



HAL
open science

Caractérisation de billes de latex fluorescentes pour l'élaboration de nanocapteurs

Rachel Méallet-Renault

► **To cite this version:**

Rachel Méallet-Renault. Caractérisation de billes de latex fluorescentes pour l'élaboration de nanocapteurs. Chimie. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2000. Français. NNT: . tel-00371478

HAL Id: tel-00371478

<https://theses.hal.science/tel-00371478>

Submitted on 27 Mar 2009

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.

Thèse de doctorat

Présentée par

Rachel Méallet-Renault

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan

Spécialité : chimie-physique

Caractérisation de billes de latex fluorescentes pour l'élaboration
de nanocapteurs

Date de soutenance : 20 mars 2000

Président de jury : Pr. J. Faure

Rapporteur : Pr. F. De Schryver

Rapporteur : Dr. T. Gustavsson

Examineurs : Pr. H. Masuhara

Pr. J. Delaire

Dr. R.B. Pansu

P.P.S.M. Laboratoire de Photophysique et Photochimie Supra- et Macromoléculaires, ENS Cachan,

61 avenue du Président Wilson 94235 Cachan cedex

I. INTRODUCTION : SONDER NOTRE ENVIRONNEMENT	8
I.1. Enjeux et Objectifs	10
I.2. Position de la problématique ; présentation du système	13
I.2.1. Préambule	13
I.2.2. Conception du système	15
I.3. Développements et stratégie	17
II. PRESENTATION, CARACTERISTIQUES ET PROPRIETES DES BILLES FLUORESCENTES	19
II.1. Nature des billes	20
II.1.1 Présentation générale.	20
II.1.2 Fluospheres [®] Sulfate et Fluospheres [®] « modifiées par des carboxylates » (Carboxylate-modified Fluospheres [®])	21
II.2. Nature du fluorophore.	24
II.2.1. Les bora-diaza-indacènes dans la littérature.	24
II.2.2. Informations communiquées par Molecular Probes sur le BODIPY TM « Orange »	28
II.2.3. Dissolution des billes dans le toluène : quelques données expérimentales sur le fluorophore en solution	30
II.2.3.1. Spectroscopies d'absorption et de fluorescence stationnaire	30
II.2.3.2. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps	34
II.2.4 Conclusions	35
II.3. Propriétés photophysiques des « Fluospheres[®] Orange »	36
II.3.1. Spectroscopie d'absorption	36
II.3.1.1. Latex en suspension aqueuse	36
II.3.1.2. Influence du pH et de la force ionique	40
II.3.2. Spectroscopie de fluorescence stationnaire	41
II.3.2.1 Latex en suspension aqueuse	41
II.3.2.2. Effet du pH et de la force ionique	44

II.3.3. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps	45
II.3.3.1. Latex en suspension aqueuse	45
II.3.3.2. Influence du pH et de la force ionique	52
II.3.4. Anisotropie de fluorescence	53
II.3.4.1. Anisotropie d'excitation stationnaire	53
II.3.4.2. Anisotropie d'émission stationnaire	53
II.3.4.2. Déclins d'anisotropie de fluorescence	56
II.4. Conclusion	58
III. ADSORPTION DE BLEU DE METHYLENE : EFFETS SUR LES PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES DES BILLES DE LATEX ORANGE.	60
III.1 Le Bleu de Méthylène : « sonde modèle ».	61
III.2. Etude de l'adsorption du Bleu de Méthylène sur les billes de 100 nm de diamètre.	63
III.2.1. Adsorption du Bleu de Méthylène sur les billes « Orange 100 carboxylate »	64
III.2.2. Adsorption du Bleu de Méthylène sur les billes « Orange 100 sulfate »	66
III.2.3. Discussions.	67
III.2.3.1. Mode d'adsorption	67
III.2.3.2. Etat du BM adsorbé	68
III.2.3.3. Extrapolation des données de l'adsorption aux billes de plus petite taille	70
III.2.4. Conclusions	72
III.3. Effet de l'ajout de BM sur propriétés des billes de latex Orange : spectroscopie de fluorescence stationnaire	72
III.3.1 Résultats expérimentaux	72
III.3.1.1. Billes « Orange 100 sulfate »	72
III.3.1.2. Billes « Orange 100 carboxylate »	75
III.3.1.3. Billes « Orange 40 carboxylate »	78
III.3.1.4. Billes « Orange 20 carboxylate »	82
III.3.2. De l'existence du transfert d'énergie des billes vers le BM	84
III.3.3. Bilan et conclusions	86
III.4. Effet de l'ajout de BM sur les propriétés des billes de latex Orange : spectroscopie de fluorescence résolue en temps.	90

III.4.1 Résultats expérimentaux	90
III.4.1.1. Billes « Orange 100 sulfate »	90
III.4.1.2. Billes « Orange 100 carboxylate »	96
III.4.1.3. Billes « Orange 40 carboxylate »	100
III.4.1.4. Billes « Orange 20 carboxylate »	104
III.4.2 Bilan et Conclusions	108
III.5. Essai de décoloration du BM : effet sur les propriétés de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate »	111
III.5.1 Spectroscopie d'absorption : décoloration du Bleu de Méthylène.	111
III.5.2. Spectroscopie d'émission de fluorescence stationnaire.	113
III.5.3. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps.	115
III.5.4 Conclusions	115
III.6 Conclusion Générale	116
IV. ETUDE DE BILLES DE 100 NM IMMOBILISEES DANS DES FILMS DE POLY(VINYL ALCOOL).	116
IV.1. Latex « Orange 100 sulfate »	117
IV.1.1. Comparaison des propriétés spectroscopiques des billes dans l'eau et dans des solutions de PVA	117
IV.1.1.1. Spectroscopies d'absorption et d'émission de fluorescence stationnaire	117
IV.1.1.2. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps	119
IV.1.2. Etude des billes immobilisées dans des films	120
IV.1.2.1 Etude de la dispersion des billes dans les films	121
IV.1.2.2. Etude de la fluorescence résolue en temps de billes par microscopie confocale ; excitation à 450 nm	124
IV.1.2.2.A Microspectroscopie de fluorescence : analyse des déclins de billes « Orange 100 sulfate »	124
IV.1.2.2.B Microspectroscopie de fluorescence : effet de l'ajout de Bleu de Méthylène	126
IV.1.2.3. Etude de la fluorescence résolue en temps par microscopie confocale des billes immobilisées dans des films de PVA; excitation à 495 nm	128
IV.1.2.3.A Microspectroscopie de fluorescence : analyse des déclins de billes « Orange 100 sulfate »	128
IV.1.2.3.B Microspectroscopie de fluorescence : effet de l'ajout de Bleu de Méthylène	130
IV.1.2.4. Observations de billes individuelles avec un détecteur-imageur résolu en temps.	133

IV.2. Latex « Orange 100 carboxylate »	137
IV.2.1. Comparaison des propriétés spectroscopiques des billes dans l'eau et dans des solutions de PVA.	138
IV.2.1.1. Spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire	138
IV.2.1.2. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps	139
IV.2.2. Etude par microscopie confocale des billes immobilisées dans des films de PVA ; excitation à 495 nm	141
IV.2.2.1. Microspectroscopie de fluorescence : analyse des déclinés de billes « Orange 100 carboxylate »	141
IV.2.2.2. Microspectroscopie de fluorescence : effet de l'ajout de Bleu de Méthylène	142
IV.3. Conclusions	144

V. ELABORATION ET ETUDES PRELIMINAIRES DE QUELQUES NANO-CAPTEURS.

V.1. Essais d'élaboration de « Capteur Redox » : Interaction du Cytochrome C et des latex « Orange 40 carboxylate »	146
V.1.1. Présentation succincte du Cytochrome C	146
V.1.2. Effet de l'adsorption du Cytochrome C sur l'émission de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate »	Erreur ! Signet non défini.
V.1.3. Effet de l'adsorption du Cytochrome C sur le déclin de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate »	154
V.2. Capteurs de métaux lourds : interaction de la TMPyP avec les latex « Orange 40 carboxylate ».	160
V.2.1. Problématique et présentation d'une porphyrine hydrosoluble pour la détection de métaux lourds.	160
V.2.2. Etude en solution de la complexation de la TMPyP par des sels de métaux lourds.	161
V.2.2.1. Etude de la complexation de la TMPyP par les ions cadmium (II)	162
V.2.2.1.A. Spectroscopie d'absorption.	162
V.2.2.1.B. Spectroscopie d'émission de fluorescence stationnaire.	164
V.2.2.1.C. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps.	165
V.2.2.2. Etude de la complexation de la TMPyP par les ions plomb(II)	167
V.2.2.2.A. Spectroscopie d'absorption.	167
V.2.2.2.B. Spectroscopie d'émission de fluorescence stationnaire.	168
V.2.2.2.C. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps.	168
V.2.2.3. Etude de la complexation de la TMPyP par les ions mercure (II)	169

V.2.2.3.A. Spectroscopie d'absorption	169
V.2.2.3.B. Spectroscopie d'émission de fluorescence stationnaire.	171
V.2.2.3.C. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps.	172
V.2.2.4. Conclusions sur les études en solution.	174
V.2.3. Effets de l'adsorption de la TMPyP sur les latex « Orange 40 carboxylate » ; étude de la complexation par des sels de métaux lourds.	175
V.2.3.1. Adsorption de TMPyP à la surface de latex.	176
V.2.3.1.A. Spectroscopie d'absorption	176
V.2.3.1.B. Effet de l'ajout de TMPyP sur les propriétés d'émission de fluorescence stationnaire des billes.	182
V.2.3.1.C. Effet de l'ajout de TMPyP sur les déclin de fluorescence des billes.	187
V.2.3.2. Ajout d'ions métalliques.	190
V.2.3.2.A. Ajout d'ions Cadmium(II)	190
V.2.3.2.B. Ajout d'ions Plomb(II)	193
V.2.3.2.C. Ajout d'ions Mercure(II)	195
V.2.4. Conclusions	197
V.3. Synthèse, bilan	197
VI. CONCLUSION	198
Bilan de notre approche	198
Perspectives	200
ANNEXE A : PARTIE EXPERIMENTALE	201
Spectroscopies d'absorption et de fluorescence stationnaire	201
Dissolution des billes de latex dans du toluène.	201
Mesure du rendement quantique de fluorescence du fluorophore dans le toluène, et dans la matrice polymérique.	202
Préparation des solutions tampons	203
Préparation des échantillons de latex, des solutions de BM.	203
Préparation des solutions de porphyrine et de Cytochrome C.	203
Expériences d'ultrafiltration sur les billes « Orange 40 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate »	203

Préparation des films de PVA	204
ANNEXE B : MONTAGE DE SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE RESOLUE EN TEMPS ; LABORATOIRE P.P.S.M., ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN.	205
ANNEXE C : MONTAGE DE MICROSCOPIE CONFOCALE ; LABORATOIRE DU PROFESSEUR H. MASUHARA, DEPARTEMENT DE PHYSIQUE APPLIQUEE, UNIVERSITE D'OSAKA, JAPON.	209
ANNEXE D : IMAGERIE POUR ETUDIER LES FILMS DE PVA.	211
Microscope à Force Atomique (A.F.M.) ; Laboratoire du Professeur Masuhara, Département de Physique Appliquée, Université d'Osaka, Japon	211
Microscope à épifluorescence ; Centre de Recherche I.B.M. Zürich, Suisse	211
Microscope Optique à Fond Noir ; Centre de Recherche I.B.M. Zürich, Suisse	211
Détecteur imageur (QUAD), PPSM, Cachan	211
ANNEXE E : TRAITEMENTS MATHÉMATIQUES	213
Analyse des déclinés de fluorescence	213
Méthode de décomposition en Composantes Principales et Connues (Chimimétrie)	213
Méthode de dosage spectrophotométrique : calcul de la constante d'équilibre.	214
ANNEXE F : QUELQUES NOTIONS PLUS THEORIQUES SUR LE TRANSFERT D'ENERGIE ET LA MODELISATION EN MILIEU POLYMERE.	216
* Du transfert d'énergie	216
* Du modèle de Förster	217
* Polymères et transfert d'énergie	220
ANNEXE G : ISOTHERMES DE LANGMUIR 140	223
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	226

I.

INTRODUCTION : SONDER NOTRE ENVIRONNEMENT

Une tendance de la chimie analytique ces dernières années est de contrôler et de mesurer en temps réel des données de notre environnement. Ceci concerne plus particulièrement les phénomènes liés à la pollution, la santé ou la sécurité. De nombreuses équipes cherchent ainsi à développer des capteurs possédant une sensibilité et une sélectivité optimales pour des applications allant de la biologie cellulaire à la chimie analytique. Ces capteurs doivent répondre à certaines exigences : miniaturisation, transport facile, systèmes polyvalents (détection simultanée de plusieurs paramètres), réponse rapide, reproductibilité, faible coût. Un système « intelligent » qu'il est plaisant d'imaginer est une carte ou boîtier où seraient intégrés des capteurs chimiques et biochimiques : nous pourrions avoir en temps réel un bilan de notre état général de santé. Un système capillaire de détection d'électrolytes dans le sang a déjà été élaboré.¹ De même le contrôle qualité de l'eau pourrait être fait à partir de systèmes intégrant à la fois la détection de métaux lourds, de bactéries et molécules organiques polluantes.

L'imagination reste sans limite, cependant les contingences de la chimie, de la physique, de l'électronique limitent les investigations. Quels sont alors les types de capteurs disponibles ?

Nous pouvons classer les capteurs en plusieurs catégories suivant leurs principes de fonctionnement² :

- les **capteurs physiques** : sensibles à des paramètres physiques comme la température, la pression, le champ électromagnétique,
- les **capteurs chimiques** ou **biologiques** dont la réponse dépend d'une réaction à un analyte ou molécule spécifique.

Intéressons-nous plus particulièrement aux capteurs chimiques. Ils peuvent être répertoriés selon le type de transduction² :

- **Capteur électrochimique** : cette catégorie englobe les capteurs potentiométriques comme les électrodes sélectives à ions, et les capteurs ampérométriques tels les capteurs de gaz à base d'électrolyte solide. Les capteurs à base de semi-conducteurs (transistors à effet de champ sélectifs d'ions) peuvent par extrapolation être classés dans cette catégorie, bien que la réponse ne soit pas de nature électrochimique mais concerne la conductivité électrique du matériau.
- **Capteur sensible à la masse** : il s'agit de capteurs utilisant l'effet piézo-électrique. Le principe repose sur le changement de fréquence d'oscillation avec le changement de masse à la surface d'un cristal oscillant.

- **Capteur sensible à la chaleur** : il s'agit de capteurs « calorimétriques ». Ils utilisent un thermocouple pour mesurer la chaleur d'une réaction mettant en jeu l'analyte à doser.
 - **Capteur optique** : une mesure spectroscopique est associée à une réaction chimique. Cela peut être une mesure de fluorescence, d'absorbance, de chimie luminescence, d'indice de réfraction. Une idée élégante est l'utilisation de ces capteurs dans une fibre optique³. Nous y reviendrons un peu plus loin. Dans ce cas le terme « optode » ou « optrode » est parfois employé⁴.
- Enfin restent les **bio-capteurs** : ils mettent en jeu des réactions biochimiques. Ils peuvent donc de ce fait être classés parmi les capteurs chimiques. La plupart utilisent le principe de reconnaissance anticorps/antigène, enzyme/substrat, récepteur/hormone. Ils sont particulièrement attrayants de par leurs hautes spécificité et sensibilité.

Nous nous concentrerons dans cette étude sur l'élaboration de **capteurs chimiques à transduction optique**. La technique de spectroscopie choisie sera plus particulièrement l'émission de **fluorescence**. Cette technique a l'avantage par rapport à la spectroscopie d'absorption U.V.-Visible de ne pas nécessiter de référence, puisque l'intensité de fluorescence est mesurée directement. Les techniques de fluorescence permettent également de détecter des concentrations d'analyte beaucoup plus faibles (de l'ordre de 10^{-10} mol.L⁻¹)⁵. Les méthodes de spectroscopie d'absorption atomique ou de flamme sont des méthodes certes plus sensibles que la fluorescence mais elles sont destructives, donc inutilisables en milieu vivant. De plus, dans le cas des ions, ces techniques mesurent la quantité totale d'analyte (libre ou complexé), alors que les indicateurs colorés ou fluorescents mesurent l'activité en espèces libres. De ce fait les sondes fluorescentes se sont développées suite à une demande de la biologie pour la détection intracellulaire d'ions inorganiques. La synthèse organique a permis de réaliser des molécules complexantes et sélectives d'une espèce ionique donnée⁶.

Les sondes fluorescentes sont classées selon le type de réponse⁵ :

- certaines sondes voient leur intensité de fluorescence varier avec la quantité d'analyte, comme le Fluo-3⁷. Les mesures avec ce type de sondes sont perturbées par les effets de la photodestruction, et dépendent fortement de la concentration en fluorophore.
- les sondes dites de seconde génération sont ratiométriques. Elles présentent un déplacement de leur spectre d'émission ou d'excitation avec la variation de la quantité d'analyte. La quantité d'analyte peut être déterminée à partir du rapport des intensités de fluorescence à deux longueurs d'onde d'émission ou d'excitation. Nous citerons parmi de multiples exemples une sonde à pH : le 1,3,6,8-trisulfonate-8-hydroxypyrene⁸, et des capteurs d'ions comme les benzofuranes isophtalates qui complexent l'ion sodium (SBFI) ou l'ion potassium (PBFI)^{9,4}. La mesure est dépendante de la concentration en fluorophores. Parmi les sondes ratiométriques il en existe

aussi dont la polarisation est sensible à la quantité d'analyte. Le calcul de l'anisotropie se fait alors à partir des rapports des intensités de fluorescence en lumière polarisée^{10,11}.

- les nouvelles générations de sondes présentent des variations de durée de vie suivant la nature de leur environnement^{12,1,13}. Un des avantages de cette méthode est la faible sensibilité aux phénomènes de réabsorption et à la diffusion : ainsi des échantillons de sang, ou des milieux colloïdaux pourront être facilement analysés en spectroscopie de fluorescence résolue en temps, alors qu'ils ne le seraient pas en spectroscopie d'émission même avec des sondes ratiométriques spectralement.

Après avoir défini les différents types de capteurs, et avoir présenté de manière générale les sondes fluorescentes nous allons maintenant discuter nos objectifs, ainsi que le principe du système de capteur que nous souhaitons élaborer.

1.1. Enjeux et Objectifs

Nous souhaitons développer des capteurs fluorescents afin de détecter des métaux lourds, des molécules organiques polluantes, des ions. La mesure de grandeurs physiques comme le pH ou le potentiel fait aussi partie de nos objectifs.

Ces enjeux sont de taille si l'on sait que les fluctuations des ions calcium ou potassium sont peu ou mal connues dans les cellules. La connaissance des concentrations en ions calcium est par exemple capitale : ces ions contrôlent les mouvements musculaires, ils participent au système de régulation des neurotransmetteurs, ils jouent un rôle important dans la construction de l'embryon^{2,14}. Si les concentrations extracellulaires vont de 1 à 10 mmoles et sont mesurables par des méthodes potentiométriques, les concentrations intracellulaires sont beaucoup plus faibles, de l'ordre de quelques centaines de nanomoles, et de ce fait inaccessibles par potentiométrie. De plus l'utilisation d'une micro-électrode est une méthode invasive, qui risque de perturber le fonctionnement cellulaire voire d'endommager la cellule^{15,16,17}.

La connaissance du pH local dans un milieu biologique¹⁸ ou dans un matériau comme les sol-gels¹⁹ sont également l'objet d'attentions soutenues. De même la mesure du potentiel local dans une membrane pourrait aider à une meilleure compréhension du fonctionnement cellulaire²⁰.

Pour ces applications il existe de nombreuses sondes fluorescentes moléculaires, toutefois elles présentent un certain nombre d'inconvénients. Elles sont parfois toxiques chimiquement pour la cellule. Elles peuvent se concentrer dans certains organites des cellules (compartmentalisation) et ne permettent plus la détection aux endroits souhaités. Il arrive aussi que les sondes soient excrétées

des cellules. De plus, les mesures optiques sont rendues difficiles si le couplage des sondes avec les protéines du milieu modifie la réponse de la sonde à l'analyte. Quelles que soient leurs applications les sondes moléculaires sont trop petites pour être localisées individuellement ou déplacées. Une alternative proposée est de développer des **nanocapteurs**, ceux-ci doivent répondre à un certain nombre de critères :

- La taille du capteur :

La miniaturisation est un enjeu clef pour des applications biologiques¹⁸ où les manipulations de cellules individuelles sont courantes^{17,21,22}. Les nanosondes pourraient aussi permettre d'élucider la dynamique de réactions chimiques en milieux confinés. Les capteurs nanométriques présentent de multiples avantages par rapport aux capteurs micrométriques ou millimétriques : les limites de détection, temps de réponse, résolution spatiale sont meilleurs^{18,23,15,17}.

- Les manipulations de nano-capteurs :

Les avancées technologiques récentes permettent de réaliser des manipulations optiques de nanosystèmes telles des billes de polymères de diamètre inférieur au micron^{24,25,26}. Les manipulations de nano-capteurs devraient permettre la mesure de concentrations locales. Une des premières utilisations d'une nanoparticule comme capteur sensible au pH, manipulée par une pince optique a été réalisée par les équipes de H. Masuhara et R. Kopelman²⁷.

- La sélectivité du système :

La sélectivité est déterminée par la fonction chimique de reconnaissance de l'analyte. Les chimistes organiciens concentrent leurs efforts pour rendre les molécules sélectives. L'utilisation de molécules biologiques à très forte sélectivité est une alternative envisageable pour un capteur.

Ces dernières années l'utilisation d'une fibre optique dont l'extrémité est fonctionnalisée par un élément polymérique ou une matrice sol-gel^{28,18,4} sensible à un analyte s'est développée. Des capteurs chimiques de quelques centaines de nanomètres ont ainsi été élaborés pour la mesure du pH^{29,30}, la mesure du dioxygène dissous dans l'eau³¹, la mesure de la concentration en calcium³². Cette méthode a cependant des limites, en particulier pour l'analyse de cellules individuelles, où la pénétration de l'électrode dans la membrane peut affecter la cellule¹⁵. De plus, en milieu biologique le signal recueilli dans la fibre est faible, et les mesures quantitatives d'intensité sont difficiles⁵. Cette méthode ne convient pas lorsqu'il s'agit d'examiner un grand nombre de cellules.

L'encapsulation de sondes fluorescentes dans des vésicules phospholipidiques ou liposomes a été proposée comme alternative aux fibres optiques^{33,15}. Les méthodes de préparation des liposomes permettent de bien contrôler le diamètre (autour de 70 nm par exemple) ainsi que la distribution de

taille. Même si l'efficacité d'encapsulation d'une sonde à dioxygène, comme le chlorure de tris(1,10-phénantroline)ruthénium, n'atteint que 1%, le colorant reste adsorbé dans les vésicules et ne s'échappe pas vers le solvant¹⁵. Des études sur des liposomes individuels ont montré qu'avec un seul et même liposome 6000 mesures consécutives de la concentration en dioxygène pouvaient être faites. Le temps de réponse est de l'ordre de la milliseconde. Un autre avantage de ces systèmes est l'abaissement de la limite de détection : par exemple, pour un capteur à dioxygène, la gain par rapport aux fibres optiques est de 1 ordre de grandeur et de 6-7 ordres de grandeur par rapport aux capteurs conventionnels micrométriques. Il existe cependant des limites aux capteurs à base de liposomes individuels, en particulier la photodestruction des colorants (peu concentrés dans les liposomes), et la stabilité chimique des liposomes avec le temps.

Les capteurs à base de liposomes sont à rapprocher de la famille des « PEBBLEs » (Probes Encapsulated By Biologically Localized Embedding) ou capteurs optiques sphériques, de taille submicrométrique à base de sondes fluorescentes encapsulées dans une matrice biologiquement compatible. R. Kopelman et son équipe sont à l'origine de cette définition^{16,17,34,35}. Ils ont développé trois catégories de « PEBBLEs » :

- des capteurs hydrophiles à base des sondes fluorescentes greffées ou encapsulées dans une matrice de polyacrylamide afin de détecter des ions calcium, de mesurer le pH ou pO₂.
- des capteurs hydrophobes, par exemple à base d'une membrane liquide de PVC contenant un ionophore non fluorescent, un fluorophore sensible au pH, et un additif ionique. Utiliser un indicateur d'ions non fluorescent permet d'élargir la gamme d'analytes. Cette technique a été appliquée à un capteur d'ions potassium.
- ils ont proposé un troisième de capteur associant une particule d'or à des peptides ou protéines marqués par des molécules fluorescentes. Un tel capteur a déjà été étudié avec une fibre optique pour détecter le monoxyde d'azote.

