase - Use of the Dye as a Conformational Probe .1. Studies Using Unfractionated Dye Samples. *Biochemistry*, 24(3) :647–660, 1985.
- [180] *Sigma-Aldrich handbook of dyes*. -, 1992.
- [181] S. Subramanian. Spectral Changes Induced in Cibacron Blue F3GA by Salts, Organic-Solvents, and Polypeptides - Implications for Blue-Dye Interaction with Proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 216(1) :116–125, 1982.
- [182] J. Hubble, A. G. Mayes, and R. Eisenthal. Spectral-analysis of interactions between proteins and dye ligands. *Analytica Chimica Acta*, 279(1) :167–177, 1993.
- [183] I. Capek. Radical polymerization of polar unsaturated monomers in direct microemulsion systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 80(2) :85–149, 1999. Times Cited : 40.
- [184] F. M. Pavel. Microemulsion polymerization. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 25(1) :1–16, 2004. Times Cited : 8.
- [185] X. J. Xu and L. M. Gan. Recent advances in the synthesis of nanoparticles of polymer latexes with high polymer-to-surfactant ratios by microemulsion polymerization. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10(5-6) :239–244, 2005. Times Cited : 2.
- [186] C. Larpent. In *Surfactant Science series, vol 115 colloidal polymers*. Marcel Dekker, 2003.
- [187] C. Cannizzo. *Nanoparticules polymériques à fonctionnalités contrôlées. Méthodologies de synthèse et utilisation comme supports et briques élémentaires. Exemples d'applications dans le domaine des capteurs, des matériaux hybrides et de l'optique non linéaire*. PhD thesis, Université Versailles Saint-Quentin en Yvelynes, 2005.
- [188] C. Larpent, E. Bernard, J. Richard, and S. Vaslin. Synthesis of functionalized nanoparticles via copolymerization in microemulsions and surface reactions. *Reactive and Functional Polymers*, 33(1) :49–59, 1997.
- [189] S. Amigoni-Gerbier, S. Desert, T. Gulik-Kryswicki, and C. Larpent. Ultrafine selective metal-complexing nanoparticles : Synthesis by microemulsion copolymerization, binding capacity, and ligand accessibility. *Macromolecules*, 35(5) :1644–1650, 2002.
- [190] C. Larpent, S. Amigoni-Gerbier, and A. P. D. Delgado. Synthesis of metal-complexing nanoparticles by post-functionalisation of reactive nanolatexes produced by microemulsion polymerisation. *Comptes Rendus Chimie*, 6(11-12) :1275–1283, 2003.
- [191] M. Antonietti, R. Basten, and S. Lohmann. Polymerization in microemulsions - a new approach to ultrafine, highly functionalized polymer dispersions. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 196(2) :441–466, 1995.
- [192] C. Cannizzo, S. Amigoni-Gerbier, and C. Larpent. Boronic acid-functionalized nanoparticles : synthesis by microemulsion polymerization and application as a re-usable optical nanosensor for carbohydrates. *Polymer*, 46(4) :1269–1276, 2005.

- [193] C. Cannizzo, C. R. Mayer, F. Secheresse, and C. Larpent. Covalent hybrid materials based on nanolatex particles and Dawson polyoxometalates. *Advanced Materials*, 17(23) :2888–2892, 2005.
- [194] C. Larpent, C. Genies, A. P. D. Delgado, A. M. Caminade, J. P. Majoral, J. F. Sassic, and F. Leising. Giant dendrimer-like particles from nanolatexes. *Chemical Communications*, (16) :1816–1817, 2004.
- [195] J. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, 1992.
- [196] T. Schuster. Fluorescent nanoparticles and their use as specific sensors for metal ions. Master's thesis, Université Versailles Saint-Quentin en Yvelynes, 2006.
- [197] A. Yekta, M.A. Winnik, J.P.S. Farinha, and J.M.G. Martinho. Dipole-dipole electronic energy transfer. fluorescence decay functions for arbitrary distributions of donors and acceptors. ii. systems with spherical symmetry. *J. Phys. Chem. A*, 101(10) :1787–1792, 1997.
- [198] L. Y. Wang, L. Wang, L. Dong, G. R. Bian, T. T. Xia, and H. Q. Chen. Direct fluorimetric determination of gamma-globulin in human serum with organic nanoparticle biosensor. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(1-2) :129–133, 2005.

Résumé

La fluorescence d'assemblées de dérivés de Bodipy a été étudiée afin de réaliser des nanocapteurs. Les nanoobjets envisagés sont soit des nanocristaux soit des particules de polystyrène en suspension dans l'eau, i.e. des nanolatex.

Dans un premier temps, des molécules encombrées ont été synthétisées afin de limiter les interactions entre fluorophores à l'état solide. Les résultats obtenus à l'état amorphe montrent que cette stratégie est prometteuse. Les propriétés de fluorescence de cryptobodipy ont aussi été étudiées. L'étude des structures cristallographiques de certaines de ces molécules a permis de mieux comprendre la fluorescence à l'état solide des Bodipy. Enfin, pour l'iodophénylbodipy, la formation d'agrégats de type J dans le solide a été démontrée et il est possible de préparer des nanoparticules fluorescentes à partir de cette molécule.

La fluorescence de certains Bodipy en matrice polymère a aussi été étudiée. La fluorescence de films de PMMA contenant du PM597 a pu être modulée par transfert d'énergie vers une molécule photochrome. D'autre part, la fluorescence de nanolatex contenant du trimésitylbodipy a été éteinte de manière très efficace par du bleu de cibacron, ce qui montre l'intérêt de développer des nanocapteurs à partir de ces particules.

Mots clés : Bodipy, imagerie de fluorescence, fluorescence à l'état solide, transfert d'énergie, nanoobjets.

Abstract

The fluorescence properties of assemblies of Bodipy derivatives were studied in order to develop nanosensors. The nanoparticles can be either nanocrystals or aqueous suspension of polymer beads, i.e. nanolatex.

Molecules with bulky substituents have been synthesized in order to limit interactions between fluorophores in the solid. Studies of amorphous films have proven the validity of this strategy. Cryptobodipys have also been studied. For five molecules, a relationship between the crystallographic structure and the fluorescence in the solid state could be established. Regarding Iodophenylbodipy, the formation of J-type aggregates in the solid has been demonstrated and fluorescent nanoparticles have been prepared with this molecule.

The fluorescence of Bodipys embedded in polymer matrix was also studied. Modulation of the fluorescence of PMMA films containing PM597 by energy transfer to a photochromic molecule was evidenced. Fluorescence quenching of nanolatex doped with trimesitylbodipy by cibacron blue is possible. This results shows that nanosensors made with those particles could be developed.

Keywords : Bodipy, fluorescence imaging, solid state fluorescence, energy transfer, nanoparticles.