Les avantages des « PEBBLEs » sont nombreux : ils combinent en particulier les avantages des sondes moléculaires (taille non invasive pour les cellules) et ceux des fibres optiques (la matrice protège les fluorophores des interactions avec les protéines). De tels capteurs contournent les multiples inconvénients des sondes moléculaires, en particulier la toxicité (les sondes étant encapsulées dans les pores de la matrice) et la calibration. Il est en effet possible de calibrer *in vitro* et d'utiliser les « PEBBLEs » *in vivo* sans plus de précautions, car les fluorophores de la matrice ne sont pas en contact avec l'environnement cellulaire. Il est aussi possible d'encapsuler plusieurs fluorophores dont un sert de référence interne.

Les temps de réponse sont inférieurs à la milliseconde. L'incorporation peut se faire selon plusieurs méthodes (canon à gènes, transport par liposomes, ou picoinjection) et n'endommage pas les cellules comme les fibres optiques.

I.2. Position de la problématique ; présentation du système

I.2.1. Préambule

Nous souhaitons élaborer des capteurs en séparant la fonction de détection (sonde) de celle de signalisation. Le relais de l'information entre détection et signalisation peut se faire soit par transfert d'énergie, transfert d'électron ou de proton. La séparation des fonctions de détection et signalisation présente l'avantage de pouvoir construire un **système modulaire**. De tels systèmes ont déjà été élaborés. Nous présenterons de manière brève quelques systèmes où le transfert photoinduit d'un électron est mis en jeu, puis nous nous intéresserons aux capteurs utilisant le transfert d'énergie.

- Passage de l'information par transfert d'électron :

De nombreux capteurs d'anions ou de cations utilisent le Transfert Photoinduit d'Electron (TPE)^{36,37}. Le principe peut être décrit par le schéma suivant :

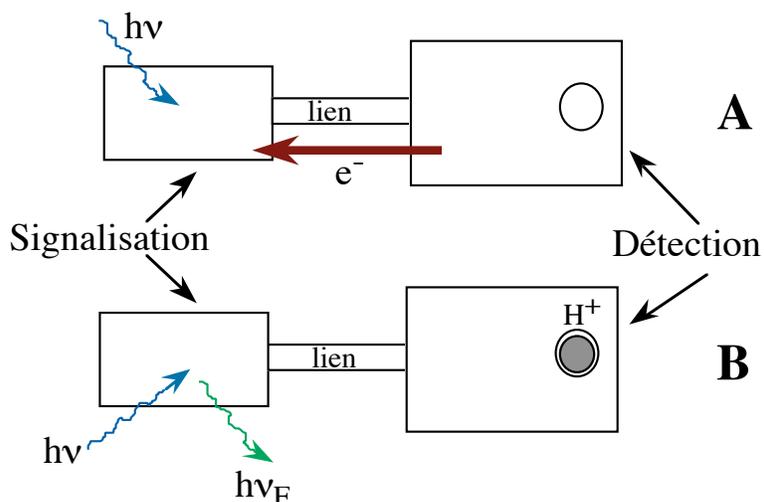


Figure I.1 Schéma de principe d'un capteur utilisant le transfert photoinduit d'électron. **A)** en absence de proton, pas de réponse à une excitation lumineuse **B)** en présence de proton, signal fluorescent en réponse à une excitation.

La signalisation est alors assurée par une molécule fluorescente, liée à une molécule sonde (récepteur de cation, par exemple). Historiquement les premiers capteurs (figure I.1) utilisant le TPE se composaient d'une molécule aromatique fluorescente liée à une molécule aminée (dont la protonation change avec le pH). Ces capteurs pouvaient basculer entre deux états **A** et **B**.

A) L'amine n'est pas protonée, le doublet libre de l'azote est localisé. Lorsque le fluorophore est excité, il y a extinction de la fluorescence de celui-ci par transfert d'électron. Le capteur est « éteint ».

B) Si maintenant l'amine est protonée, le transfert d'électron est impossible. Sous excitation lumineuse la molécule aromatique (signalisation) est rendue fluorescente. Le système est « allumé ».

Un tel système peut servir de sonde à pH. L'idée a aussi été appliquée à l'élaboration de capteurs d'ions métalliques ou non métalliques^{38,39,40,41}.

- Passage de l'information par transfert d'énergie :

Le transfert d'énergie (Cf. Annexe F) selon Förster met en jeu deux molécules : un donneur D, et un accepteur A (figure I.2.).

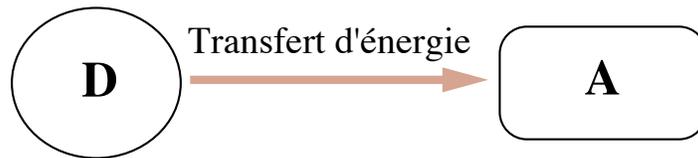


Figure I.2. Schéma d'un couple donneur-accepteur susceptible de réaliser un transfert d'énergie.

Le donneur D est choisi pour ses propriétés de fluorescence (longueur d'onde d'excitation, rendement de fluorescence, durée de vie). Le transfert d'énergie de D vers A dépend du **recouvrement spectral** de l'absorption de A avec l'émission de fluorescence de D. Il est aussi fonction de l'orientation des moments de transition et de la **distance** R qui sépare D et A. Th. Förster a défini une distance critique R_0 pour laquelle l'efficacité du transfert est de 50%. (Cf. Annexe F) Les paramètres précédents peuvent être modulés pour construire un système où par exemple la distance entre donneur et accepteur est fixe mais où le spectre d'absorption de l'accepteur A change en présence ou absence de l'analyte. Dans ce cas, le recouvrement avec le spectre d'émission de fluorescence de D change (si l'accepteur est fluorescent, il est possible de suivre simultanément l'extinction de fluorescence de D et l'augmentation de l'intensité de fluorescence de A par transfert d'énergie). Si ces changements sont significatifs, le transfert d'énergie varie selon la quantité d'analyte. Parmi de multiples exemples, nous citerons des capteurs à pH, et pCO_2 ⁴² et ammoniac⁴³.

Si maintenant le recouvrement spectral est constant, la variation de distance entre D et A module le transfert d'énergie⁴⁴. L'étude du transfert d'énergie peut alors permettre de caractériser la morphologie de surfaces⁴⁵ ou du milieu⁴⁶ où sont localisés le donneur et l'accepteur. La spécificité de protéines telle la calmoduline couplée aux propriétés de fluorescence de la Green Fluorescent Protein (GFP) est utilisée de cette façon pour la détection d'ions⁴⁷.

1.2.2. Conception du système

Notre système s'appuiera sur le transfert d'énergie. Les contraintes sont en effet moins grandes que pour le transfert d'électron : il ne nécessite pas de recouvrement orbitalaire donc de couplage chimique des molécules. Nous avons pensé qu'un transfert résonant d'énergie entre une sonde et un support serait aussi un moyen d'améliorer la durée de vie de la sonde. Une molécule sonde en solution, excitée directement par un faisceau lumineux est détruite assez rapidement.

Afin de rendre la signalisation optimale, nous proposons de travailler avec un support fluorescent caractérisé par une bonne absorption et un rendement quantique de fluorescence élevé. Nous avons choisi des nanosphères de polystyrène, dopées par des fluorophores, les « Orange Fluospheres[®] » de Molecular Probes⁷, aussi appelées **latex**. Ce terme générique s'applique à toute suspension aqueuse de particules de forme sphérique et de nature polymérique⁴⁸. Les billes de latex fluorescentes appartiennent à la famille des « PEBBLEs » (Cf. § I.1). Les caractéristiques des billes « Orange Fluospheres[®] » et du fluorophore emprisonné dans la matrice seront plus amplement développées au chapitre II.

Nous présentons, figure I.3, un schéma du système que nous nous proposons d'élaborer. L'intensité d'émission de fluorescence du support (non sensible à l'analyte) est modulée par les variations d'absorption de la sonde sensible à l'analyte.

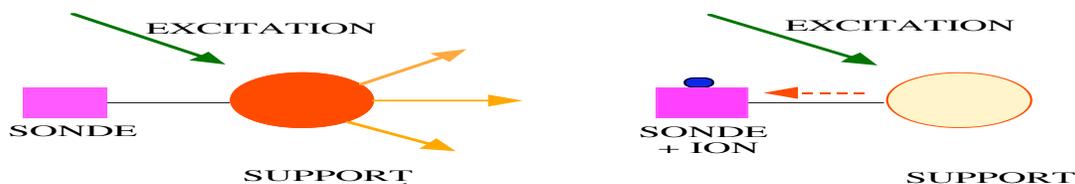


Figure I.3. Schéma de principe des capteurs mis en oeuvre dans cette étude.

Nous souhaitons associer aux billes une molécule sonde, afin d'élaborer « un interrupteur moléculaire » (Figure I.3). Lorsque la sonde n'est pas associée à l'analyte, il n'y a pas de recouvrement entre les spectres d'émission du support et d'absorption de la sonde. Le transfert d'énergie de la bille vers la sonde est impossible et le support est allumé. Lorsque la sonde a capté la molécule ou l'ion dont elle est spécifique, son spectre d'absorption est déplacé. Il existe alors un recouvrement entre ce spectre et le spectre d'émission de la bille. Le système est « éteint ». Pour que ce principe fonctionne, la sonde complexée doit être un « quencher » de la fluorescence du latex et ne piéger l'énergie qu'en présence d'analyte.

Une molécule sonde peut éteindre totalement une bille de latex si un effet d'antenne efficace se produit au sein de la bille. S'il n'existe que l'hétérotransfert (transfert D-A) une molécule sonde

(A) éteint les chromophores (D) situés en moyenne à une distance r ($r < R_0$). S'il existe un homotransfert (transfert D-D au sein du latex) efficace une molécule sonde éteint les chromophores situés à une distance $(r+l)$ où l est la distance moyenne parcourue par l'excitation dans l'antenne. Un effet d'antenne devrait donc permettre d'amplifier le phénomène d'extinction de la fluorescence⁴⁹.

Expliquons tout d'abord les raisons qui ont motivé notre choix des billes de polystyrène comme support :

- Ce sont des nano-objets dont la taille, la surface spécifique, la nature et la densité des groupements de surface sont modulables. Ils sont de ce fait utilisés dans des domaines variés. De tels systèmes peuvent permettre de réaliser des micro-réacteurs photochimiques ou bien l'étude de phénomènes photophysiques aux interfaces. Les réactifs sont alors concentrés dans des géométries confinées. Il est aussi possible de contrôler la distribution et l'orientation des réactifs. Les billes de latex sont utilisées comme supports de : chromophores^{50,51,45,52,53,54}, molécules biologiques^{55,56,57}, polymères⁵⁰. Un couplage chimique permet aussi de greffer de façon covalente des molécules à la surface des billes^{46,58,59,60}. Notons que des particules de latex ont permis l'isolation sélective de brins d'ADN ou d'ARN : en plongeant les billes dans le milieu cellulaire, seul l'ADN ou l'ARN complémentaire de celui fixé de façon covalente sur les billes est retenu^{60,61,62}. Leur grande surface spécifique permet de grande capacité de « chargement » et le transport de médicaments ou molécules thérapeutiques^{63,64}.
- Ces particules ne sont pas cyto-toxiques : le polystyrène est un matériau bio-compatible^{65,63}, il est non immunogène et n'est pas biodégradable. Certains essais de transport de molécules ont été faits à partir de billes de poly(alkylcyanoacrylates), mais ce polymère se dégrade en milieu biologique et les produits de dégradation sont nocifs^{66,67,68}.

L'irritation de tissus n'est observée qu'autour d'agrégats de petites billes de polystyrène ou si les billes sont de diamètre relativement grand⁶³. Pour ces raisons les billes de latex peuvent être utilisées *ex vivo* ou *in vivo*^{69,70}. Des billes sont restées plusieurs mois dans des cellules nerveuses sans provoquer leur mort⁷¹.

- Elles sont injectables facilement dans les cellules cibles, leur stabilité colloïdale en milieu biologique est bonne⁶³.
- Elles sont micro-manipulables et sont donc de bons candidats pour effectuer des mesures locales^{24,27}.

Pour toutes les raisons évoquées ci-dessus les billes de polystyrène sont des supports attrayants. Nous souhaitons concevoir un capteur optique, c'est pourquoi nous avons choisi des billes fluorescentes⁷. Cette caractéristique présente des avantages supplémentaires :

- Si une molécule fluorescente est emprisonnée dans une matrice polymérique^{72,73,52}, un xérogel⁷⁴, un sol-gel^{75,72}, un liposome, elle est mieux protégée de la photodégradation ou de l'extinction du signal de fluorescence par des interactions (collisions ou complexations) avec des impuretés du solvant. Ainsi nous espérons que les fluorophores encapsulés dans la matrice sont moins sensibles au « bleaching » qu'un ensemble de ces mêmes molécules en solution. Les billes stockées à 4°C, à l'obscurité restent en suspension colloïdale et conservent leurs propriétés fluorescentes pendant plusieurs mois⁷⁶. Il en va de même pour des billes injectées et restées un an dans un rat vivant⁷¹.
- Les billes Fluospheres sont des objets très lumineux, fortement chargés en fluorophore (entre 10^{-3} et 3.10^{-3} mol.L⁻¹⁷³) et nous pouvons espérer un effet d'antenne entre les chromophores de la matrice, ce qui aura pour effet d'amplifier le signal.

Par ailleurs ces billes de latex fluorescentes sont, pour les biologistes une alternative intéressante aux méthodes de marquage radioactif. Ainsi Robertson, en 1997, a utilisé des Fluospheres® de chez Molecular Probes pour l'étude de la respiration⁷⁷. Glenny a comparé l'étude de sphères radioactives et de billes fluorescentes pour la perfusion localisée d'organe, *i.e* l'étude du flux sanguin⁷⁸. Son équipe a montré que l'utilisation de billes fluorescentes est plus sensible, moins coûteuse, moins risquée. Les billes fluorescentes de latex sont utilisées en routine comme traceurs neuronaux^{70,79}, en cytométrie de flux^{80,81}, et pour des diagnostics immunologiques⁸².

Conclusions :

les billes Fluospheres® présentent de multiples avantages et ouvrent de larges champs d'investigation. Nous souhaitons les insérer dans un capteur modulaire à trois composantes : détection, relais de l'information, signalisation. Ces latex constituent le support du capteur et ils remplissent la fonction de signalisation. La variabilité de notre système repose sur le choix des sondes.

1.3. Développements et stratégie

Nous commencerons notre étude (Chapitre II) par une présentation des billes fluorescentes choisies. Nous détaillerons plus particulièrement la nature des billes, et préciserons les propriétés du fluorophore : d'abord dans un solvant organique (le toluène) puis dans la matrice de polystyrène.

Nous essaierons de caractériser la fluorescence (émission, déclin, anisotropie de fluorescence) des billes, ainsi que l'influence de facteurs physico-chimiques comme le pH ou la force ionique.

Après avoir défini le support du capteur, nous nous intéresserons aux interactions des billes avec des molécules sondes. Rappelons que la nature de la fonction de détection est variable, et permet d'avoir une modularité sur le système.

Nous avons déjà signalé que le choix de la sonde est conditionné par le type de support et les caractéristiques requises pour le capteur. Les « Orange Fluospheres[®] » que nous avons choisies sont fonctionnalisées par des groupements anioniques. Nous avons choisi d'adsorber sur les latex, par interaction électrostatique, les molécules assurant la détection. Il faut donc que la molécule sonde soit cationique. Il faut, de plus, que le recouvrement du spectre d'absorption de la sonde avec celui d'émission des latex change selon l'état complexé ou non de la molécule.

Dans un premier temps, afin de tester la viabilité du principe de conception du capteur, nous avons choisi de travailler avec une sonde « modèle » : **le Bleu de Méthylène (BM)**. Comme nous le verrons chapitre III, c'est une molécule cationique, aromatique donc plutôt hydrophobe. Dans l'eau, sous sa forme oxydée la molécule est bleue. Le recouvrement avec le spectre d'émission des « Orange Fluospheres[®] » est convenable. Nous vérifierons tout d'abord que l'adsorption du BM sur les latex est possible. Puis nous étudierons les effets de l'adsorption sur les propriétés de fluorescence des billes. Nous chercherons en particulier à vérifier qu'en présence de BM adsorbé il y a extinction de la fluorescence des billes.

Le Bleu de Méthylène est un indicateur d'oxydoréduction, sa forme réduite est incolore. Nous essaierons de montrer que les latex fluorescents sont sélectifs, et qu'ils permettent de distinguer la forme oxydée (bleue) de la forme réduite (incolore). Le capteur Latex-BM serait alors un capteur sensible au potentiel d'oxydoréduction.

Une fois les interactions Bleu de Méthylène-Billes fluorescentes caractérisées, nous nous pencherons sur l'étude de billes individuelles, immobilisées dans des films. En effet, pour utiliser le système bille-sonde comme capteur, les mesures en cuvette, qui sont des mesures à grande échelle, ne donnent que des informations moyennées sur toute une population. Pour connaître le comportement d'un seul capteur, isolé, nous avons immobilisé les billes dans des films de poly(vinyl alcool) et nous avons eu recours à la microscopie confocale (collaboration avec le Professeur H. Masuhara). Il est tout d'abord important de vérifier que la réponse d'une bille à l'excitation lumineuse ne dépend pas de la bille choisie *i.e* de la position dans l'échantillon. Pour que le support soit fiable, le comportement d'une bille doit être identique de bille à bille. Sinon comment être sûr, lorsque la sonde est adsorbée, que la différence de comportement du capteur vient de la présence / absence d'analyte ou alors d'inhomogénéités entre supports? Afin de

caractériser le système support-sonde, nous avons également étudié le système Bille-BM sous microscope.

Comme la variable de notre capteur est la nature de la sonde, nous avons choisi de travailler avec un autre indicateur de potentiel d'oxydoréduction : le Cytochrome C. C'est une protéine qui est sous forme cationique à pH 7. Le spectre d'absorption de la molécule est sensible au changement de degré d'oxydation du métal central. Nous étudierons donc, chapitre V, les effets de l'ajout de Cytochrome C sur la fluorescence de latex en solution.

Pour conclure sur la nécessité des capteurs pour la santé, et l'environnement nous aborderons, chapitre V, la détection de métaux lourds comme le plomb(II), le cadmium(II) ou le mercure (II). Grâce à une collaboration développée au sein du laboratoire, nous étudierons tout d'abord l'interaction d'une porphyrine hydrosoluble (tétraméthyl pyridinium porphyrine-TMPyP) avec des sels métalliques. Après avoir caractérisé, en solution, les propriétés spectroscopiques de la TMPyP base libre et métallée, nous nous pencherons sur les interactions de la TMPyP avec des latex, enfin nous nous intéresserons aux effets de l'ajout d'ions métalliques sur ce système capteur.

N.B. : Dans toute l'étude nous avons pris la liberté d'utiliser indifféremment les termes de quencher / inhibiteur, quenching / extinction.



II. Présentation, caractéristiques et propriétés des billes fluorescentes

Introduction :

Nous allons présenter ici les billes de latex fluorescentes qui vont nous servir de support pour l'élaboration ultérieure de capteurs. Après une présentation générale des nanosphères, nous nous intéresserons aux propriétés spectroscopiques du fluorophore. Ce dernier n'est pas commercialisé. Nous allons donc tout d'abord faire une présentation des caractéristiques générales des molécules appartenant à la même famille. Puis notre étude portera sur le fluorophore dans le solvant toluène, et enfin, dans la matrice de polystyrène.

II.1. Nature des billes

II.1.1 Présentation générale.

Nous avons choisi de travailler avec des billes de latex fluorescentes « Orange Fluospheres[®] » commercialisées par la compagnie Molecular Probes, Inc. Eugene, Oregon, U.S.A.⁷ Ces billes⁷³, ainsi que la molécule fluorescente « dopante », sont protégées par des brevets^{83,84,85}. Nous avons néanmoins pu obtenir quelques informations. Les billes sont constituées de polystyrène de grande pureté⁸⁶. Ces billes sont imprégnées par des colorants de la famille des difluoroborodipyrrométhènes, vendus par Molecular Probes sous la marque BODIPY[™] (Figure II.1). Le fluorophore est alors emprisonné dans la matrice polymérique, ce qui le protège de la photodégradation, du « quenching » par le solvant ou par des impuretés^{75,87,73,52}.

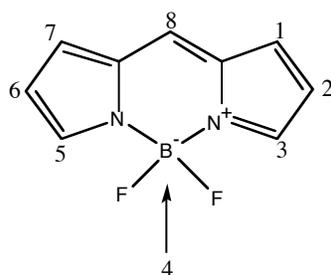


Figure II.1. Structure du fluorophore BODIPY[™] ou 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène.

Nous avons travaillé avec des billes de 100, 40 et 20 nm de diamètre, « chargées » par un même colorant BODIPY[™] dit « Orange », dont nous présenterons les propriétés dans la partie II.2. Toutes les particules sont chargées négativement. Elles sont fonctionnalisées soit par des groupements sulfates soit par des groupements carboxylates (Cf. Tableau II.1). Nous les nommerons désormais selon la « nomenclature » de Molecular Probes : par leur couleur - leur catégorie de taille - la nature du groupe fonctionnel en surface.

Dénomination	Diamètre (nm)	Groupe fonctionnel	Surface spécifique (m ² /g)	Nombre de particules / mL
Orange 100 sulfate	120 +/-5,5%	-OSO ₃ ⁻	47	2,1.10 ¹³
Orange 100 carboxylate	95 +/- 6,6%	-COO ⁻	60	4,3.10 ¹³
Orange 40 carboxylate	44+/- 12%	-COO ⁻	130	1,1.10 ¹⁵
Orange 20 carboxylate	14 +/- 26,6%	-COO ⁻	406	1,3.10 ¹⁶

Tableau II.1. *Quelques caractéristiques des billes étudiées.*

Nous allons maintenant essayer de préciser la nature des billes utilisées.

II.1.2 *Fluospheres[®] Sulfate et Fluospheres[®] « modifiées par des carboxylates » (Carboxylate-modified Fluospheres[®])*

Les techniques de polymérisation en émulsion permettent d'obtenir des latex, suspension aqueuse de microsphères, de taille uniforme⁴⁸. Ce type de technique est certainement employé dans la synthèse des billes de polystyrène que nous utilisons, même si des méthodes de synthèse sans émulsion existent⁵⁶. La fonctionnalisation de ces billes avec des groupements sulfates peut être réalisée via la polymérisation de styrène dans un mélange eau-dodécylsulfate de sodium, peroxydisulfate de potassium^{88,45}. Les billes obtenues sont lavées en général par ultrafiltrations successives. Pour caractériser leur taille, des méthodes de microscopie à transmission électronique ou de diffusion quasi-élastique de la lumière sont utilisées^{56,88,45}. Les mesures de densité surfacique de charge sont réalisées par dosage conductimétrique, dosage colorimétrique⁵⁶ ou par mesure de fluorescence⁸⁸.

Il existe plusieurs techniques pour obtenir des billes modifiées par des groupements carboxylates^{89,56}.

Dans les techniques dites de « batch process », le styrène est soit copolymérisé avec des mono-acides carboxyliques insaturés (comme l'acide métacrylique ou acrylique), soit avec l'anhydride maléique (qui s'hydrolyse *in-situ* en acide maléique, et permet d'introduire dans la chaîne deux groupes acides carboxyliques adjacents).

Dans les techniques dites de « seed process », les billes portant des groupes carboxylates peuvent être faites à partir de billes de polystyrène-sulfate dont les groupements sulfates sont couplés à des chaînes de polymère hydrophile contenant des groupes carboxyles (Figure II.2)⁸⁷. Les billes vendues par Molecular Probes sont vraisemblablement obtenues par ce type de technique.

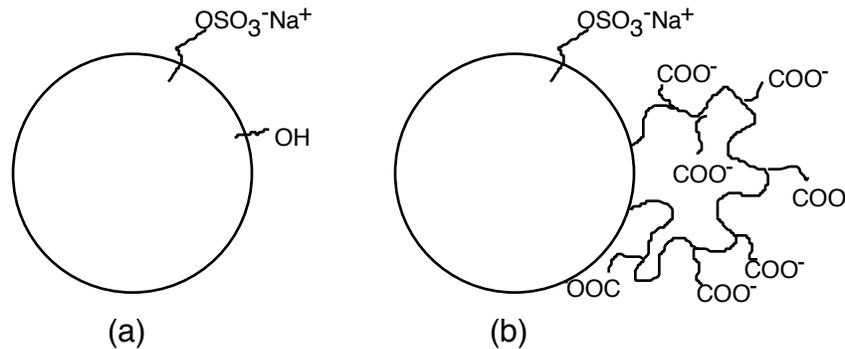


Figure II.2. (a) *Sulfate Fluospheres*[®] (b) *Carboxylate-modified Fluospheres*[®].

Les billes modifiées par des groupements carboxyles sont fortement chargées, hydrophiles, et ont une surface poreuse⁸⁷. Il semblerait que « la chevelure » de copolymère ajouté soit hydratée⁵⁵. La couche externe ajoutée, épaisse de quelques angströms, ne modifie pas la taille des particules⁸⁷. Le nombre des groupes de surface dépend fortement des conditions de synthèse. Ainsi, à pH neutre, les charges en surface varient entre 0,1 et 2,43 millimoles.g⁻¹ de matière sèche. Les particules colloïdales ainsi constituées sont alors assez stables en présence de concentrations relativement élevées d'électrolytes (jusqu'à une mole par litre en sel monovalent). A pH inférieur à 5, cependant, on neutralise totalement, ou en partie, les groupements carboxylates ; ceci entraîne l'agglomération et la précipitation des particules.

Les billes de polystyrène-sulfate sont plus hydrophobes. Les charges en surface ne représentent que 0,004 millimoles.g⁻¹. Une suspension de telles billes n'est stable que jusqu'à 0,2 mol.L⁻¹ en sel monovalent et s'agrègent facilement pour de faibles concentrations en cations divalents. Ces suspensions colloïdales sont stables en milieu acide, car le pKa du groupement surfacique est inférieur à 2.

L'ajout de colorants fluorescents de la famille des BODIPYTM, électriquement neutres, ne modifie pas les propriétés surfaciques de charge des billes portant des sulfates ou des carboxylates⁷³. Le tableau II.2 présente quelques données fournies par Molecular Probes concernant les billes étudiées ici :

Dénomination « nomenclature »	Groupe fonctionnel	Densité surfactive de charge ($\mu\text{C}.\text{cm}^{-2}$)	Surface occupée par un groupe fonctionnel (Å^2)	Concentration en groupe fonctionnel ($\text{mmol}.\text{g}^{-1}$)
« Orange 100 sulfate »	$-\text{OSO}_3^-$	0,87	1,835	0,00425
« Orange 100 carboxylate »	$-\text{COO}^-$	*	*	0,0166
« Orange 40 carboxylate »	$-\text{COO}^-$	182	9	2,44
« Orange 20 carboxylate »	$-\text{COO}^-$	7	232	0,291

Tableau II.2. *Quelques données relatives aux groupes surfaciques.*
(* données non spécifiées par le fabricant)

A partir de la concentration en groupe fonctionnel, de la densité du polystyrène ($1,055 \text{ g}.\text{cm}^{-3}$), et de l'encadrement du diamètre des billes, nous pouvons estimer les nombres minimal et maximal de sites chargés par bille (N), \bar{N} est le nombre de sites dit « moyen », évalué à partir du diamètre estimé (Tableau II.3):

Dénomination « nomenclature »	N = Nombre de sites chargés /bille \bar{N} = nombre « moyen » de sites /bille	Nombre de groupes. m^{-2}
« Orange 100 sulfate »	2116 <N< 2936 \bar{N} =2504	$5,44.10^{16}$
« Orange 100 carboxylate »	3856 <N< 5733 \bar{N} =4733	$1,67.10^{17}$
« Orange 40 carboxylate »	47160 <N< 97226 \bar{N} =69204	$1,14.10^{19}$
« Orange 20 carboxylate »	105 <N< 538 \bar{N} =265	$4,30.10^{17}$

Tableau II.3. *Nombre de sites chargés par bille.*

Il n'existe aucune corrélation entre taille, nature du groupement et nombre de sites chargés. Les latex « Orange 40 carboxylate » présentent la plus grande densité surfactive de charge. Rappelons que nous souhaitons adsorber des molécules sondes à la surface des billes, donc les billes « Orange 40 carboxylate » semblent être le support le plus intéressant pour fixer des molécules par interaction électrostatique.

Après avoir décrit la nature de la matrice polymérique, ainsi que les groupements de surface, nous allons maintenant nous intéresser au fluorophore contenu dans les billes.

II.2. Nature du fluorophore.

Les Fluospheres® sont dites « Orange » par référence à la couleur du fluorophore (BODIPY™) qu'elles contiennent. Comme nous l'avons déjà signalé, ce fluorophore est protégé par des brevets. Nous avons néanmoins pu obtenir de Molecular Probes des informations quant à sa nature chimique et quelques-unes de ses caractéristiques physico-chimiques (paragraphe II.2.2). Dans un premier temps, une revue bibliographique succincte sur les molécules de type BODIPY™ nous permettra d'avoir un aperçu de leurs propriétés ainsi que de leurs utilisations.

II.2.1. Les bora-diaza-indacènes dans la littérature.

La marque BODIPY™, déposée par Molecular Probes, recouvre une famille de molécules dérivées du 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène (Cf. Figure II.1). On trouve aussi dans la littérature la dénomination difluoro-dipyrrométhène borate ou encore complexes BF₂-pyrrométhène voire plus simplement pyrrométhène. Pour des raisons de simplicité, nous conserverons pour cette famille de molécules le nom de BODIPY dans la suite du texte.

Les pyrrométhènes sont des constituants de pigments tétrapyrroliques telles la biliburine ou la biliverdine (ces pigments contiennent deux unités pyrrométhènes liées par un méthylène ou un méthyne). Ils sont aussi présents comme motifs des porphyrines ou chlorophylle.

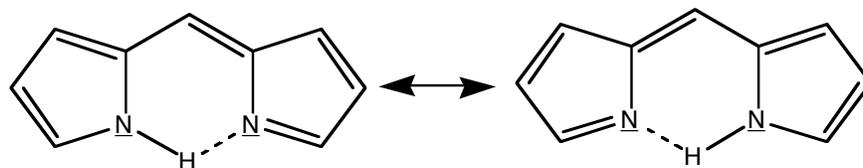


Figure II.3. Pyrrométhènes, équilibre tautomérique.

Ce type de pigments a été trouvé dans les phytochromes, ou des protéines participant à des antennes photosynthétiques⁹⁰.

Les propriétés spectroscopiques de l'unité pyrrométhène ont été bien étudiées. Elle possède une forte absorption dans le visible (vers 430 nm). La molécule est plane (Figure II.3.) car un équilibre de tautomérie existe⁹⁰. Le mouvement du proton est suffisamment rapide pour perturber les

échanges électroniques pendant la durée de vie de l'état excité, favorisant ainsi la désexcitation. Par conséquent, le pyrrométhène possède peu ou pas de fluorescence^{91,92}.

En revanche les complexes BF₂-pyrrométhènes sont des composés fortement fluorescents. Le groupe BF₂ supprime en effet la tautomérie et rigidifie la molécule⁹¹.

Ce chromophore a été synthétisé pour la première fois par Treibs et Kreuzer en 1968⁹³, puis en 1974 par Falk et son équipe⁹⁴. Pour la première fois, en 1977, Vos de Wael et son équipe ont proposé une synthèse et une étude des propriétés de fluorescence de sept BODIPY, en solution dans l'éthanol, l'éther ou adsorbés sur des surfaces de silice⁹².

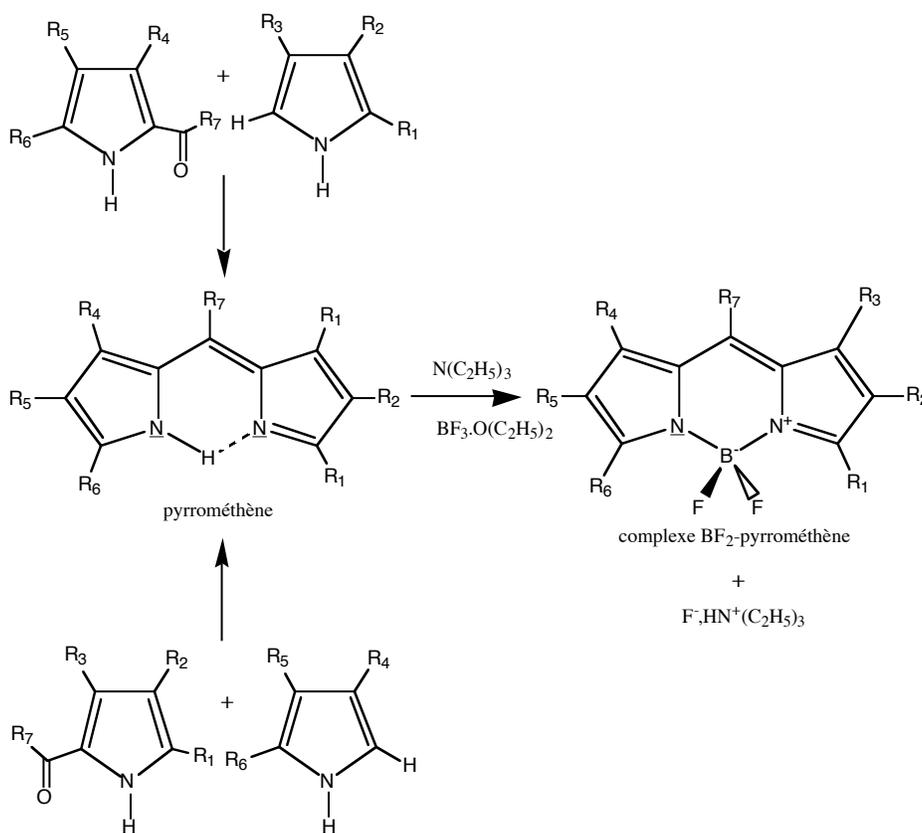


Figure II.4. Stratégie de synthèse utilisée par Vos de Wael et coll. pour synthétiser les BODIPY.

Un dérivé ionique, soluble dans l'eau, a été synthétisé en 1985 par Worries⁹⁵. Récemment R.P. Haugland et H.C. Kang ont breveté plusieurs formes réactives de BODIPYTM 83,96,97,85. Certains de ces dérivés ont été utilisés pour l'étude de protéines, de systèmes lipidiques, de couches

phospholipidiques^{98,99,100}. Les BODIPY ont également été incorporés dans des cristaux liquides, des matrices polymériques^{101,102}, des xérogels¹⁰³.

Nous allons maintenant rappeler les propriétés spectroscopiques et physico-chimiques remarquables des dérivés du BODIPY :

- Le spectre d'absorption présente une forte bande due à une transition $S_0 \rightarrow S_1$ entre 500 et 600 nm ($\epsilon > 70000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), une transition $S_0 \rightarrow S_2$ vers 350-370 nm correspond à une bande de plus faible intensité (20 fois plus faible). La première transition est mise à profit pour des utilisations en milieu biologique, car il est possible d'éviter les phénomènes d'auto-fluorescence générés par une excitation inférieure à 380 nm¹⁰⁰.
- D'après des mesures de dichroïsme linéaire, le dipôle électronique de la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est polarisé le long de l'axe de la molécule présenté sur la Figure II.5⁹⁴.

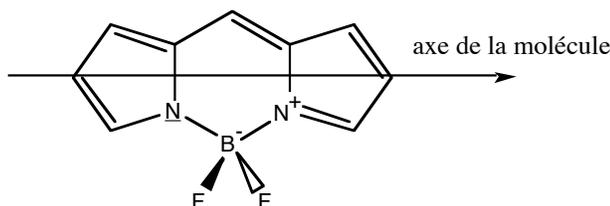


Figure II.5. Orientation du dipôle électronique de transition $S_0 \rightarrow S_1$ dans la molécule de BODIPY.

L'anisotropie de fluorescence de cette transition est évaluée à 0,37 pour un 1,3,5,7-tétraméthyl BODIPY. Les dipôles à l'état fondamental et à l'état excité font un angle de 13° entre eux¹⁰⁰.

- Les propriétés d'absorption du BODIPY semblent peu sensibles à la polarité de l'environnement⁸³. Il faut cependant noter qu'un déplacement bathochrome de l'absorption et de l'émission a été mis en évidence lorsque la polarité du solvant diminue^{104,105}. Ainsi le moment dipolaire à l'état fondamental est plus important qu'à l'état excité.
- L'émission de fluorescence a un rendement quantique élevé (typiquement $> 0,5$)^{92,95,98,99,104,106,107,108,109,110,111,83,84,85,97,96}.
- Aucune phosphorescence n'a été observée, que ce soit à température ambiante ou à 77K⁹².
- La structure vibronique a été « résolue » pour le 1,3,5,7-tétraméthyl BODIPY, à 4,2K⁹¹. L'intensité des bandes vibroniques ne représente que quelques pour-cents de celle de la bande associée à la transition 0-0. Le principe de Franck-Condon explique simplement la structure vibrationnelle, il y a peu de différence de géométrie entre l'état fondamental et l'état excité.

- Le déplacement Stokes est faible, ce qui peut être mis à profit pour sonder un milieu par transfert de Förster intermoléculaire⁸³. Le rayon de Förster R_0 a été estimé à environ 5,7 nm pour des dérivés 1,3,5,7-tétraalkyles¹⁰⁰.
- Le déclin de la fluorescence peut être ajusté par une fonction monoexponentielle en solution diluée^{98,105,95}. La durée de vie pour des dérivés 1,3,5,7-tétraalkyles est de l'ordre de 5-6 ns en solvants organiques^{98,105}, et de 10-15 ns pour les mêmes dérivés sulfonates dans l'eau⁹⁵. Cette durée de vie augmente avec la polarité du solvant¹⁰⁵.
- Les BODIPY sont, en général, photostables^{83,92,106,107,108,109,111,110,85,96,97}. Les observations suivantes sont significatives : des solutions de 1,3,5,7,8-pentaméthyl BODIPY à 10^{-4} mol.L⁻¹, sous une irradiation continue (250W) n'ont subi aucune dégradation après une semaine dans le méthanol, ou après un mois dans le dichlorométhane. Le 2,6-diéthyl-1,3,5,7,8-pentaméthyl BODIPY, aussi nommé pyrrométhène 567, a été plus spécifiquement étudié. Sa photostabilité est deux fois augmentée en matrice solide^{75,74,102}. Certaines équipes ont montré que cette photostabilité est encore accrue en milieu non oxygéné^{112,103}. En effet, il semblerait que les groupes amino aromatiques subissent des réactions photochimiques avec le dioxygène⁷². Cependant, dans l'éthanol désoxygéné et dans le benzène non désoxygéné, la photostabilité est identique¹¹².
- L'effet de l'extinction de fluorescence de quelques BODIPY par le dioxygène, dans l'eau, a été évalué à moins de 5%¹⁰⁰. Une extinction de la fluorescence par les ions iodures a aussi été mise en évidence^{98,99,104}.
- En milieu biologique, une extinction efficace de la fluorescence par des amino-acides aromatiques (Tryptophane, Tyrosine) avec comportement bi-exponentiel a été observée¹⁰⁰.
- Sauf cas particulier (voir plus loin), la fluorescence des BODIPY n'est pas sensible au pH^{83,104}. De plus le fluorophore conserve ses caractéristiques spectroscopiques après incorporation dans des matrices polymériques, protéiques, lipidiques ou dans des vésicules, des cristaux liquides^{100,104,98}.
- Nous pouvons noter enfin que le fluorophore n'est pas toxique pour le rat. Il est non mutagène pour *Salmonella* et *Escherichia*⁹⁵.

Nous pouvons également citer les applications suivantes des BODIPY :

- Les BODIPY sont connus comme d'excellents colorants lasers (les plus courants sont vendus chez Exciton sous les noms de Pyrrométhène 567, Pyrrométhène 597, mais de nombreux autres ont été synthétisés^{103,106-112}. Ils présentent en effet un rendement quantique élevé, une forte

bande d'émission de fluorescence (S_1-S_0) avec un très faible recouvrement entre l'absorption S_1-S_n et T_1-T_n et une très bonne photostabilité. Ils ont de ce fait été incorporés dans des matrices solides tels des sol-gels ou xérogels^{75,74,103} ou dans des matrices polymériques (PMMA)⁷².

- Récemment, de nouveaux BODIPY ont été utilisés dans la fabrication de diodes électroluminescentes organiques¹¹³.
- Les BODIPY ont aussi été utilisés comme photo-sensibilisateurs de porphyrines (ZnTPP ou TPP)^{114,115,116}. Les auteurs ont, en effet, créé des systèmes de photoconversion de l'énergie solaire à base de porphyrines.
- Un BODIPY sensible au pH¹¹³ a été synthétisé et étudié pour des mesures de pH en solution aqueuse et en membrane¹⁰¹.
- Des BODIPY ont été intégrés dans un « interrupteur » moléculaire¹¹⁷, pour permettre le contrôle optique de la durée de vie d'une paire d'ions générée photochimiquement. Ils ont pu aussi être utilisés comme capteur d'ions¹¹⁸.

Après avoir fait une brève revue des propriétés des molécules de la famille des BODIPY, intéressons-nous au BODIPY incorporé dans les billes qui nous servent de support.

II.2.2. Informations communiquées par Molecular Probes^a sur le BODIPYTM « Orange »

Tous les latex dit « Orange » contiennent le même fluorophore. Celui-ci n'est pas greffé de façon covalente dans les nanosphères^b. Nous n'avons aucune information sur le mode de « chargement » de la bille en fluorophore. Cependant une méthode courante consiste à placer les particules de polystyrène dans un mélange de solvants dans lequel le fluorophore est soluble, mais où les billes ne coagulent pas¹¹⁹. Ces solvants induisent un gonflement de la matrice polymérique qui permet au colorant de pénétrer à l'intérieur. Les solvants sont ensuite évaporés et les billes lavées. Elles restent alors marquées de façon permanente en solution aqueuse^{119,89}. En effet, les BODIPY, molécules lipophiles et neutres électriquement, sont très peu solubles dans l'eau. Ainsi il faut noter qu'aucune trace de fluorophore n'a pu être détectée en solution après avoir soumis des billes fluorescentes, en suspension aqueuse, à une température de 60°C, en présence de sodium dodécyle sulfate pendant 24 heures⁷³.

^a Communications personnelles, des services techniques de Molecular Probes ; Communication personnelle de R.P. Haugland

^b Communication personnelle de R.P. Haugland

Comme nous n'avons que peu d'informations sur le fluorophore, et que celui-ci n'est pas disponible commercialement, nous avons dissous les billes de latex dans du toluène. Cela nous a permis de mieux caractériser le fluorophore, avant d'étudier les billes en solution aqueuse.

II.2.3. Dissolution des billes dans le toluène : quelques données expérimentales sur le fluorophore en solution

II.2.3.1. Spectroscopies d'absorption et de fluorescence stationnaire

Nous avons extrait le fluorophore des quatre types de billes par dissolution du polystyrène dans le toluène¹¹⁹ (Cf. Annexe A). Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont rigoureusement identiques, quel que soit le type de billes dissoutes. Ceci confirme le fait que le fluorophore est identique dans toutes les billes dites « Orange ». Dans le toluène le maximum d'absorption est à 539 nm, et celui d'émission de fluorescence à 558 nm (Figure II.7). Le spectre d'excitation est identique au spectre d'absorption. Nous pouvons en conclure qu'il n'existe qu'une espèce à l'état fondamental. Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence sont images l'un de l'autre dans un miroir (Figure II.7). Ainsi la géométrie est similaire à l'état fondamental et à l'état excité⁹¹.

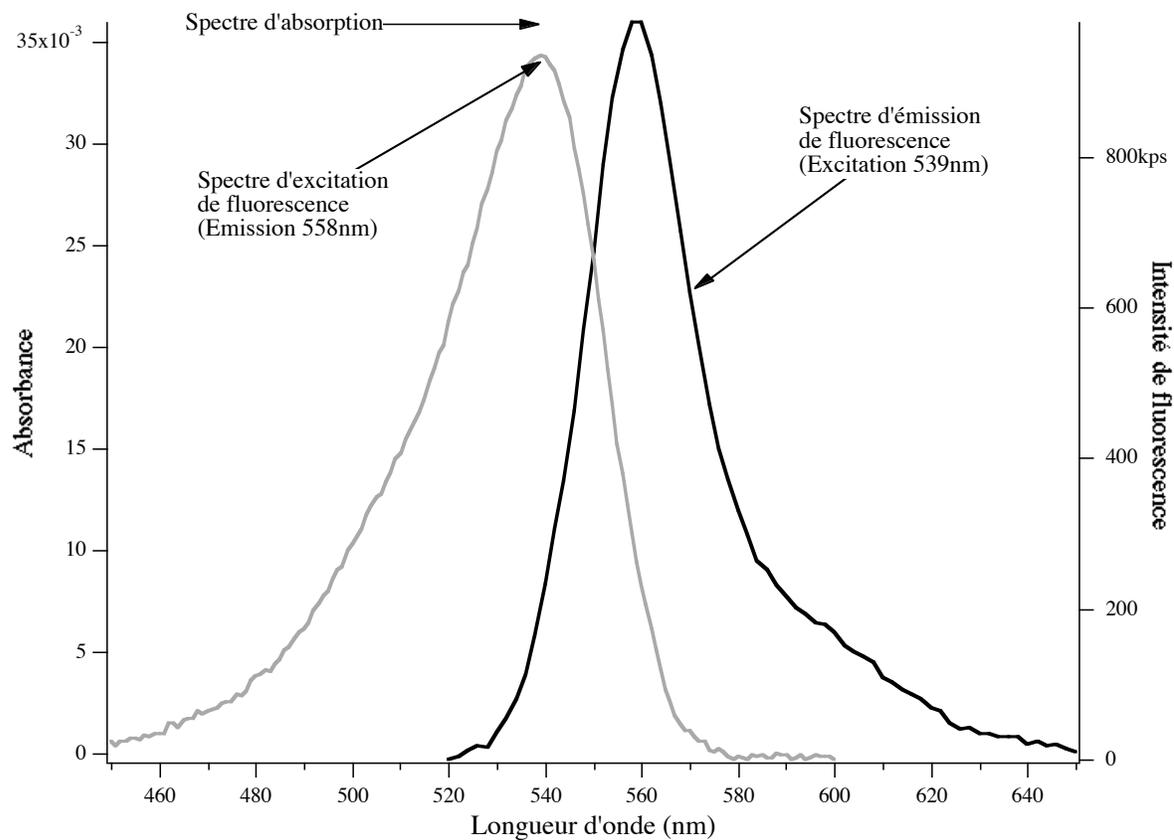


Figure II.7. Fluorophore « BodipyTM Orange » extrait des billes de latex - solvant : toluène Spectre d'absorption (trait pointillé noir) - spectre d'émission de fluorescence (excitation : 539 nm , trait continu noir) - spectre d'excitation de fluorescence (émission 558 nm , trait continu gris)

Comme décrit dans la figure II.8., le spectre d'émission de fluorescence ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation. Le spectre d'excitation ne dépend pas plus de la longueur d'onde d'émission (figure II.9.)

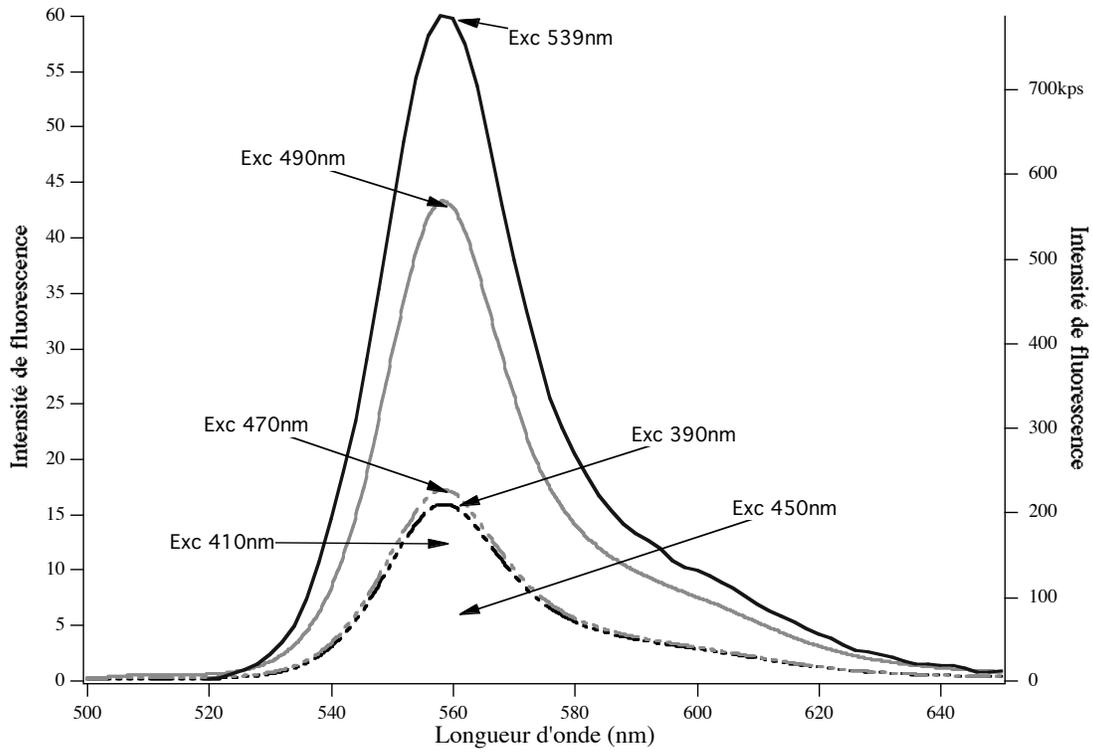


Figure II.8. Spectres d'émission de fluorescence du BODIPYTM Orange (extrait de billes de 40 nm carboxylate) dans le toluène.

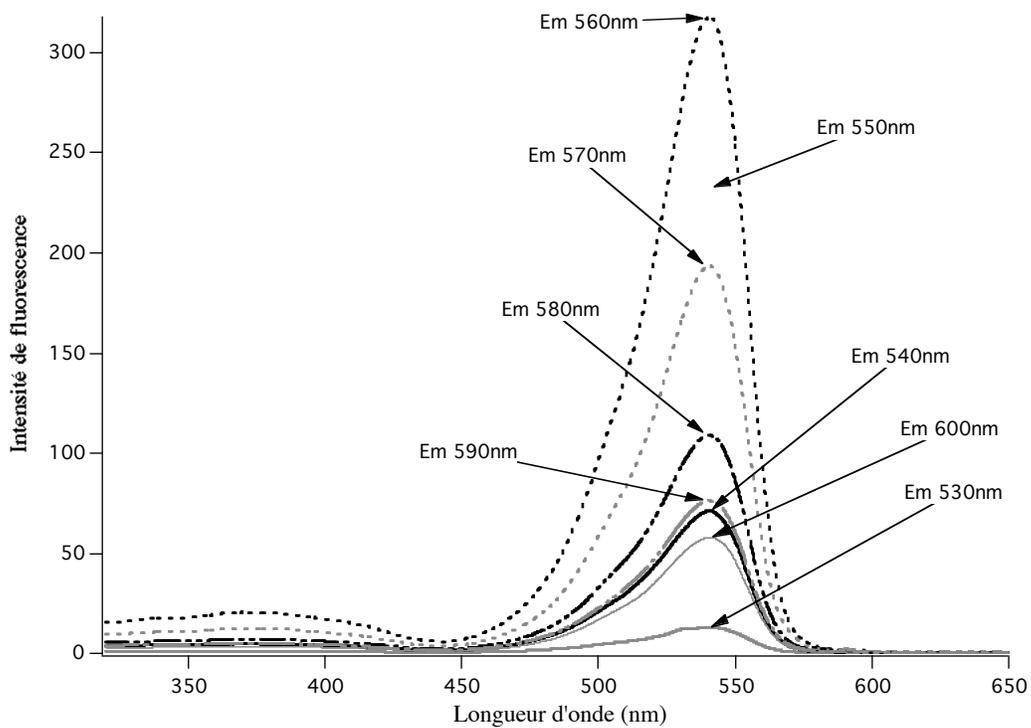


Figure II.9. Spectres d'excitation de fluorescence du BODIPYTM Orange dans le toluène (extrait de billes de 40 nm carboxylate).

Le rendement quantique mesuré dans le toluène est de 0,89 +/- 5% (référence Rhodamine 6G, voir annexe A). La molécule BODIPY Orange dans le toluène présente une spectroscopie simple et la présence de dimère est exclue. Le rendement de fluorescence est élevé.

Nous n'avons accès ni au coefficient d'absorption molaire ϵ_{BDY} du BODIPY « Orange » dans le toluène ni à la concentration en fluorophores dans les billes. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce coefficient d'absorption molaire est identique à celui donné dans le chloroforme.

En utilisant la loi de Beer-Lambert, à partir de la densité optique à 539 nm, A_{539} , et du coefficient d'absorption molaire, nous pouvons calculer la concentration en fluorophores C_{BDY} :

$$C_{BDY} = \frac{A_{539}}{\epsilon_{BDY} * l} \text{ en mol.L}^{-1} \quad (\text{II.1})$$

Connaissant le volume de l'échantillon V (en L), on peut en déduire le nombre de molécules de fluorophores N_{BDY} :

$$N_{BDY} = C_{BDY} * V * N_A \text{ en molécules } (N_A \text{ nombre d'Avogadro}) \quad (\text{II.2})$$

Connaissant le nombre de billes introduites au départ N_{billes} , le nombre $N_{BDY/bille}$ de fluorophores par bille est :

$$N_{BDY/bille} = \frac{N_{BDY}}{N_{billes}} \quad (\text{II.3})$$

Nous pouvons alors calculer la distance entre colorants dans une bille, en formulant l'hypothèse que chaque molécule de fluorophore occupe le centre d'une sphère, et que la distribution des molécules est uniforme sur tout le volume d'une bille. La sphère qu'occupe un fluorophore est définie par un diamètre, D_{BDY} (en m), qui correspond à la distance entre deux fluorophores. Comme le volume occupé par l'ensemble des fluorophores est égal à celui d'une bille, V_{bille} (en m³), on obtient :

$$D_{BDY} = 2 * \left(\frac{3 * V_{bille}}{4 * \pi * N_{BDY/bille}} \right)^{\frac{1}{3}} \text{ en m } \quad (\text{II.4})$$

$$\text{ou encore } D_{BDY} = 2 * \frac{R_{bille}}{N_{BDY/bille}^{1/3}} \text{ en m } \quad (\text{II.4 bis})$$

Nature des billes	Nombre de fluorophores par bille $N_{BDY / bille}$	Concentration en fluorophore dans les billes (mol.L ⁻¹) C_{BDY}	Distance entre fluorophore (nm) D_{BDY}
« Orange 100 sulfate »	2485	$4,45.10^{-3}$	8,9
« Orange 100 carboxylate »	4220	$1,56.10^{-2}$	5,9
« Orange 40 carboxylate »	280	$1,05.10^{-2}$	6,7
« Orange 20 carboxylate »	15	$1,70.10^{-2}$	5,7

Tableau II.4. *Résultats issus de l'extraction du fluorophore par la toluène.*

La concentration de chromophores est à peu près la même dans toutes les billes, quelle que soit leur taille. Nous calculons par ailleurs un rayon de Förster de 4,9 nm +/- 5 % (Cf. Annexe F, équation F3 121). Cette valeur est inférieure à celle mesurée par Karolin pour des dérivés tétra-alkyles¹⁰⁰. Les distances entre chromophores sont supérieures au rayon de Förster. Nous reviendrons sur ce tableau et ces commentaires plus loin.

II.2.3.2. *Spectroscopie de fluorescence résolue en temps*

Les solutions dans le toluène de « BODIPY Orange », extrait des billes, ont été étudiées par spectroscopie de fluorescence résolue en temps (Annexe B). L'excitation du laser est fixée à 497 nm, et la détection à 558 nm. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet du dioxygène dans les échantillons. En effet, les déclins de fluorescence sont identiques en présence de dioxygène ou non. Nous avons précédemment signalé la stabilité des BODIPY dans le benzène non désoxygéné¹¹². Nous avons donc travaillé dans le toluène en conditions oxygénées.

Les déclins de fluorescence sont identiques, quel que soit le type de bille dont est extrait le fluorophore. Ils peuvent être ajustés par une fonction mono-exponentielle (Figure II.10.). Nous trouvons alors une durée de vie de 4,38 +/- 0,05 ns.

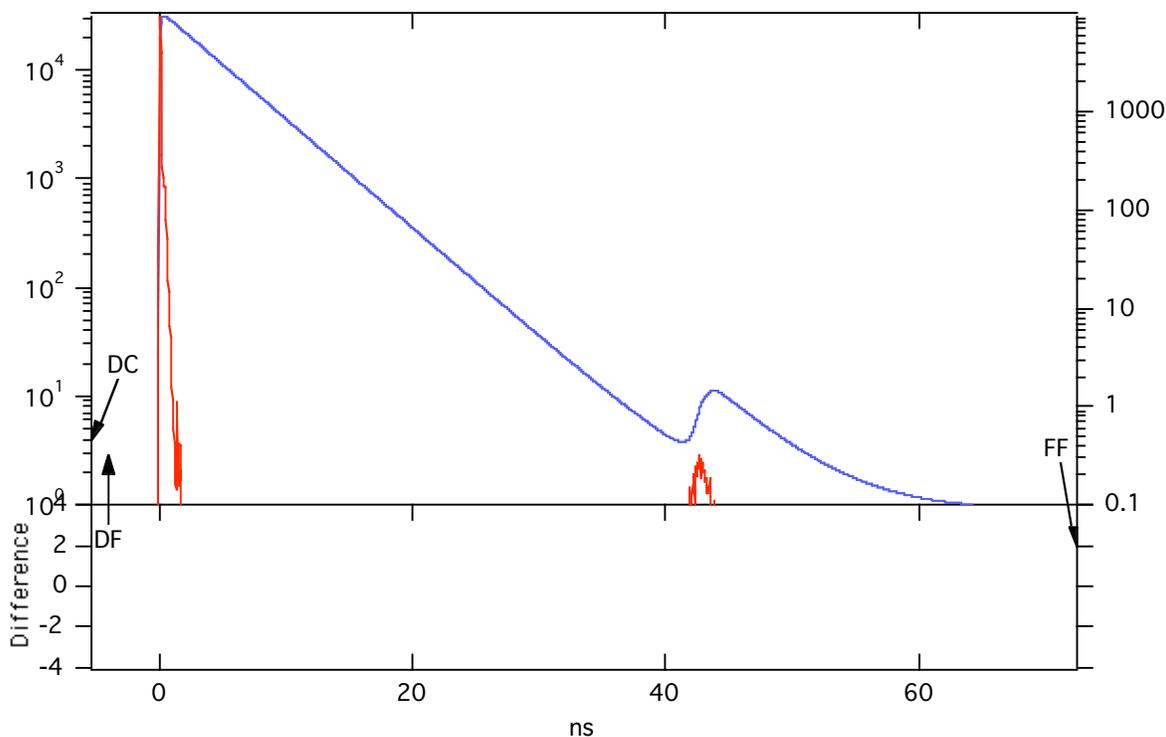


Figure II.10. Déclin de fluorescence du fluorophore « Bodipy Orange » dans le toluène, extrait des billes « 40 carboxylate » - Exc° : 497 nm ; Em : 558 nm
 DF, FF : domaine de l'ajustement ; DC : début de la convolution -Durée de vie 4,38 ns - $\chi^2=1,02$

Cette durée de vie est proche de celle de 4,57 ns du BODIPY-FL (acide 4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-3 propionique) déterminée dans le benzène¹⁰⁵.

La valeur de la durée de vie associée à celle du rendement quantique de fluorescence, nous permettent la mesure de la durée de vie radiative selon $\tau_{rad}=1/k_F=\tau_F/\phi_F=4,92$ ns.

II.2.4 Conclusions

Nous avons caractérisé le fluorophore « BODIPY Orange » dans le toluène, extrait des billes de latex. Nous avons montré qu'il présente un maximum d'absorption à 539 nm, et un maximum d'émission à 558 nm. La durée de vie de fluorescence a été évaluée à 4,38 ns.

Après avoir étudié le fluorophore dans le toluène, nous allons maintenant nous intéresser aux billes de latex afin de caractériser les propriétés optiques du support choisi pour élaborer des capteurs.

II.3. Propriétés photophysiques des « Fluospheres® Orange »

II.3.1. Spectroscopie d'absorption

II.3.1.1. Latex en suspension aqueuse

Nous présentons figure II.11., les spectres d'absorption de solutions commerciales de latex diluées. Les caractéristiques des échantillons présentés ici sont résumées dans le tableau II.5.

Nature des billes	Volume de solution mère (mL)	Volume d'eau (mL)	Nombre total de billes	Longueur d'onde au maximum d'absorption (nm)
« Orange 100 sulfate »	5	5	$1,05 \cdot 10^{11}$	542,5
« Orange 100 carboxylate »	6	4	$2,58 \cdot 10^{11}$	542
« Orange 40 carboxylate »	9	5	$9,9 \cdot 10^{12}$	542
« Orange 20 carboxylate »	13	4	$1,69 \cdot 10^{14}$	542

Tableau II.5. Caractéristiques des échantillons étudiés.

Il est important de noter que la structure de la bande d'absorption n'est pas modifiée par la matrice. La similitude des spectres dans le latex et après dilution dans le toluène nous permet de conclure qu'il n'y a pas de dimères dans les billes. Seul un décalage 3-3,5 nm vers le rouge est observé lorsque le fluorophore passe du toluène en matrice polystyrène. Ce déplacement bathochrome par rapport au toluène indique que le latex est un environnement moins polaire que le toluène (les BODIPY présentent un solvatochromisme inverse cf II.2.1.). Ceci pourrait exclure une localisation des molécules de fluorophore à l'interface eau-polystyrène. En effet, par des mesures de solvatochromisme sur la Rhodamine 6G ou le Vert de Malachite adsorbés sur des billes de polystyrène Nakashima⁴⁵ estime que la polarité locale de l'interface est proche de celle du méthanol.

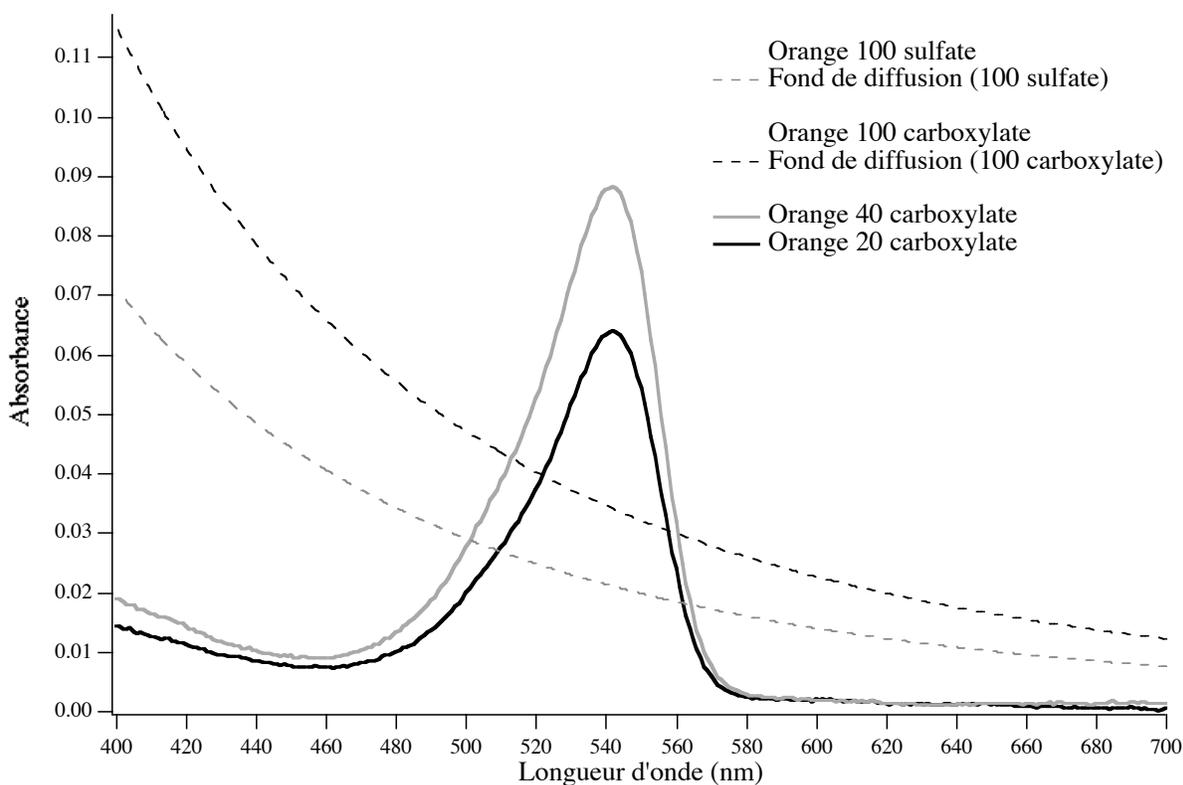


Figure II.11. Spectres d'absorption de solutions aqueuses de billes de latex « Orange ».

Pour les billes de 100 nm, on observe un fond de diffusion important (proportionnel à λ^{-4})¹²². Ce phénomène de diffusion Rayleigh est classique pour des suspensions colloïdales⁵.

Dans ce cas, il faut s'affranchir du fond de diffusion pour calculer le nombre de fluorophores à partir des spectres d'absorption. Pour cela, nous retranchons au spectre d'absorption des billes fluorescentes le fond de diffusion créé par des billes de même taille et incolores. Ne connaissant pas avec exactitude le coefficient d'absorption molaire dans la matrice, nous utiliserons un encadrement du coefficient donné dans le chloroforme : $66000 < \epsilon < 81400$ i.e $74000 \pm 10\%$ (en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).

Les concentrations (Tableau II.6) en fluorophore dans la matrice sont du même ordre de grandeur que celles évaluées après extraction dans le toluène (sauf pour les « Orange 100 sulfate », où manifestement l'extraction au toluène a été infructueuse). Les concentrations sont dix fois plus élevées que celle annoncée par Molecular Probes dans un de leurs brevets⁷³.

Nature des billes	Concentration en fluorophore dans les billes (mol.L ⁻¹) C_{BDY} CALCULS DANS LE TOLUENE	Concentration en fluorophore dans les billes (mol.L ⁻¹) C_{BDY_BILLE} CALCULS DIRECTS, SOLUTIONS COLLOIDALES
« Orange 100 sulfate »	$4,45.10^{-3}$	$1,5.10^{-2} < C_{BDY_BILLE} < 1,8.10^{-2}$
« Orange 100 carboxylate »	$1,56.10^{-2}$	$1,6.10^{-2} < C_{BDY_BILLE} < 1,9.10^{-2}$
« Orange 40 carboxylate »	$1,05.10^{-2}$	$1,3.10^{-2} < C_{BDY_BILLE} < 1,6.10^{-2}$
« Orange 20 carboxylate »	$1,7.10^{-2}$	$1,2.10^{-2} < C_{BDY_BILLE} < 1,6.10^{-2}$

Tableau II.6. *Concentrations en fluorophores dans les billes étudiées :*
a) après dissolution des billes dans le toluène
b) à partir des spectres d'absorption des solutions colloïdales.

Les méthodes envisagées pour calculer le nombre de fluorophores dans une bille souffrent toutes deux d'incertitude. En effet, lors de la dissolution de la matrice dans le toluène, une question se pose : l'extraction du colorant dans le toluène est-elle totale ? Ne reste-t-il pas du colorant dissous dans la phase microhétérogène (composée de filaments de polymère et d'eau). De même, lors de la filtration, nous pouvons nous demander si une partie du fluorophore ne s'adsorbe pas sur la célite . Quant à la seconde méthode, à partir des spectres d'absorption des solutions colloïdales, nous ne connaissons pas le coefficient d'absorption molaire du fluorophore dans la matrice. De plus, pour trouver le spectre « intrinsèque » du BODIPY™ dans les billes de 100 nm de diamètre, la soustraction du fond de diffusion au spectre « brut » est une approximation. Comme l'incertitude sur la filtration est grande, la seconde méthode semble plus fiable. Dans la suite de l'exposé, nous nous servirons éventuellement des valeurs calculées directement à partir des spectres d'absorption. Il faut surtout remarquer que les deux méthodes permettent de conclure à l'égalité des concentrations quelle que soit la taille des latex. Ceci suggère une répartition uniforme du colorant dans le volume du latex.

Si nous utilisons cette hypothèse pour calculer les distances entre fluorophores, nous trouvons des résultats pour les billes de 20, 40 et 100 nm du même ordre de grandeur (+/- 0,5 nm).

Nature des billes	Nombre de fluorophores par bille N_{BDY_BILLE} CALCULS DIRECTS, SOLUTIONS COLLOIDALES	Nombre de fluorophores / bille $N_{BDY / bille}$ CALCULS DANS LE TOLUENE	Distance entre fluorophore (nm) D_{BDY_BDY} CALCULS DIRECTS, SOLUTIONS COLLOIDALES	Distance entre fluorophore (nm) D_{BDY} CALCULS DANS LE TOLUENE
« Orange 100 sulfate »	$8340 < N_{BDY_BILLE} < 10200$	2485	$5,6 < D_{BDY_BDY} < 6$	8,9
« Orange 100 carboxylate »	$4320 < N_{BDY_BILLE} < 5280$	4220	$5,45 < D_{BDY_BDY} < 5,8$	5,9
« Orange 40 carboxylate »	$340 < N_{BDY_BILLE} < 420$	280	$5,9 < D_{BDY_BDY} < 6,3$	6,7
« Orange 20 carboxylate »	$11 < N_{BDY_BILLE} < 14$	15	$5,8 < D_{BDY_BDY} < 6,2$	5,7

Tableau II.7. Distances entre fluorophores, et nombre de fluorophores dans les billes étudiées, comparaison des résultats après extraction au toluène et à partir des spectres d'absorption.

La répartition en colorant est une inconnue du système. Nous pouvons envisager un autre type de distribution simple que celle en volume. En tenant compte des données des spectres d'absorption des solutions colloïdales, nous formulons l'hypothèse d'une répartition en surface du colorant, nous pouvons calculer la distance (D_{BDY_BDY}) qui sépare deux fluorophores. Supposons que la surface occupée par un colorant soit un disque, nous notons r_{BDY} le rayon de ce disque. La distance entre deux molécules (D_{BDY_BDY}) est deux fois ce rayon. R_{bille} est le rayon d'une bille de latex. La surface occupée par tous les fluorophores sur une bille est la surface totale de cette bille, nous pouvons donc écrire :

$$N_{BDY_bille} * 4 * \pi * r_{BDY}^2 = 4 * \pi * R_{bille}^2$$

$$r_{BDY} = \frac{R_{bille}}{\sqrt{N_{BDY_bille}}} \quad (\text{II.5.})$$

$$D_{BDY_BDY} = 2 * \frac{R_{bille}}{\sqrt{N_{BDY_bille}}}$$

Nous présentons au Tableau II.8. les résultats des calculs de distance entre fluorophores dans l'hypothèse d'une répartition en surface :

	Orange 100 sulfate	Orange 100 carboxylate	Orange 40 carboxylate	Orange 20 carboxylate
Distance (nm)	1,3	1,4	2,4	4,2

Tableau II.8. *Evaluation des distances entre fluorophores dans les billes dans l'hypothèse d'une répartition en surface.*

Nous trouvons des distances d'autant plus faibles entre BODIPY que la taille de la bille augmente.

II.3.1.2. *Influence du pH et de la force ionique*

Nous avons étudié les effets éventuels de pH et de la force ionique (Cf. Annexe A).

Nous avons utilisé les tampons suivants:

Force ionique	0,1	0,1	0,1	0,1	1	1	1	1
pH	3,5	5,5	7,5	9,5	3,5	5,5	7,5	9,5

Tableau II.9. *Caractéristiques des tampons en pH et force ionique.*

- Pour les billes « carboxylate » :

A force ionique donnée, nous n'avons constaté aucun effet du pH sauf à pH=3,5. A ce pH les latex flocculent car les groupes carboxyles sont protonés ($pK_a = 4,5$ environ). Ce phénomène d'agrégation se traduit sur les spectres d'absorption par un fond de diffusion très prononcé. Après 24 heures, les billes s'accumulent au fond des tubes. La baisse de l'absorbance associée à la floculation est d'autant plus rapide que la force ionique est élevée.

En excluant les résultats obtenus à pH=3,5, nous n'avons observé aucun effet de la force ionique à pH donné. Nous n'avons pas non plus vu de différence avec les spectres obtenus dans l'eau.

Nous présentons ici quelques résultats concernant les latex « Orange 40 carboxylate » (Figure II.12.).

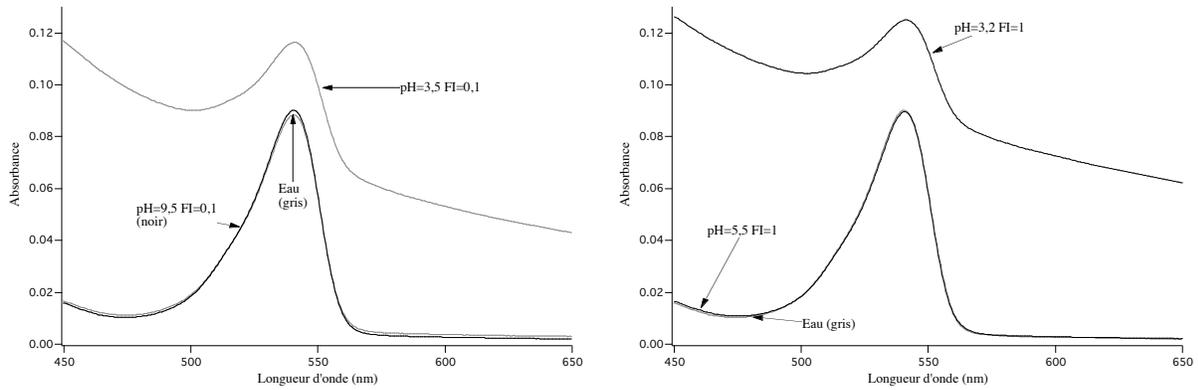


Figure II.12. Spectres d'absorption des latex « Orange 40 carboxylate » en fonction du pH et de la force ionique.

- Pour les billes « sulfate » :
quels que soient le pH et la force ionique, nous n'avons observé aucun effet.

II.3.2. Spectroscopie de fluorescence stationnaire

II.3.2.1 Latex en suspension aqueuse

Nous présentons à la figure II.13. les spectres d'émission de fluorescence (excitation à 497 nm) des quatre types de billes étudiés.

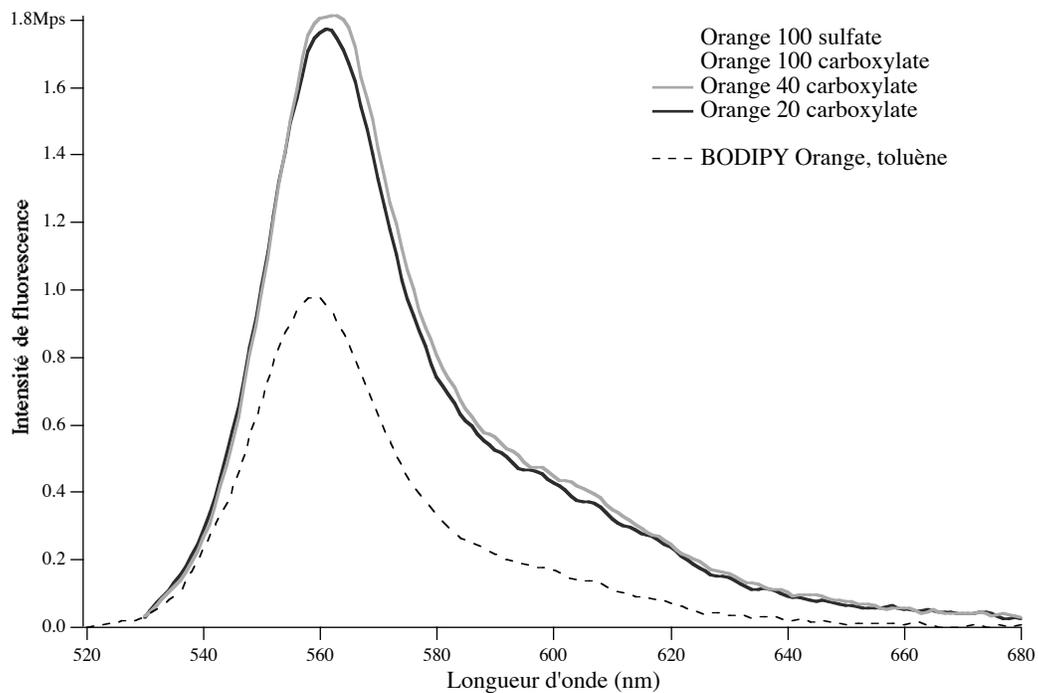


Figure II.13. Spectres d'émission de fluorescence de solutions aqueuses de billes de latex « Orange » - Excitation 497 nm -

3 Lorsque nous comparons, pour les mêmes échantillons que précédemment, les spectres d'émission de fluorescence, nous constatons qu'ils sont identiques avec un maximum à 562 nm. Comme pour les spectres d'absorption, nous remarquons un déplacement vers le rouge du maximum de fluorescence par rapport au toluène.

Le spectre d'excitation de fluorescence est identique au spectre d'absorption, ainsi il n'existe qu'une espèce à l'état fondamental. Le spectre d'excitation est l'image dans un miroir du spectre d'émission de fluorescence. Le spectre d'excitation de fluorescence ne dépend pas de la longueur d'onde d'émission. Tous ces caractères étaient aussi ceux du Bodipy en solution. Les interactions entre chromophores seraient donc faibles à l'intérieur des latex.

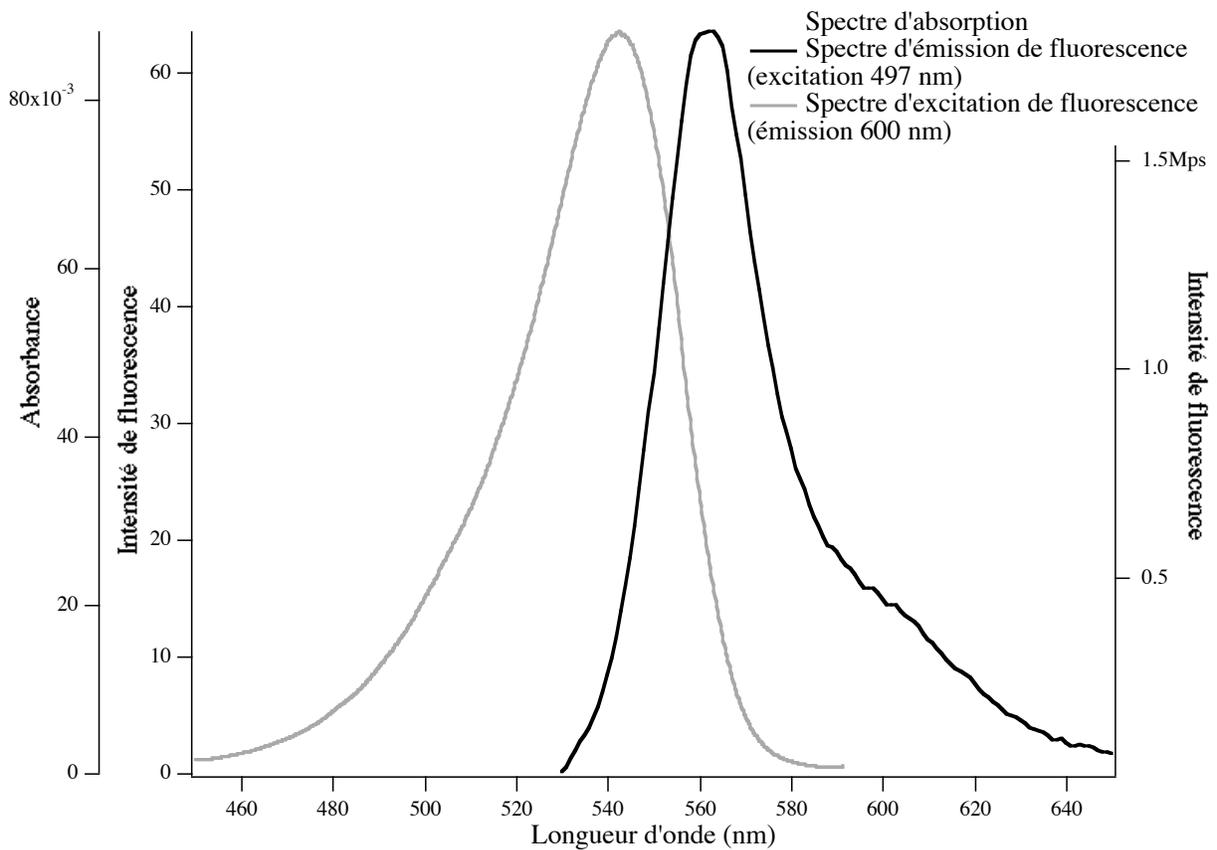


Figure II.14. *Latex « Orange 40 carboxylate » (9 μ L + 5 mL eau). Spectre d'absorption (trait pointillé noir) ; Spectre d'émission (excitation 497 nm, trait continu noir) ; Spectre d'excitation (émission 600 nm ; trait continu gris)*

Les spectres du BODIPYTM Orange sont aussi très proches tant en absorption qu'en émission, dans le toluène et dans la matrice polymérique. Du fait de cette similarité, nous pouvons confirmer que les interactions entre chromophores à l'état fondamental sont très faibles¹²³. Cependant, un déplacement vers le rouge, d'environ 3 nm, est observé dans les billes par rapport au toluène. Ce

décalage vers le rouge a déjà été observé pour la tétraméthylrhodamine ou la fluorescéine, lorsque ces molécules sont liées de façon covalente à la surface de particules de polystyrène⁵⁸. Les spectres de la rhodamine B, du vert de malachite, de la Rhodamine 6G ont également été comparés dans le toluène, et à la surface de billes de polystyrène : un léger décalage vers le rouge a été là aussi observé⁴⁵. De tels déplacements sont interprétés usuellement en terme de changement de microenvironnement.

Nous avons mesuré le rendement quantique de fluorescence des billes avec la Rhodamine 6G, comme référence (Cf. Annexe A). Nous avons aussi calculé le rayon de Förster dans les billes (Cf. Annexe F, équation (F.3) ¹²¹) :

Latex	« Orange 100 sulfate »	« Orange 100 carboxylate »	« Orange 40 carboxylate »	« Orange 20 carboxylate »
Rendement quantique	*	0,59	0,72	0,55
Rayon de Förster (nm)	*	4,8	5	4,8

Tableau II.10. *Rendement quantique de fluorescence des billes étudiées, rayon de Förster du «BODIPY Orange» dans les matrices polymériques. (*) calcul impossible à cause d'un fond de diffusion trop important.*

Le fond de diffusion dû aux billes de 100 nm rend la mesure et le calcul du rayon de Förster délicats, voire impossible. Dans le cas des billes « sulfate », nous n'avons pas été en mesure, malgré la soustraction d'un fond de diffusion de billes non colorées, d'accéder à des valeurs numériques plausibles.

Les rendements quantiques dans le polystyrène, sont plus faibles que celui dans le toluène (0,89). Ceci peut être mis en relation avec un possible « quenching » statique par des impuretés. Le rayon de Förster dans le polystyrène est du même ordre de grandeur que dans le toluène. Il est systématiquement inférieur à la distance entre fluorophores pour une répartition en volume (tableau II.7). Dans le cas d'une distribution en surface le rayon de Förster est toujours inférieur à la distance entre chromophores (tableau II.8). Nous voyons par là que la répartition des molécules de BODIPY dans la matrice conditionne un éventuel homotransfert.

Conclusions :

Comme nous l'avons signalé plus haut, le fluorophore est peu sensible à son environnement. Ses propriétés photophysiques sont plutôt conservées dans les billes de latex. Seul un décalage vers le rouge (3 nm environ) des spectres est observé, ainsi qu'une diminution du rendement quantique (qui reste, cependant, élevé).

II.3.2.2. Effet du pH et de la force ionique

Nous avons étudié les spectres de fluorescence en fonction du pH et de la force ionique, dans les mêmes conditions que précédemment.(cf II.3.1.2.)

- Pour les billes « sulfate » : quels que soient le pH et la force ionique, nous n'avons observé aucun effet.
- Pour les billes « carboxylate » :

Intéressons-nous tout d'abord à la gamme de pH : 5,7-7,5-9,5 (Figure II.15.) :

- * A force ionique constante, les spectres de fluorescence sont identiques.
- * A pH constant, nous n'avons observé aucun effet de la force ionique.
- * En comparant avec les spectres obtenus dans l'eau (pH=6,5) nous n'avons pas non plus observé d'effet.
- * En laissant les échantillons 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière, nous n'avons observé aucune évolution.

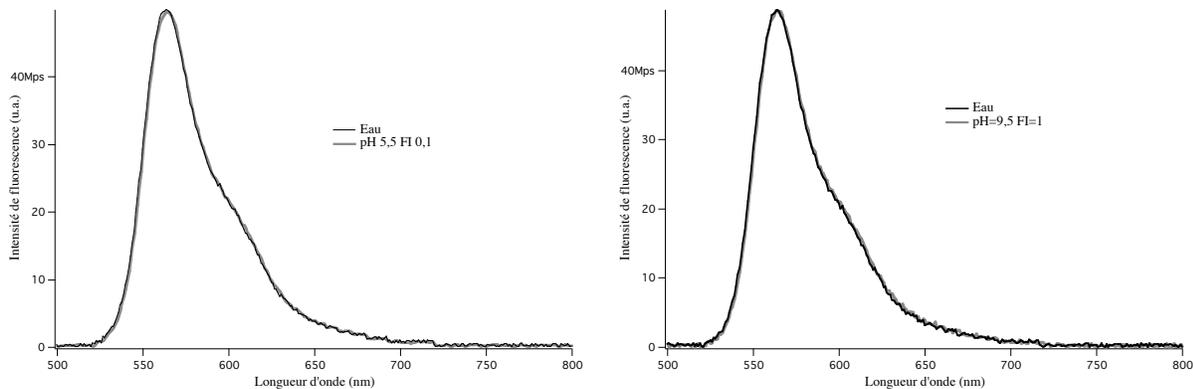


Figure II.15. Effet du pH et de la force ionique sur les latex « Orange 40 carboxylate »

Le cas pH=3,5 est là encore particulier (Figure II.16.). L'intensité de fluorescence est beaucoup faible que dans l'eau ou tous les autres tampons. Elle décroît avec le temps comme nous l'avons déjà vu dans le cas des spectres d'absorption (cf §.II.3.1.2). Ceci est lié à l'agrégation et à la floculation des billes. Après 24 heures, les billes ont « précipité » au fond et la fluorescence mesurée est celle du « surnageant ».

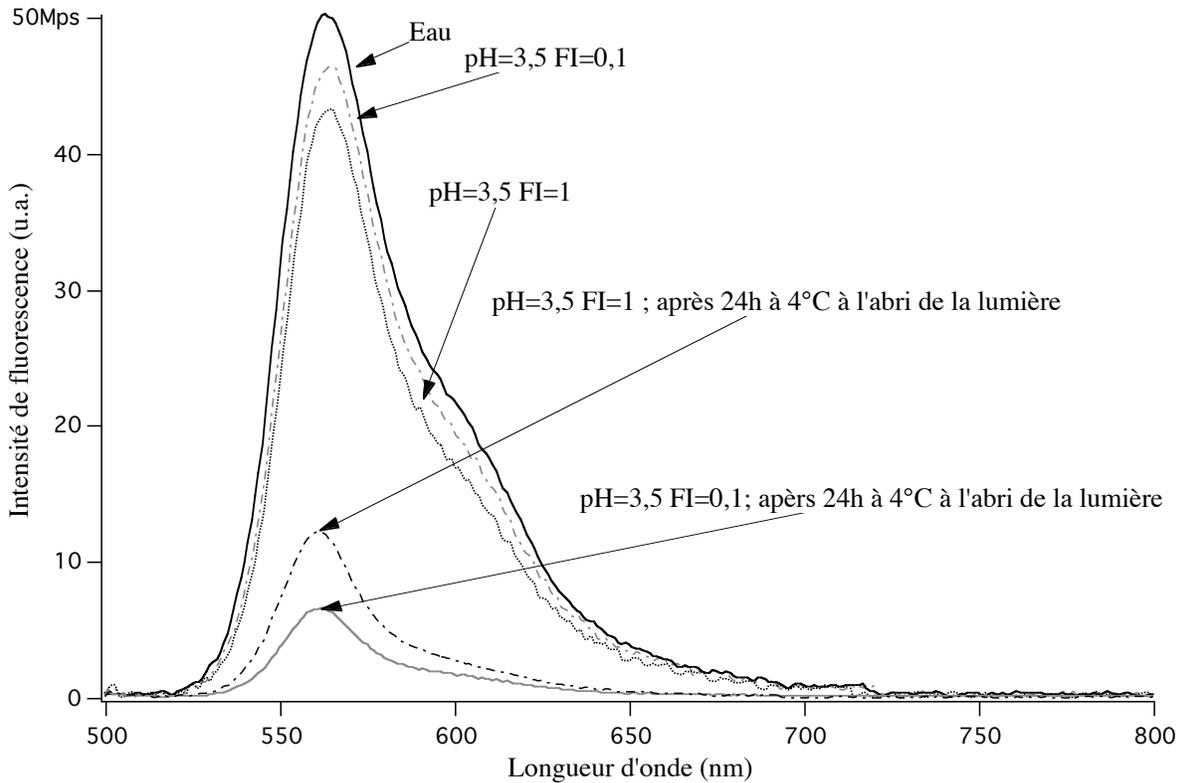


Figure II.16. Effet du $\text{pH}=3,5$ et de la force ionique sur l'intensité de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate »

Conclusion : si l'on travaille à $\text{pH} > \text{pK}_a + 1$, il n'y a aucun effet du pH . La force ionique ne joue pas non plus. Nous avons travaillé dans de l'eau distillée et désionisée ($\text{pH}=6,5$).

II.3.3. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps

II.3.3.1. Latex en suspension aqueuse

Nous étudions ici les déclins de fluorescence résolue en temps des échantillons de latex présentés dans le tableau II.5. Nous avons travaillé en conditions oxygénées. En effet, les déclins en présence ou en absence de dioxygène ne présentent pas de différence. Par souci de simplicité, nous nous limiterons dans cette étude à des ajustements mono ou multiexponentiels aux moindres carrés, par l'algorithme de Levenberg-Marquardt^{124,125}. Les déclins sont normalisés au maximum.

Nous comparons à la figure II.17. les déclins de toutes les billes : « Orange 100, 20, 40 carboxylate » et « Orange 100 sulfate ».

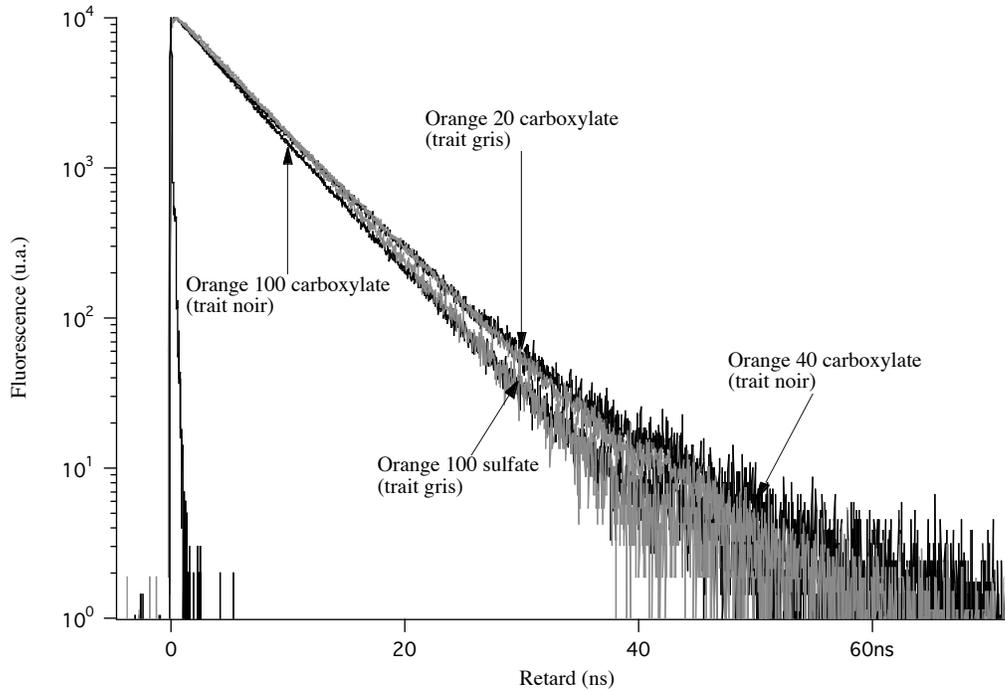


Figure II.17. Comparaison des déclin de fluorescence des quatre types de billes fluorescentes étudiées - excitation 497 nm- émission 562 nm.

Les déclin sont proches bien que chaque type de bille ait sa « propre » signature. Nous comparons tout d'abord à la figure II.18., les billes de diamètre équivalent, portant des groupes de surface différents : les « Orange 100 carboxylate » et les « Orange 100 sulfate ».

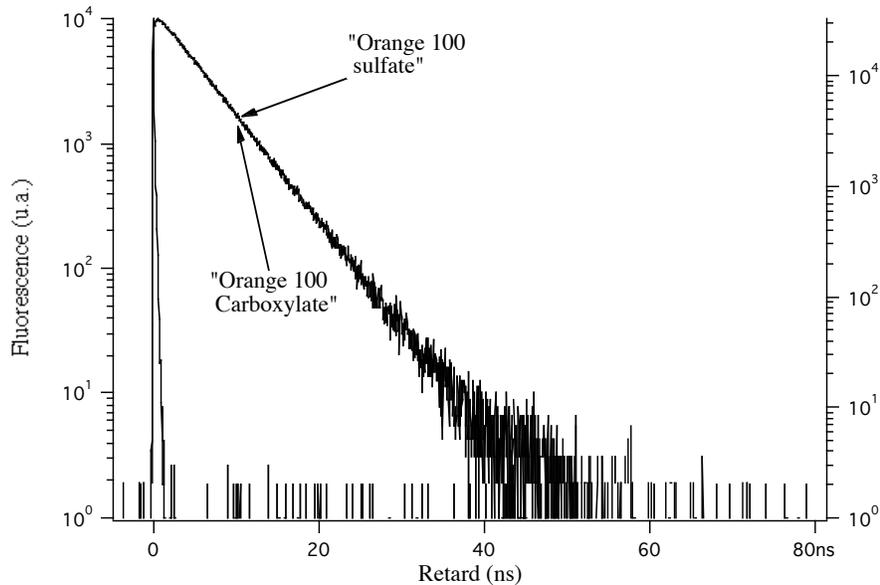


Figure II.18. Déclin de fluorescence résolue en temps de billes de latex « Orange 100 carboxylate » et « Orange 100 sulfate », en suspension dans de l'eau. Excitation: 497 nm ; émission : 562 nm.

Les déclin, présentés figure II.18., sont différents. Les ajustements (figure II.19) révèlent que le déclin des billes « Orange 100 sulfate » est mono-exponentiel avec une durée de vie de 5,2 ns +/- 0,1 ns ; alors que le déclin des « Orange 100 carboxylate » apparaît bi-exponentiel avec les durées de vie suivantes : 5,79 +/- 0,3 ns et 4,07 +/- 0,3 ns. La première durée de vie contribue à hauteur de 63% dans le déclin, et la seconde à 37%.

Nous remarquons tout d'abord que la durée de vie de 5,2 ns dans le cas des « Orange 100 sulfate » est supérieure à celle de 4,38 ns mesurée dans le toluène, bien que le rendement de fluorescence soit plus faible dans les billes. La matrice des « Orange 100 sulfate » modifie la durée de vie du « BODIPY Orange ». Elle peut en particulier limiter le « quenching » par le dioxygène. De plus, le fluorophore immobilisé et protégé par la matrice ne subit plus de relaxation « par chocs » avec le solvant, ni de « quenching » par des impuretés en solution. Ainsi la matrice « protège » le fluorophore, et sa durée de vie augmente.

Le déclin de fluorescence devient bi-exponentiel dans la matrice des « Orange 100 carboxylate » : celle-ci doit présenter des hétérogénéités. Il n'est pas rare, en effet, qu'un fluorophore incorporé dans un polymère voie son déclin devenir multi-exponentiel ou non-exponentiel^{126,127,5,128}.

Ici, nous pouvons expliquer la différence de comportement, par exemple, par la différence de microenvironnement dans les microsphères, différence due à la méthode de polymérisation. Ainsi dans les « Orange 100 carboxylate », il se peut qu'il y ait deux populations de fluorophores : les uns « imprégnés » dans la matrice de polystyrène, les autres dans les « cheveux » de polymère fonctionnalisés par des groupes carboxyles (Cf. Figure II.2). Comme dans le cas des « Orange 100 sulfate » la population au coeur de la matrice de polystyrène présenterait une durée de vie de l'ordre de 5,2-5,8 ns. La faible différence (0,6 ns environ) entre « Orange 100 carboxylate » et « Orange 100 sulfate » peut s'expliquer par un effet de la matrice de polystyrène. Quant aux fluorophores plus en surface dans les « Orange 100 carboxylate », ils pourraient présenter une durée de vie d'environ 4 ns : ils seraient plus sensibles aux effets de « quenching » ou photodestruction car plus proches du solvant, et moins protégés que ceux au coeur de la matrice.

Pour expliquer l'origine de la multi-exponentialité nous pouvons également envisager une autre hypothèse : celle de la diffusion de l'excitation vers des sites non fluorescents de la bille.

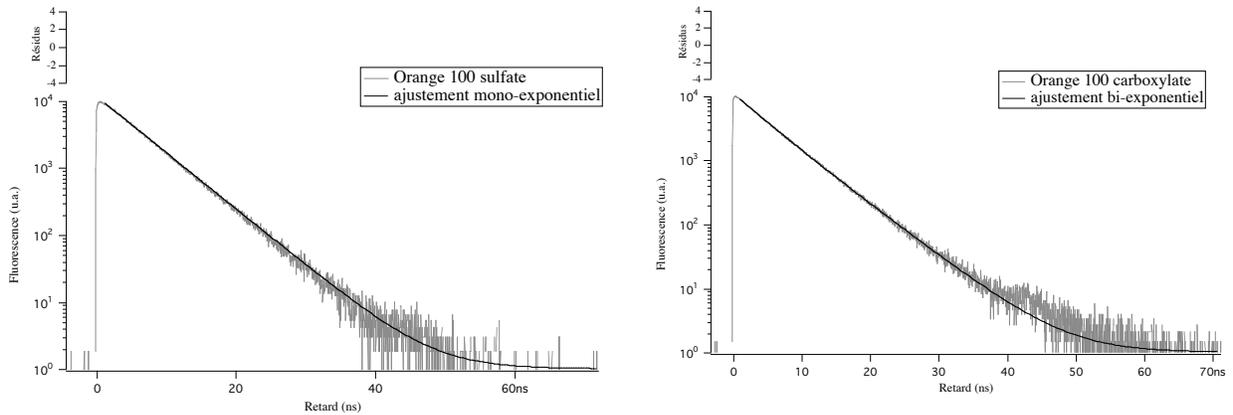


Figure II.19. *Comparaison des ajustements, et résidus pour les ajustements des déclin des solutions aqueuses de billes « Orange 100 carboxylate », et « Orange 100 sulfate ».*

Détaillons plus avant les déclin des billes de plus petites tailles (« Orange 40 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate »). Voici tout d'abord le déclin des billes de 40 nm (Figure II.20.).

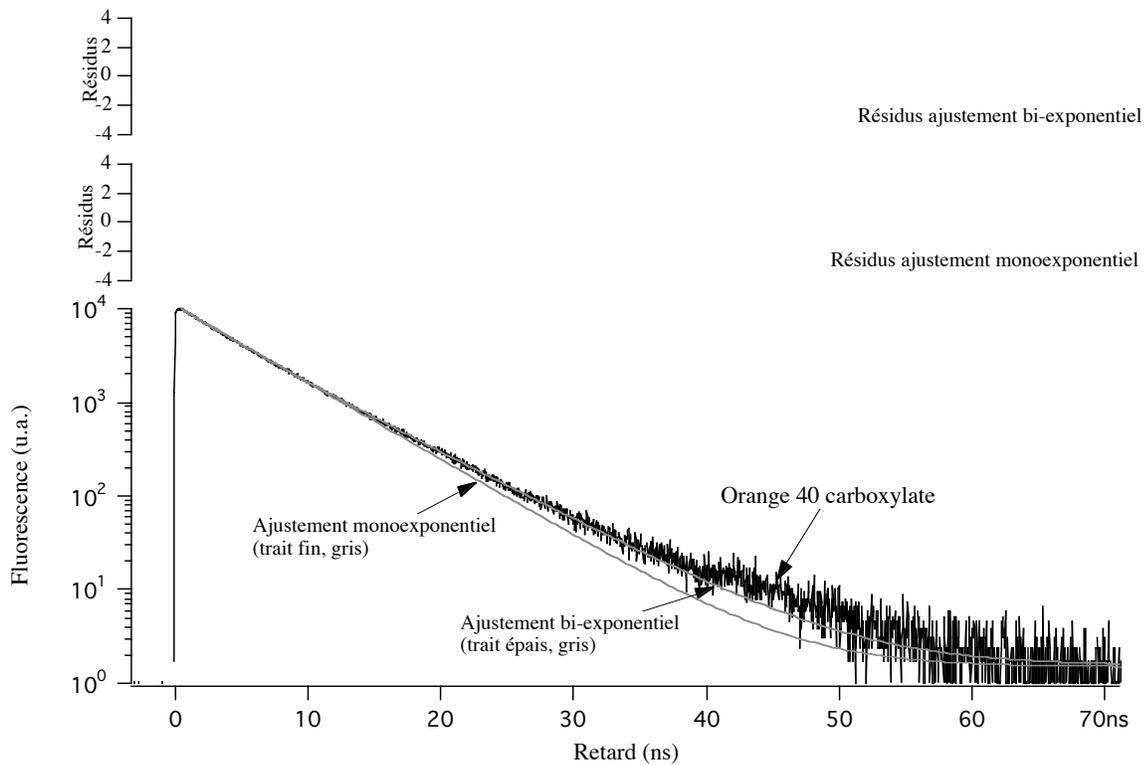


Figure II.20. *Déclin de fluorescence des « Orange 40 carboxylate » en suspension aqueuse - Comparaison des ajustements et résidus -excitation 497 nm- émission 562 nm.*

Un ajustement mono-exponentiel n'est pas satisfaisant. En revanche un ajustement bi-exponentiel semble convenir. Les paramètres de cet ajustement sont : $6,1 \pm 0,2$ ns à hauteur de 75%, et $3,5 \pm 0,3$ ns à hauteur de 25%. Nous remarquons que la durée de vie « longue », autour de 6 ns correspond à celle des « Orange 100 carboxylate ». La durée de vie « courte » est plus faible et contribue à une hauteur moindre dans le déclin. Nous présentons à la figure II.21. le déclin de fluorescence des billes « Orange 20 Carboxylate ».

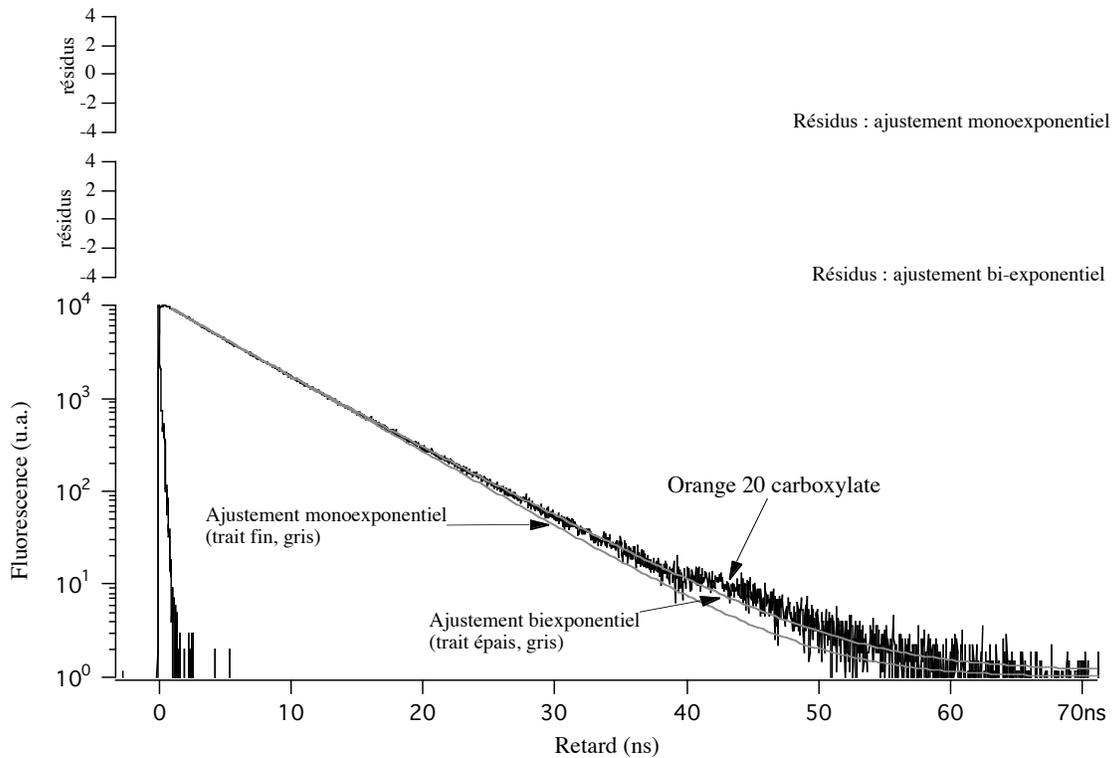


Figure II.21. Déclin de fluorescence des « Orange 20 carboxylate » en suspension aqueuse - Comparaison des ajustements et résidus - excitation 497 nm- émission 562 nm.

Ces billes présentent également un déclin bi-exponentiel avec : $6 \pm 0,2$ ns - 73% et $4 \pm 0,3$ ns - 27%.

Il est à priori difficile de faire une corrélation entre durées de vie, poids des composantes et nature des billes (tableau II.11.). Nous pouvons cependant faire le constat suivant : les billes « carboxylate » se distinguent des billes « sulfate » par un comportement bi-exponentiel et non mono-exponentiel.

Nature des billes	Durée de vie « longue » Poids	Durée de vie « courte » Poids
« Orange 100 sulfate »	5,2 ns - 100%	--
« Orange 100 carboxylate »	5,8 ns - 63 %	4,1 ns - 37%
« Orange 40 carboxylate »	6 ns - 75 %	3,4 ns - 25%
« Orange 20 carboxylate »	6 ns - 73 %	4 ns - 27 %

Tableau II.11. *Bilan des ajustements des déclins de fluorescence des billes de latex en suspension aqueuse - excitation 497nm - émission 562nm.*

Pour essayer d'aller plus loin dans notre analyse, nous pouvons partir de l'hypothèse énoncée précédemment et considérer deux populations de fluorophores : une au coeur du polymère (durée de vie 6 ns environ) et une autre en surface dans les « cheveux ». Il est alors possible d'essayer un nouvel ajustement bi-exponentiel, en fixant une durée de vie à 6 ns. Nous supposons ainsi que, quelle que soit la taille des billes, les fluorophores « du coeur » se trouvent dans le même environnement, et que leur concentration est identique. La durée de vie plus courte correspondrait à une population de fluorophores « en surface », plus sensibles aux effets de relaxation au solvant car à l'interface matrice-eau. Nous pouvons dresser le tableau suivant :

Nature des billes	Durée de vie « longue » Poids	Durée de vie « courte » Poids
« Orange 100 carboxylate »	6 ns - 40 %	4,3 ns - 60 %
« Orange 40 carboxylate »	6 ns - 83%	3,2 ns - 17%
« Orange 20 carboxylate »	6 ns - 76 %	4 ns - 24 %

Tableau II.12. *Résultats d'un ajustement bi-exponentiel en fixant une des composantes.*

Nous pouvons ici faire remarquer que la durée de vie courte observée (environ 4 ns) dans les billes « carboxylate » est proche de celle observée dans le solvant toluène (4,38 ns). Ce qui pourrait être une signature de molécules de BODIPY dans un environnement plus proche de celui du solvant que de celui d'une matrice rigide.

Le comportement des billes « Orange 100 carboxylate » se distingue nettement des autres billes. En effet, le poids de la composante longue est plus petit que celui de la composante courte. Nous observons la tendance inverse pour les autres billes. Si l'hypothèse de deux populations dans les billes est juste, de telles observations signifieraient qu'environ 20% des fluorophores se trouvent

dans les « brins » de polymères pour les « Orange 20 carboxylate » et les « Orange 40 carboxylate », alors que 60 % des fluorophores seraient dans la « chevelure » pour les « Orange 100 carboxylate ».

La durée de vie courte des billes « Orange 40 carboxylate » est plus courte que celle des « Orange 20 carboxylate » ou des « Orange 100 carboxylate ». Les fluorophores seraient plus sensibles aux effets de relaxation au solvant, peut-être parce que la taille des brins est plus courte, ou que ceux-ci sont plus espacés, et donc les fluorophores sont moins protégés.

A la lumière de telles disparités nous devons nous interroger, sur la nature de la synthèse utilisée pour les billes : est-ce la même selon le type de billes ? Les « cheveux » autour des billes sont-ils de même nature, de même taille ? Si oui, le « chargement » en colorant se fait-il de la même façon, dans les mêmes conditions ? Les billes de plus petite taille retiendraient plus de colorant au coeur que dans les brins, et l'inverse est observé pour les billes de 100 nm de diamètre.

Les déclin du fluorophore dans la matrice sont complexes. C'est pourquoi le modèle bi-exponentiel est sans doute trop restrictif. Il ne peut rendre compte intégralement de la réalité physique, en particulier de la notion de microenvironnements dans une matrice polymérique.

Pour pouvoir comparer entre eux ces différents systèmes, nous nous servons désormais d'un paramètre moyen comme la durée de vie moyenne $\bar{\tau}$, définie comment suit, pour décrire un déclin de fluorescence⁵ :

$$\bar{\tau} = \frac{\int_0^{\infty} t * I(t) * dt}{\int_0^{\infty} I(t) * dt} \quad (\text{II.6})$$

Ce paramètre a été utilisé pour caractériser le comportement d'un fluorophore dans une matrice polymérique¹²⁶ ou adsorbé à la surface d'une bille de polystyrène¹²⁸.

Nous obtenons le tableau suivant :

	Orange 100 carboxylate	Orange 40 carboxylate	Orange 20 carboxylate
durée de vie moyenne $\bar{\tau}$ (ns)	5,3	5,59	5,6
$\bar{k} = \frac{1}{\bar{\tau}}$ (ns ⁻¹)	0,189	0,179	0,178

Tableau II.13. *Caractéristiques moyennes des déclin de fluorescence des billes.*

II.3.3.2. Influence du pH et de la force ionique

Nous avons travaillé avec les mêmes milieux tamponnés que ceux décrits en absorption et en fluorescence stationnaire. Cependant, nous n'avons étudié que les solutions où les colloïdes sont stables.

Nous n'avons observé aucun effet du pH à force ionique constante, et aucun effet de la force ionique à pH constant. Les déclinés sont identiques à ceux mesurés dans l'eau. (Figure II.22.)

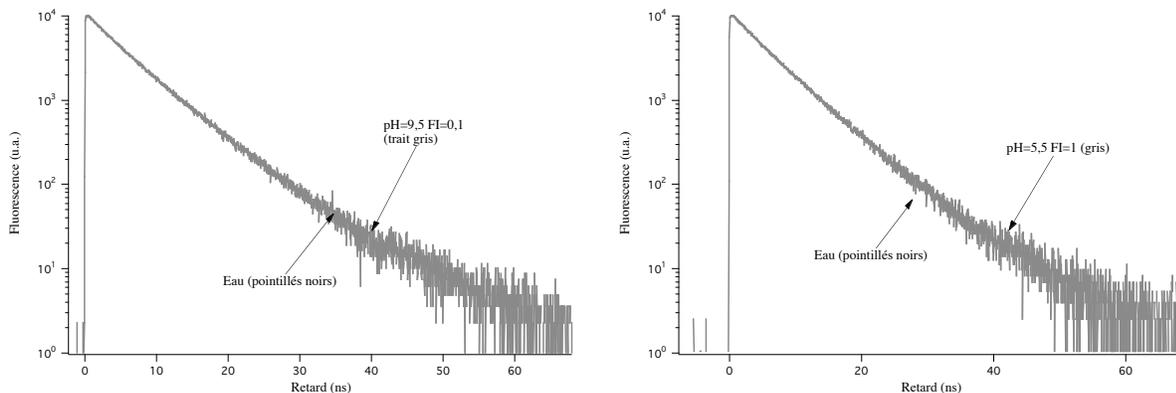


Figure II.22. Déclinés de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate » en fonction du pH, et de la force ionique.

Conclusion :

Il faut veiller à ce que les particules restent en suspension, et ne s'agrègent pas. Pour cela il suffit d'éviter la protonation et la complexation des carboxyles. Nous pouvons donc travailler dans l'eau désionisée (pH = 6,5 environ) ou dans tout tampon dont le pH soit supérieure au pK_a des groupes carboxyles de surface. A titre indicatif, nous avons aussi réalisé des expériences avec du perchlorate de calcium (le groupe carboxyle est connu pour être un bon complexant des ions calcium)¹²⁹. Nous avons montré que le seuil critique se situe autour d'une concentration de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ (pour un échantillon contenant $1,1 \cdot 10^{13}$ billes).

Pour les billes « sulfate » : quels que soient le pH et la force ionique, nous n'avons observé aucun effet.

II.3.4. Anisotropie de fluorescence

II.3.4.1. Anisotropie d'excitation stationnaire

Nous avons balayé en longueur d'onde l'excitation de fluorescence et fixé celle d'émission à 560 nm. Les échantillons sont des suspensions de latex dans l'eau. Nous avons trouvé une anisotropie constante sur toute la bande d'absorption des latex (de 490 à 560 nm), ce qui montre qu'une seule transition participe à la bande d'absorption.

II.3.4.2. Anisotropie d'émission stationnaire

Nous avons étudié des échantillons de latex en solution aqueuse. Le spectre d'émission de fluorescence est enregistré en polarisation horizontale à l'émission et verticale à l'excitation : S_{vh} . Puis nous avons mesuré le spectre d'émission avec une polarisation verticale à l'émission ainsi qu'à l'excitation : S_{vv} . Le facteur g ($g=S_{hv}/S_{hh}$) de l'appareil a été mesuré. Nous avons ensuite calculé l'anisotropie, a , selon la formule :

$$a = \frac{S_{vv} - g * S_{vh}}{S_{vv} + 2 * g * S_{vh}} \quad (\text{II.7})$$

Les échantillons de billes de 100 nm sont diffusants, or la lumière diffusée par un échantillon isotrope est totalement polarisée⁵. Pour s'affranchir de ce problème, nous avons réalisé les spectres d'émission d'échantillons de billes non fluorescentes que nous avons soustraits aux spectres de fluorescence afin de les corriger de l'effet de la diffusion.

L'excitation a été fixée à 497 nm (identique à celle du laser dans les expériences résolues en temps).

Nous avons trouvé les résultats suivants :

	Orange 100 sulfate	Orange 100 carboxylate	Orange 40 carboxylate	Orange 20 carboxylate
Anisotropie stationnaire à l'émission	0,04	0.02	0,01	0,013

Tableau II.14. *Anisotropies stationnaires en émission des billes de latex en suspension aqueuse*

Les mouvements sont très restreints voire inexistant dans une matrice polymère¹³⁰. Les fluorophores, immobilisés, ne peuvent donc pas dépolariiser la lumière par rotation. L'anisotropie attendue pour des chromophores piégés dans une matrice est donc l'anisotropie intrinsèque. Pour une excitation dans un premier état excité ayant une transition fortement permise cette anisotropie intrinsèque est proche de 0,4 (Karolin a mesuré une valeur de 0,37 pour un tétraméthyl Bodipy 100).

Nous pouvons calculer pour toute objet sphérique un temps de corrélation rotationnel τ_R selon l'équation :

$$\tau_R = \frac{4 * \pi * R^3 * \eta}{3 * k * T} \quad (\text{II.8})$$

où R est le rayon de l'objet (m), k la constante de Boltzman, T la température (K), η la viscosité ($\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$).

Pour les billes les plus petites le temps de corrélation rotationnel est de l'ordre de 350 ns, donc pour les billes de plus grand diamètre et quelle que soit la taille des billes, le temps de corrélation rotationnel est largement supérieur au temps de déclin. La rotation des billes dans l'eau ne peut donc pas participer à la dépolarisation de la fluorescence. Une anisotropie proche de 0,4 est attendue. Or les anisotropies mesurées sont faibles, très largement inférieures à 0,4. Seul un transfert d'énergie efficace dans les billes permettrait d'expliquer de telles valeurs.

Comme nous l'avons signalé plus haut plusieurs répartitions simples des fluorophores dans les billes peuvent être envisagées. Si nous émettons l'hypothèse d'une répartition en surface des fluorophores, les distances sont inférieures au rayon de Förster (Tableau II.8 et II.10.). Dans cette hypothèse, le transfert devrait être efficace. Nous pouvons à partir des rayons de Förster, des distances entre fluorophores, et de la durée de vie moyenne calculer la vitesse de transfert d'énergie k_T , ainsi que l'efficacité de transfert E selon ⁵ :

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (\text{II.9})$$

$$E = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6} \quad (\text{II.10})$$

où R_0 est le rayon de Förster, r la distance qui sépare deux fluorophores, τ_D la durée de vie du fluorophore (nous avons utilisé la durée de vie moyenne présentée plus haut, tableau II.13).

Nous pouvons dresser le tableau suivant :

	« Orange 100 sulfate »	« Orange 100 carboxylate »	« Orange 40 carboxylate »	« Orange 20 carboxylate »
Vitesse de transfert (ns^{-1})	487	307	15	0.4
Nombre de « sauts »	2532	1627	84	2,2
Efficacité de transfert	99,9 %	99,9 %	98,7 %	69 %

Tableau II.15. *Vitesse et efficacité du transfert d'énergie entre fluorophores dans les billes de latex, avec l'hypothèse de répartition en surface des fluorophores.*

La vitesse de transfert est très supérieure à la vitesse de déclin, ce qui permet un transfert d'énergie efficace : l'efficacité est toujours supérieure à 69 %. D'après ces calculs, le transfert d'énergie doit être d'autant plus efficace que les billes sont de grande taille.

Si nous formulons l'hypothèse d'une répartition homogène en volume dans les billes, le rayon de Förster calculé est inférieur à la distance évaluée entre chromophores (Tableau II.7 et II.10), l'homotransfert est alors peu envisageable. L'efficacité de transfert est inférieure à 30%, ce qui ne suffit pas à expliquer les faibles anisotropies mesurées.

Nous devons donc remettre en question l'hypothèse selon laquelle la distribution du fluorophore est uniforme sur tout le volume de la bille. Il se peut que les fluorophores soient concentrés en surface ou au coeur, et ainsi un homotransfert d'énergie est possible. Ce transfert pourrait être à l'origine de la dépolarisation rapide de la lumière.

En conservant donc l'hypothèse d'une répartition en surface des colorants, nous pouvons calculer la distance inter-chromophores et corrélérer cette distance à l'anisotropie mesurée (figure II.23.) :

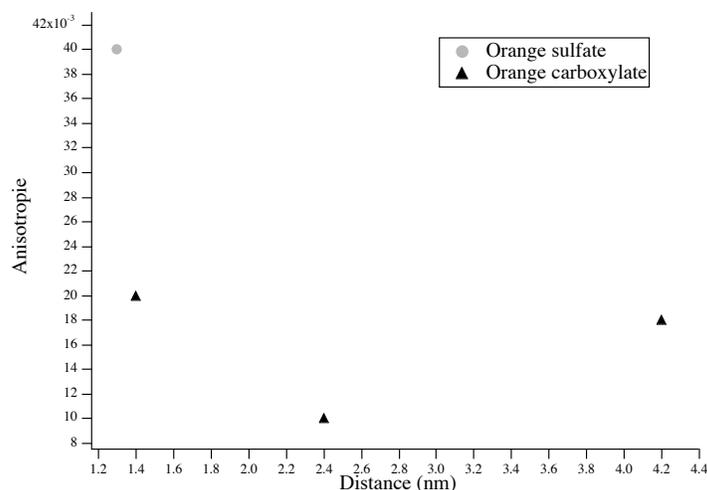


Figure II.23. Anisotropie d'émission stationnaire en fonction de la distance entre fluorophores, en faisant l'hypothèse d'une répartition des fluorophores en surface

Nous nous attendons à ce que l'anisotropie diminue lorsque la distance entre fluorophores diminue. Ce n'est pas le cas. Nous ne pouvons faire de corrélation évidente entre la distance entre fluorophores et l'anisotropie.

Aucune des hypothèses de répartition des fluorophores dans la matrice n'est satisfaisante, et ne permet d'interpréter précisément les données d'anisotropie de fluorescence.

Cependant une chose est acquise, une faible anisotropie ne semble pouvoir provenir que d'un transfert d'énergie entre les BODIPY des billes.

II.3.4.2. Déclins d'anisotropie de fluorescence

Nous avons réalisé les déclins d'anisotropie de fluorescence dans les conditions suivantes : la longueur d'onde d'excitation est fixée à 497 nm, celle d'émission à 562 nm. Chaque déclin est compté pendant le même temps, jusqu'à un taux de comptage d'au moins 10000 coups. Nous avons ainsi un bon rapport signal sur bruit aux temps longs, et une assez bonne résolution aux temps courts. Nous travaillons avec le montage décrit dans l'annexe B, la configuration de l'analyseur est remplacé par un dépolariseur. La mesure de l'anisotropie de fluorescence se fait en modifiant la polarisation à l'excitation. En remplaçant le polariseur par un dépolariseur, nous obtenons une plus grande luminosité de l'ensemble, et nous nous affranchissons des problèmes liés au dichroïsme du monochromateur. Le montage ne comporte pas d'analyseur, la détection de fluorescence se fait sans direction privilégiée. Le faisceau d'excitation laser est polarisé selon une direction verticale (V) ou horizontale (H). On mesure $I_{VD}=I_{//}+ I_{\perp}$ et $I_{HD}=2*I_{\perp}$. L'anisotropie s'écrit alors comme :

$$a = \frac{I_{VD} - I_{HD}}{I_{VD} + \frac{1}{2} * I_{HD}} \quad (\text{II.11})$$

L'indice D indique une mesure en dépolariseur.

Nous présentons dans la figure II.24. les déclins d'anisotropie de fluorescence pour les quatre types de billes étudiées.

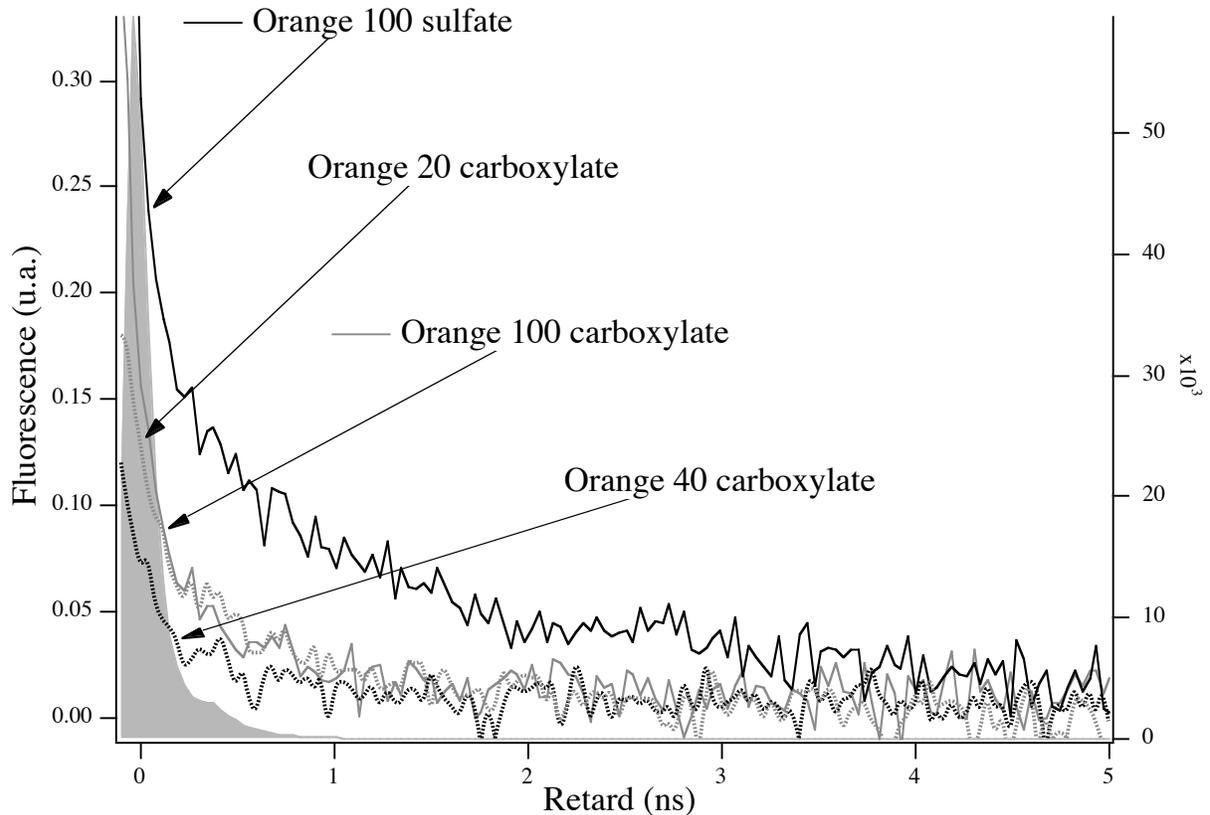


Figure II.24. *Déclins d'anisotropie de fluorescence des billes de latex en suspension aqueuse - Excitation : 497 nm ; Emission : 560 nm*
 Trait continu noir « Orange 100 sulfate »
 Trait continu gris « Orange 100 carboxylate »
 Traits pointillés noirs « Orange 40 carboxylate »
 Traits pointillés gris « Orange 20 carboxylate »
 Aplat gris *impulsion laser (ordonnée de gauche)*

Nous remarquons que les déclin d'anisotropie relaxent très rapidement, et que la résolution temporelle de notre montage ne nous permet pas d'ajustement de ces déclin sans déconvolution. Pour s'affranchir de la contribution de l'impulsion, il nous faudrait travailler en méthode pompe-sonde avec une impulsion de quelques picosecondes. Néanmoins nous pouvons obtenir des informations qualitatives à partir des déclin d'anisotropie. En effet, il faut remarquer que la relaxation de l'anisotropie des billes « Orange 40 carboxylate » est beaucoup plus rapide que les autres, et compte tenu de la résolution temporelle nous pouvons affirmer que l'anisotropie de fluorescence devient nulle au bout de quelques centaines de picosecondes. Seul un transfert d'énergie très efficace entre fluorophores dans la matrice peut expliquer cette observation. Les billes « Orange 100 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate » présentent des déclin d'anisotropie similaires. L'anisotropie devient nulle au bout d'une nanoseconde environ. Cette relaxation rapide peut également s'expliquer par un homotransfert d'énergie, mais moins efficace que dans les

« Orange 40 carboxylate ». Quant aux « Orange 100 sulfate », la relaxation de l'anisotropie y est beaucoup plus lente, elle ne devient nulle qu'au bout de quatre nanosecondes environ.

Finalement, les déclin d'anisotropie de fluorescence confirment les observations faites en anisotropie d'émission stationnaire : la dépolarisation d'une lumière polarisée est très rapide dans les billes de latex. Ce phénomène nous permet de conclure à une distribution non uniforme des fluorophores dans les billes. Si la répartition en volume donne des valeurs estimées de vitesse de transfert qui sont plusieurs ordres de grandeur en dessous de la valeur mesurée, l'hypothèse de la répartition en surface n'est pas non plus complètement satisfaisante. En effet, nous ne trouvons pas une bonne adéquation entre les déclin d'anisotropie (Figure II.24.) et les efficacité de transfert calculées (Tableau II.15.). Si les fluorophores sont répartis en surface, le transfert d'énergie devrait être d'autant plus efficace que la taille des billes est grande. Or les déclin d'anisotropie nous montrent que vraisemblablement ce sont les « Orange 40 carboxylate » qui présentent le transfert d'énergie le plus efficace, tandis que les « Orange 20 carboxylate » et les « Orange 100 carboxylate » sont équivalentes. Ce sont les « Orange 100 sulfate » qui présentent le moins bon effet d'antenne. Nous ne trouvons donc pas de corrélation entre taille *i.e* répartition des colorants et anisotropie. Il est pour l'instant difficile de s'avancer quant à la distribution des BODIPY dans la matrice. Mais il semblerait que seul un transfert d'énergie efficace puisse expliquer de tels résultats en anisotropie.

Rappelons que nous souhaitons concevoir un système de nano-capteurs, où la bille sert non seulement de relais de l'information, mais aussi d'amplificateur s'il est possible de mettre à profit un transfert d'énergie entre fluorophores de la matrice polymérique. Ainsi les mesures d'anisotropie sont encourageantes. Les « Orange 40 carboxylate » semblent être les meilleurs candidats comme supports des sondes, car le transfert d'énergie semble être le plus efficace. L'excitation visite en moyenne plus de cinquante molécules pendant sa durée de vie. Ainsi dans la suite de nos travaux, nous mettrons souvent en exergue les études réalisées sur ces billes car nous nous sommes centrés sur les meilleurs supports potentiels.

II.4. Conclusion

Nous nous sommes attachés à caractériser les billes de latex qui vont nous servir pour construire un système support-sonde. Nous avons montré que les propriétés spectroscopiques du fluorophore (BODIPY) ne sont pas drastiquement modifiées par son incorporation dans un latex. Le maximum d'absorption se situe à 542 nm, celui d'émission de fluorescence à 562 nm. Le déclin de fluorescence est monoexponentiel dans les billes « Orange 100 sulfate » avec une durée de vie de 5,2 ns ; les billes « Orange carboxylate » présentent des déclin multi-exponentiels. Ce comportement peut s'expliquer par la présence d'au moins deux populations de fluorophores : par

exemple, une dans la « chevelure » de polymère à l'interface latex-solution et l'autre au coeur de la matrice de polymère. Ces propriétés sont indépendantes de la force ionique et du pH.

L'anisotropie d'émission stationnaire est très faible. Les déclins d'anisotropie relaxent très vite, en moins de 1 ns. Ceci ne peut s'interpréter qu'en terme de transfert d'énergie entre fluorophores. Une question reste en suspens : on ne peut pas corréler les résultats d'anisotropie avec une répartition en volume ou une répartition en surface des BODIPY. Nous n'avons donc pas d'information sur la distribution des fluorophores dans la matrice de polystyrène.

Nous pouvons dresser un tableau récapitulatif de quelques résultats :

	Concentration en BODIPY dans une bille (mol.L ⁻¹)	R ₀ (nm)	Distance entre fluorophores (nm)	Rendement de fluorescence	Durées de vie (ns)	Anisotropie stationnaire
Orange 100 sulfate	1,6.10 ⁻²	-	1,3 ^(a) - 5,6 ^(b)	-	5,2	0,04
Orange 100 carboxylate	1,8.10 ⁻²	4,8	1,4 ^(a) - 5,45 ^(b)	0,59	5,8 - 4,1	0,02
Orange 40 carboxylate	1,4.10 ⁻²	5	2,4 ^(a) - 5,9 ^(b)	0,72	6 - 3,4	0,01
Orange 20 carboxylate	1,4.10 ⁻²	4,8	4,2 ^(a) - 5,82 ^(b)	0,55	6 - 4	0,013

Tableau II.16. *Synthèse de quelques caractéristiques des billes*

(a) *hypothèse d'une répartition en surface des colorants*

(b) *hypothèse d'une répartition en volume des colorants*

Le tableau II.16 montre combien il est difficile de corréler les paramètres expérimentaux. Les billes de latex étudiées sont des systèmes complexes. Les billes qui semblent être les meilleurs candidats comme supports sont celles qui présentent le transfert d'énergie le plus efficace : à savoir les « Orange 40 carboxylate ». Ce serait le système où l'effet d'antenne *i.e* l'amplification est le plus important. Elles ont aussi l'avantage de présenter la plus grande densité surfacique de charge, ce qui laisse préjuger de l'adsorption effective de molécules sondes par interactions électrostatiques.



III. Adsorption de Bleu de Méthylène : effets sur les propriétés spectroscopiques des billes de latex Orange.

Introduction :

Comme nous l'avons présenté au chapitre I, nous cherchons à construire un système modulaire émetteur-sonde. La signalisation est assurée par les billes de latex « Orange » que nous avons présentées dans le chapitre précédent. Dans cette étude, la sonde est adsorbée à la surface du latex. Compte tenu de la nature anionique des groupes de surface, nous avons orienté notre choix vers une molécule cationique. Nous souhaitons que l'information entre bille et sonde se fasse par transfert d'énergie selon Förster. Il faut donc que le spectre d'absorption de la sonde change avec la quantité d'analyte de telle sorte que le recouvrement avec le spectre d'émission de fluorescence des billes change aussi. L'intensité de fluorescence du support est ainsi modulée par le changement d'absorption de la sonde.

Afin de tester la faisabilité de notre système nous avons, dans un premier temps, étudié une molécule « sonde » modèle : le Bleu de Méthylène. Cette molécule présente, en effet, les caractéristiques requises. Pour des raisons de simplicité, nous utiliserons souvent, par la suite, l'abréviation BM pour Bleu de Méthylène.

Nous allons d'abord vérifier que notre concept est « viable », en essayant de répondre aux questions suivantes :

- * Peut-on adsorber une molécule cationique, comme le BM à la surface des latex « sulfate » ou « carboxylate » ?
- * Si l'adsorption est efficace, induit-elle, comme nous l'espérons, un transfert d'énergie des fluorophores des billes vers le piège (BM) ?
- * Si ce transfert existe : est-il efficace ?

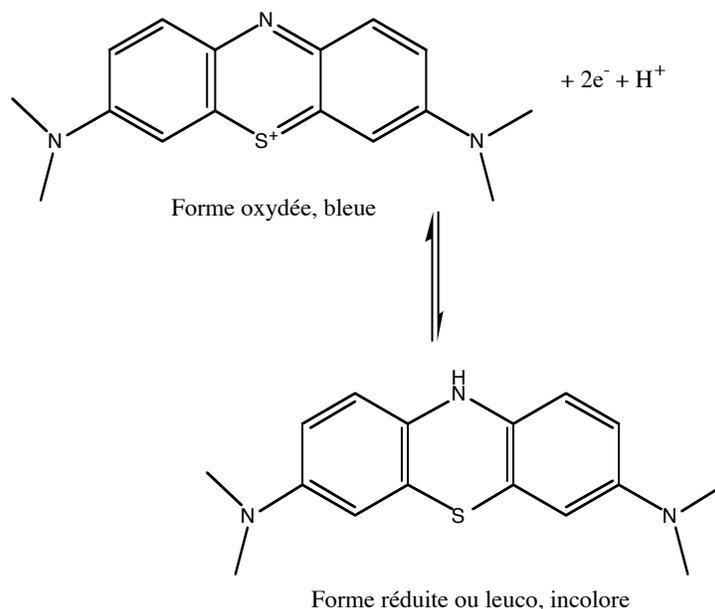
Nous allons dans un premier temps présenter quelques caractéristiques du Bleu de Méthylène (BM). Puis nous nous intéresserons aux interactions BM- « billes Orange ». Pour des raisons « techniques » que nous expliciterons plus loin, nous nous limiterons aux « Orange 100 carboxylate » et « Orange 100 sulfate ».

Après avoir caractérisé l'adsorption de la « sonde modèle », nous étudierons les effets de celle-ci sur l'émission de fluorescence des billes.

III.1 Le Bleu de Méthylène : « sonde modèle ».

Le Bleu de Méthylène ou (7-diméthylamino-phénothiazin-3-ylidène)-diméthyl-ammonium est un colorant de type thiazine. Il est utilisé comme antiseptique, dans les soins vétérinaires et médicaux, en tant qu'antidote dans les empoisonnements au cyanure. Il est également utilisé pour le diagnostic *in vitro* en bactériologie, cytologie, hématologie, histologie¹³¹.

C'est un indicateur coloré d'oxydoréduction :



Le couple oxydant-réducteur a un potentiel normal de 0,52V / E.N.H. à pH=0¹³².

Le maximum d'absorption se situe, dans l'eau, à 664 nm ($\epsilon=75000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)¹³³. La bande d'absorption principale est accompagnée d'une bande vibronique secondaire (appartenant à la même transition électronique) qui donne un épaulement caractéristique à 610 nm (Figure III.1.)¹³⁴. Pour des concentrations supérieures à $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ le BM s'associe sous forme de dimères¹³⁵. La constante de dimérisation est de $4.10^3 \text{ L.mol}^{-1}$ dans l'eau¹³⁶. Elle dépend de la force ionique. Le spectre d'absorption de solution de BM concentré (de 10^{-5} à $2.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) présente au moins deux bandes intenses : une à 665 nm et une entre 605-610 nm. Le spectre du dimère a été calculé par extrapolation¹³⁷. Un maximum intense à 605 nm a été mis en évidence ($\epsilon=130000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), un autre maximum, beaucoup plus faible, a été trouvé à 697 nm ($\epsilon=22000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Le recouvrement du spectre d'absorption du BM, sous forme de monomère, avec le spectre d'émission de fluorescence des billes Orange est satisfaisant (Cf. figure III.1.).

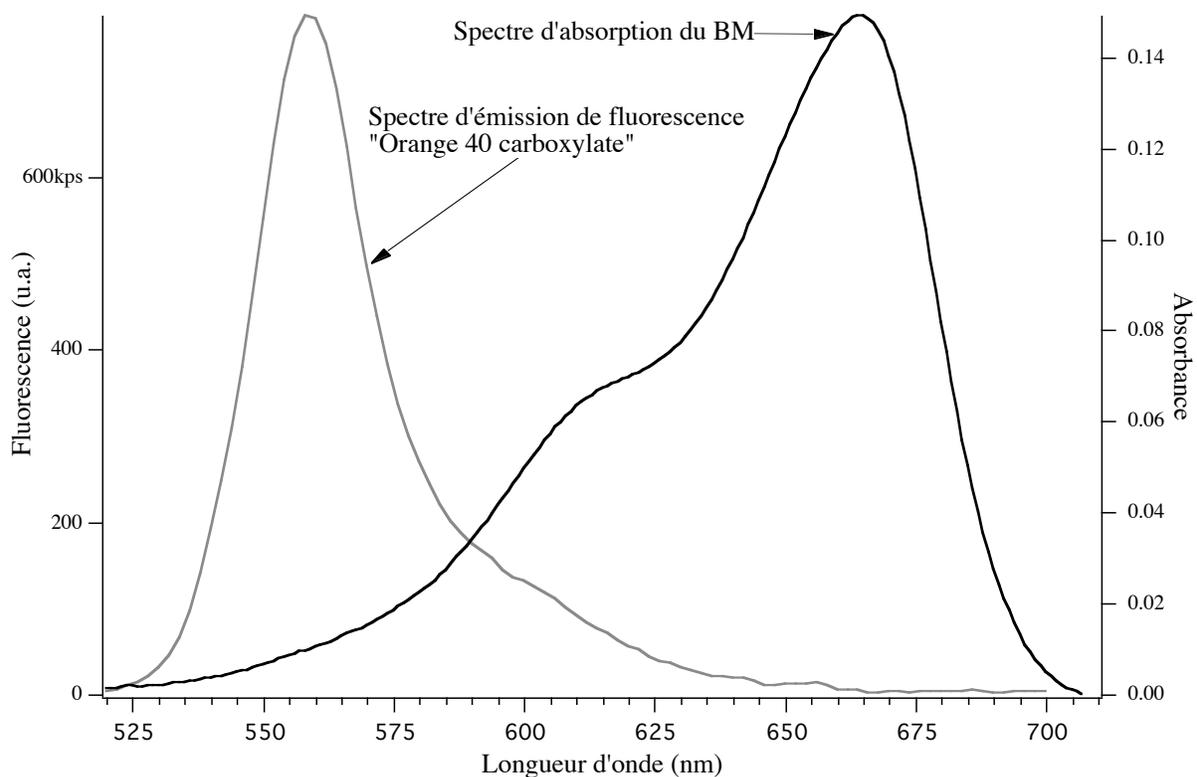


Figure III.1. *Spectre de fluorescence d'une suspension aqueuse de billes de latex « Orange 40 carboxylate » (exc° 542 nm - $ém^\circ$ 560nm), et spectre d'absorption du BM dans l'eau ($1,8.10^{-6} mol.L^{-1}$).*

Nous avons calculé les valeurs de la distance de Förster entre le « BODIPY Orange » dans les billes et le BM (Cf. Annexe F, équation F.3) :

Dénomination (nomenclature)	Orange 100 sulfate	Orange 100 carboxylate	Orange 40 carboxylate	Orange 20 carboxylate
R_0 donneur-accepteur (nm)	*	4,57	4,59	4,57

Tableau III.1. *Rayon de Förster entre donneur (BODIPY Orange dans la matrice) et le Bleu de Méthylène. * rendement quantique inaccessible*

Les rayons de Förster sont identiques quelle que soit la nature des billes.

Conclusions :

Le BM semble présenter les caractéristiques requises pour remplir le rôle de sonde dans notre système modulaire. Nous allons à présent caractériser l'adsorption du BM sur les billes de latex.

III.2. Etude de l'adsorption du Bleu de Méthylène sur les billes de 100 nm de diamètre.

Pour caractériser l'adsorption de molécules biologiques^{55,56} ou de colorants^{88,45,52} à la surface de latex, les techniques de centrifugations et d'absorption U.V.-visible sont souvent utilisées. Nous avons suivi un protocole équivalent (Annexe G).

Nous cherchons ici à caractériser l'équilibre d'adsorption du BM à la surface des billes de latex :



où $(BM)_L$ représente une molécule de BM « libre », s_{bille} est un site d'adsorption à la surface des billes et $(BM)_{ads}$ est une molécule adsorbée sur un site. Nous cherchons à connaître la constante d'équilibre K_{ads} , ainsi que le seuil de saturation σ_{max} (nombre de sites maximum occupables).

Il faut donc tracer les isothermes d'adsorption *i.e* le taux de couverture (fraction de surface couverte) en fonction de la concentration en molécules « libres ». (Cf. Annexe G)

Pour déterminer la concentration de BM libre à l'équilibre, il faut séparer les billes de la solution. Pour cela, nous utilisons la technique de centrifugation. (Cf. Annexe G) Cette méthode n'est pas applicable aux billes de 40 nm et 20 nm de diamètre, en effet, les billes sont trop petites pour être sédimentées. En utilisant la technique de centrifugation, nous nous sommes limités à l'étude de l'adsorption de BM sur les billes de 100 nm de diamètre.

Une fois les billes centrifugées, l'absorbance du surnageant, A_{sgnt} , est mesurée. Connaissant le coefficient d'absorption molaire du colorant (ϵ_{BM}), nous pouvons connaître la concentration de molécules libres $[BM]_L$, et par différence avec la quantité introduite au départ $[BM]_0$, nous calculons la quantité de BM adsorbé $[BM]_{ads}$.

$$A_{sgnt} = \epsilon_{BM} * l * [BM]_L \quad \text{(III.1)}$$

$$[BM]_{ads} = [BM]_0 - [BM]_L \quad \text{(III.2)}$$

Nous pouvons calculer le nombre de moles adsorbées par unité de surface, σ_{surf} , selon :

$$\sigma_{surf} = \frac{V}{S} * ([BM]_0 - [BM]_L) \quad \text{(III.3)}$$

où V est le volume de l'échantillon et S la surface totale offerte par les billes.

Nous tracerons le nombre de moles de BM adsorbé par m^2 (σ_{surf}) en fonction de la concentration en BM libre ($[BM]_L$).

Nous allons dans un premier temps nous intéresser aux « Orange 100 carboxylate » (§ III.2.1.) puis aux « Orange 100 sulfate » (§ III.2.2.). Nous présenterons pour chaque bille, les résultats d'un ajustement de type isotherme de Langmuir. Puis nous comparerons et discuterons les résultats obtenus (§ III.2.3.).

III.2.1. Adsorption du Bleu de Méthylène sur les billes « Orange 100 carboxylate »

Pour chaque échantillon nous avons procédé à trois centrifugations successives. Nous avons étudié des échantillons contenant 10 μL de billes dans 4 mL d'eau ($4,3 \cdot 10^{11}$ billes), auxquels nous avons ajouté des aliquotes de solutions de concentration connue de BM. Après centrifugations, les culots sont bleu intense, ce qui signifie que le BM s'est adsorbé de manière significative sur les billes. Les surnageants apparaissent beaucoup moins colorés que les solutions initiales. L'équilibre d'adsorption du BM est atteint très rapidement : au bout de quelques minutes. Ceci est en accord avec les cinétiques d'adsorption de la Rhodamine 6G⁸⁸, du Vert de Malachite⁴⁵, ou du méthylviologène¹³⁸ sur des billes de polystyrène. Nous n'avons pas observé l'adsorption du colorant (BM) sur les parois des tubes de centrifugation. Nous présentons sur la figure suivante l'isotherme d'adsorption c'est à dire le nombre de moles de BM adsorbé par unité de surface, en fonction de la concentration en Bleu de Méthylène libre, à $T=20^\circ\text{C}$. (Figure III.2.)

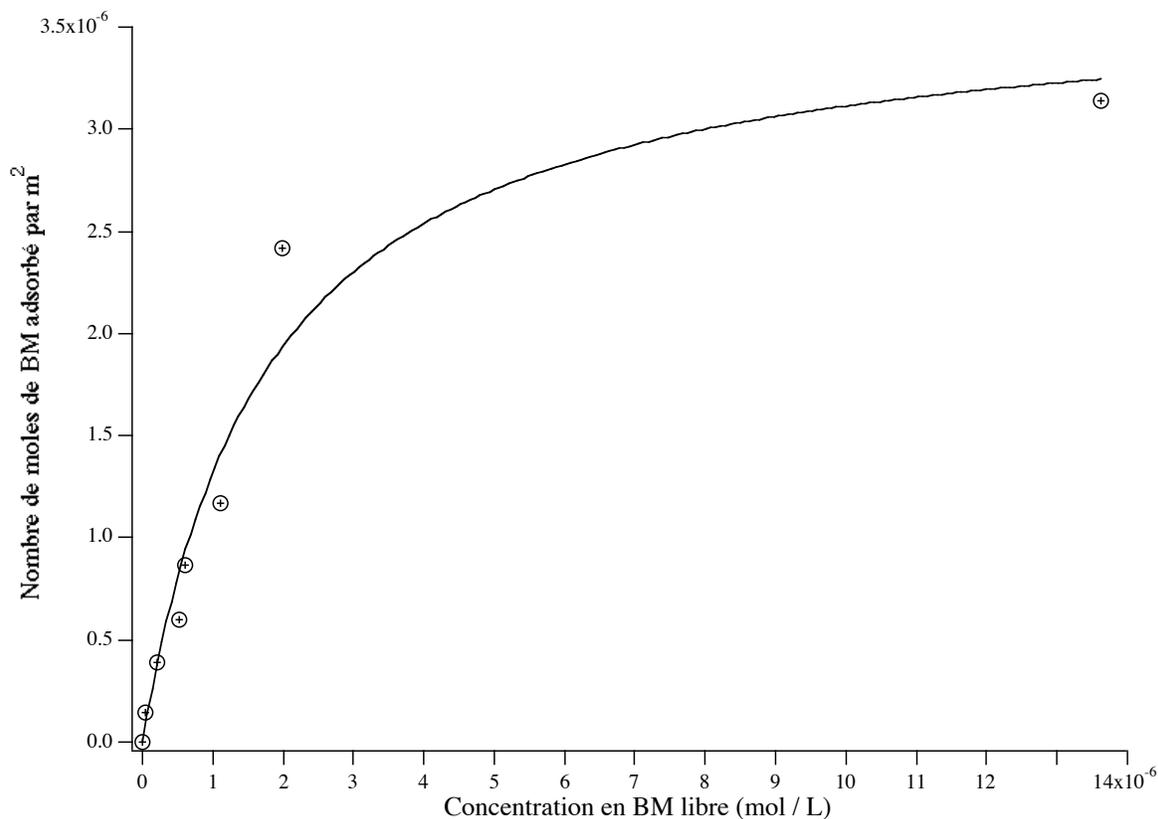


Figure III.2. Isotherme d'adsorption du BM sur les latex « Orange 100 carboxylate » (points) ; ajustement par le modèle de Langmuir (courbe noire)

L'ajustement de l'isotherme par le modèle de Langmuir est satisfaisant, il donne $K_{ads}=5,6.10^5$ L.mol⁻¹ et un taux de couverture maximum de $3,7.10^{-6}$ mol.m⁻², correspondant à environ 62600 sites par bille. Le BM a une grande affinité pour les billes « carboxylate ». Le taux de couverture est largement supérieur au nombre de groupes carboxylates (Cf. Chapitre II Tableau II.3.). Grâce au logiciel Chem3D nous avons pu évaluer la surface d'une molécule de BM à 1,2 nm². La surface occupée par les molécules de BM à taux de couverture maximale correspond alors à 75000 nm² soit 2,7 fois environ la surface totale de la bille. Soit le BM s'adsorbe à fort taux de couverture sous forme de dimères ou agrégats à la surface des billes, soit il pénètre dans les brins de copolymère qui fonctionnalisent la bille. Pour ce qui est de l'imprégnation des colorants dans les « cheveux » de polymère, il est difficile de conclure car nous ne pouvons évaluer la surface que représentent ces brins. La présence de dimères à forte concentration est en revanche attestée par une bande vers 610 nm de forte intensité (voir plus loin figure III.4.).

III.2.2. Adsorption du Bleu de Méthylène sur les billes « Orange 100 sulfate »

Pour chaque échantillon nous avons procédé à trois centrifugations successives. Nous avons étudié des échantillons contenant 10 μL de billes dans 4 mL d'eau ($2,1 \cdot 10^{11}$ billes), auxquels nous avons ajouté des aliquotes de solutions de concentration connue de BM. Après centrifugations, les culots sont bleu intense. Les surnageants apparaissent beaucoup moins colorés que les solutions initiales. L'équilibre d'adsorption du BM est atteint très rapidement : au bout de quelques minutes. L'isotherme d'adsorption (Figure III.3.) peut être ajustée par un modèle de Langmuir (Cf. Annexe G).

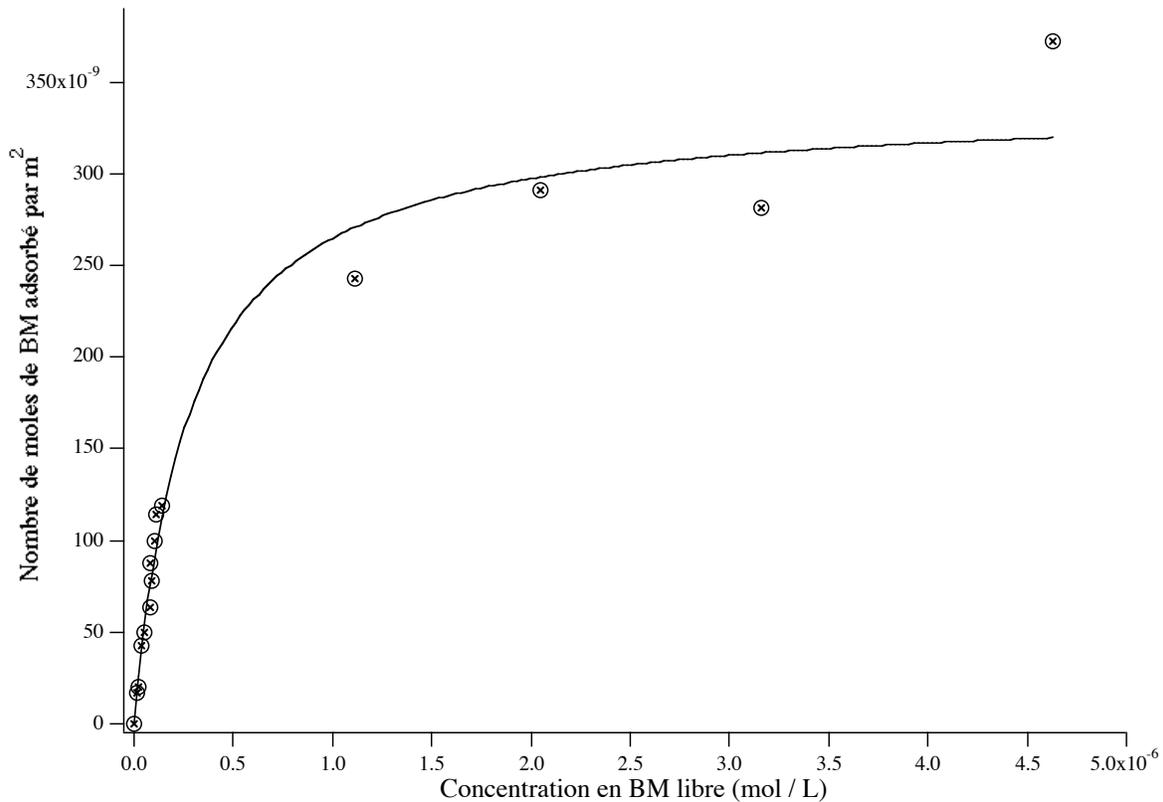


Figure III.3. Isotherme d'adsorption du BM sur les latex « Orange 100 sulfate » (points) ; ajustement par le modèle de Langmuir (courbe noire).

L'ajustement par le modèle de Langmuir donne $K_{\text{ads}} = 3,5 \cdot 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ et un taux de couverture maximale de $3,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ soit environ 10000 sites d'adsorption par bille. La constante d'affinité du BM est très élevée, supérieure à celle pour les billes « carboxylate ». Le nombre de sites est supérieur au nombre de groupes chargés à la surface. (Cf. Chapitre II. Tableau II.3.) La surface occupée par 10000 molécules de BM est d'environ 12000 nm^2 , ce qui correspond à 30% de la surface totale de la bille. Nous n'observons pas de bande d'absorption marquée autour de 610 nm dans la gamme de concentrations étudiée. Les molécules de BM doivent s'adsorber sous forme de monomères, « à plat » sur la surface de la bille.

III.2.3. Discussions.

III.2.3.1. Mode d'adsorption

Les hypothèses du modèle de Langmuir sont simples, cependant les ajustements sont satisfaisants. Ils nous permettent d'estimer le nombre maximal de sites d'adsorption occupables par le BM à la surface des billes, ainsi que la constante d'association.

Le tableau (Tableau III.2.) réunit l'ensemble des données nécessaires à notre discussion :

	Nombre de sites chargés par bille	Nombre de molécules pour une couverture géométrique de la surface	Constante d'association K_{ads} (L.mol ⁻¹)	Taux de couverture maximal (mol.m ⁻²)	Nombre de sites d'adsorption maximal par bille
« Orange 100 sulfate »	2500	33000	$3,5 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^{-7}$	10000
« Orange 100 carboxylate »	4730	23200	$5,6 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^{-6}$	62600

Tableau III.2. *Nombre de sites chargés par bille, et couverture géométrique de la surface par des molécules de BM pour les billes « Orange 100 sulfate » et « Orange 100 carboxylate » ; caractéristiques de l'isotherme de Langmuir du BM sur les billes « Orange 100 sulfate » et « Orange 100 carboxylate ».*

La constante d'association du BM avec les billes fonctionnalisées par des groupes sulfates est plus grande que pour les billes « carboxylate ». En effet l'affinité d'un groupe anionique fort (sulfate) est plus importante pour les cations que celle d'un groupe anionique faible (carboxylate)¹³⁹.

Quel que soit le type de billes envisagé il faut remarquer que le nombre de sites d'adsorption est très supérieur au nombre de sites chargés. M.-T. Charreyre a étudié l'adsorption de Rhodamine 6G sur des billes de polystyrène (de l'ordre de 100 nm de diamètre), fonctionnalisées par des groupes sulfates⁸⁸. Elle a montré que le taux de couverture maximal est six fois supérieur au nombre de groupes sulfates. Dans notre cas, BM-latex « sulfate », nous trouvons un taux de couverture (en nombre de sites par bille) cinq fois supérieur au nombre de sites chargés. Le taux de couverture pour le couple BM-latex « carboxylate » est treize fois supérieur au nombre de groupes chargés. M.-T. Charreyre a montré que l'adsorption de la Rhodamine 6G est gouvernée à faibles concentrations par des interactions électrostatiques, et à fortes concentrations par des interactions

hydrophobes, d'où un taux de couverture maximal supérieur au nombre de groupes chargés. C.Pichot et son équipe ont montré que pour des oligonucléotides adsorbés sur des latex cationiques, si les interactions électrostatiques sont prédominantes, les interactions hydrophobes ne sont pas à négliger⁵⁵. Comme nous l'avons signalé dans la présentation des latex à base de polystyrène, il existe à la fois des sites « continus » hydrophobes et des sites « ponctuels » chargés^{45,52,53} : or le BM est cationique, mais c'est aussi une molécule aromatique, donc hydrophobe. Nous pouvons donc penser que les interactions hydrophobes polystyrène-BM participent de façon significative à l'adsorption. Toutefois dans ce cas un modèle de Langmuir reste applicable pour caractériser l'adsorption de la Rhodamine 6G sur les latex « sulfate ». Pour rendre compte des deux étapes de l'adsorption dues d'abord aux effets électrostatiques puis aux effets hydrophobes, les isothermes pourraient être ajustées par deux fonctions de Langmuir successives⁸⁸. Ayant peu de points expérimentaux nous n'avons pas pu procéder à de tels ajustements.

III.2.3.2. Etat du BM adsorbé

Dans le cas de la Rhodamine 6G, M.-T. Charreyre et coll.⁸⁸, ainsi que K.Nakashima et coll.⁴⁵ ont montré que ce colorant forme des dimères lorsqu'il s'adsorbe à la surface de latex de polystyrène (sulfate). Cependant en augmentant la concentration de billes, les molécules de Rhodamine 6G se redistribuent sur la surface, et les dimères disparaissent. Les mêmes observations ont été faites quant à l'adsorption du pyrène⁵³ et de l'octadécylrhodamine B¹²⁸ à la surface de billes de polystyrène. Nous travaillons quant à nous avec un nombre de billes constant et nous faisons varier la quantité de BM. Pour les latex « sulfate », seuls 30% de la surface totale d'une bille sont occupés à taux de couverture maximal. Nous pouvons penser que le BM est sous forme de monomères. De fait nous n'avons pas observé de bande prononcée autour de 605-610 nm quelle que soit la concentration.

Concernant les billes fonctionnalisées par des groupes carboxylates, nous ne pouvons pas négliger la pénétration du BM dans la couche de copolymère à l'extérieur (celle qui porte les charges), ni l'existence éventuelle d'agrégats. En effet, à taux de couverture maximal la surface occupée par les BM est 2,7 fois plus élevée que la surface totale d'une bille.

Nous comparons à la figure III.4. les spectres d'absorption, avant centrifugation, de solutions colloïdales de billes en présence de BM, pour une même concentration de BM (10^{-5} mol.L⁻¹). En solution aqueuse la présence de dimères se manifeste par l'apparition d'une forte bande autour de 610 nm. Il est raisonnable de penser que les dimères adsorbés à la surface des billes présentent un spectre analogue. Nous pouvons constater (Figure III.4.) que la proportion de colorant sous forme de dimères est beaucoup plus importante en présence des billes « carboxylate » que dans l'eau. Il existe en effet une bande vers 610 nm d'intensité comparable à celle du monomère.

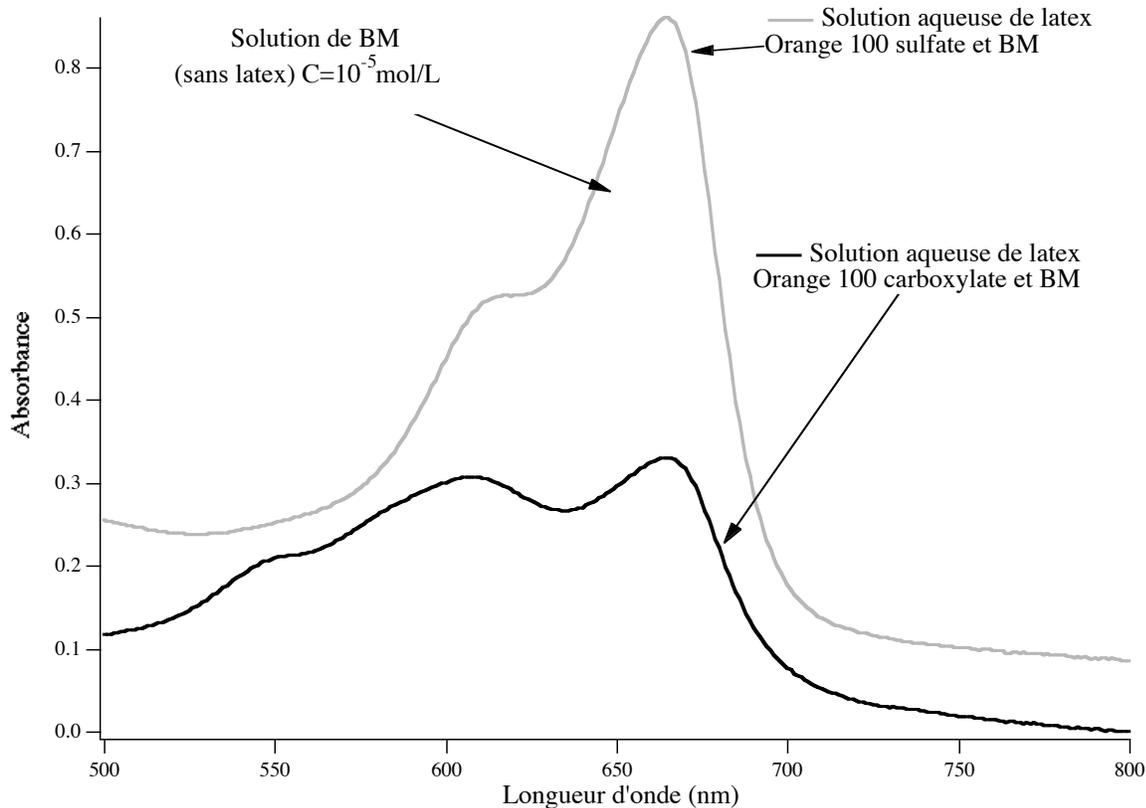


Figure III.4. Spectres d'absorption avant centrifugation de solutions colloïdales de latex « Orange 100 sulfate » et « Orange 100 carboxylate » en présence de BM. La concentration du colorant est de 10^{-5} mol.L⁻¹.
 Traits pointillés : Spectre de référence du BM dans l'eau
 Trait continu noir : Latex 100 carboxylate (10 μ L) et BM
 Trait continu gris : Latex 100 sulfate (10 μ L) et BM

A plus faibles concentrations de tels effets ne sont pas observés. A partir des spectres d'absorption nous avons essayé d'évaluer le taux de couverture à partir duquel la proportion de dimères devient non négligeable. Les dimères apparaissent pour des taux de couverture de l'ordre de $2 \cdot 10^{-7}$ mol.m⁻² mais ils restent des espèces minoritaires. Au delà de $4 \cdot 10^{-6}$ mol.m⁻² de BM le colorant existe essentiellement sous forme de dimères, voire de multimères. Une étude plus fine demanderait à être menée afin d'évaluer la proportion exacte de dimères et de monomères.

Sauf indication contraire, nous nous sommes placés dans les conditions où la présence de dimères à la surface des latex pouvait être négligée.

III.2.3.3. *Extrapolation des données de l'adsorption aux billes de plus petite taille*

Le modèle de Langmuir certes, simple, nous apporte toutefois des informations quant à l'affinité du BM avec des billes de polymère. A partir des ajustements précédents, nous pouvons déduire la quantité de BM adsorbé à la surface.

Comme les billes « Orange 40 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate » sont beaucoup trop petites pour être centrifugées, nous avons cherché à mesurer les isothermes d'adsorption du BM sur ces latex par des techniques d'ultrafiltration (Annexe A). Il nous a été impossible d'accéder à la quantité de BM libre, car le colorant s'adsorbe totalement et de manière irréversible sur la surface des membranes des tubes d'ultrafiltration, quelle que soit la nature des membranes. A moins d'étudier l'isotherme d'adsorption du BM sur la membrane, ou de saturer la membrane en BM en supposant qu'une fois en présence des billes le BM reste sur la membrane, nous ne pouvons mesurer expérimentalement l'adsorption du BM sur les billes de 20 et 40 nm de diamètre. Devant cette difficulté expérimentale nous avons cherché à extrapoler les résultats obtenus pour les billes « Orange 100 carboxylate ».

- Le taux de couverture maximal dépend essentiellement du nombre de sites hydrophobes ; M T. Charreyre a, en effet, montré que la valeur du plateau des isothermes d'adsorption de la Rhodamine 6G sur des billes « sulfate » ne dépend pas ou très peu de la densité surfacique de charge⁸⁸. Nous n'avons aucun moyen d'évaluer la densité surfacique des sites hydrophobes. Cependant, nous pouvons faire la remarque suivante : lorsque nous comparons les latex « sulfate » et « carboxylate », nous constatons que la densité surfacique de charge des latex « carboxylate » est trois fois plus élevée que celle des latex « sulfate », alors que le taux de couverture des latex « carboxylate » est dix fois plus élevé que celui des latex « sulfate ». Le fait que le plateau de saturation soit beaucoup plus grand pour les latex « carboxylate » que pour les latex « sulfate » ne peut donc s'expliquer uniquement en terme de charges. En fonctionnalisant les latex par des polymères contenant des groupes carboxylates, on augmente le nombre de sites hydrophobes, et donc le plateau de saturation est plus élevé. Les brins de copolymère ajoutent des sites d'adsorption hydrophobes. Or si nous faisons l'hypothèse que quelle que soit la taille des billes, le greffage des « brins » suit le même protocole, avec le même copolymère, nous pouvons affirmer que si la densité surfacique de charges est plus grande, la quantité de polymère greffé est plus grande, donc le nombre de sites hydrophobes est plus élevé. Nous pouvons donc dans une première approximation dire que la densité surfacique de sites hydrophobes est proportionnelle à la densité surfacique de sites chargés. Ainsi le taux de couverture maximal, lié à la densité surfacique de sites hydrophobes, est proportionnel à la densité surfacique de charges.

- Nous pouvons supposer que l'affinité du BM dépend uniquement de la nature de la surface. Dans les équations qui permettent d'établir le modèle de Langmuir, la constante d'affinité est le rapport des vitesses d'adsorption et de désorption d'une molécule de BM sur un site. Donc, si les effets d'écrantage de charge ou de coopérativité ne sont pas pris en compte, ce qui est le cas dans le modèle de Langmuir, seule la nature du site gouverne l'affinité du BM pour la surface. Nous savons que des interactions hydrophobes et électrostatiques contribuent à l'adsorption. Nous supposons ici que la constante mesurée par l'isotherme de Langmuir englobe l'affinité pour les sites chargés et les sites hydrophobes. Nous supposons que les billes dites « carboxylate » présentent toutes les mêmes types de sites, et que l'adsorption sur un site n'a pas d'influence sur l'adsorption d'une autre molécule de BM sur les sites voisins. Ainsi la constante d'affinité du BM pour la matrice est la même pour un type de groupement de surface (i.e sulfate ou carboxylate).

Pour confirmer ces hypothèses il nous faudrait mener une étude à différentes densités surfaciques de charge pour un type de bille donné. Nous n'avons pas procédé à de telles études. Nous nous contenterons donc de considérer que la constante d'affinité ne dépend que de la nature de la surface : les billes « Orange 40 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate » ont la même constante K_{ads} d'affinité que les « Orange 100 carboxylate ».

Nous présentons dans le tableau III.3., les paramètres « extrapolés » de Langmuir pour l'adsorption du BM sur les billes « Orange 40 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate » ; ainsi que les résultats des ajustements des points expérimentaux pour les billes « Orange 100 carboxylate » et « Orange 100 sulfate » :

	Taux de couverture maximale (mol.m ⁻²)	Constante d'association K_{ads} (L.mol ⁻¹)
« Orange 100 sulfate »	3,4.10 ⁻⁷ (a)	3,5.10 ⁶ (a)
« Orange 100 carboxylate »	3,7.10 ⁻⁶ (a)	5,6.10 ⁵ (a)
« Orange 40 carboxylate »	2,55.10 ⁻⁴ (b)	5,6.10 ⁵ (b)
« Orange 20 carboxylate »	9,8.10 ⁻⁶ (b)	5,6.10 ⁵ (b)

Tableau II.3. *Taux de couverture maximal et constante d'association du BM pour différentes billes de latex, selon le modèle de Langmuir*
(a) paramètres obtenus par ajustement de points expérimentaux
(b) paramètres obtenus par extrapolation avec les résultats des billes « Orange 100 carboxylate ».

Notons que quelle que soit l'approche choisie, les paramètres des isothermes ainsi calculés seront entachés d'erreur, et nous ne pouvons connaître avec précision le nombre de molécules de BM adsorbées sur les billes « Orange 40 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate ».

III.2.4. Conclusions

Nous avons montré que le BM répond aux premières exigences de la fonction sonde du capteur; il s'adsorbe de manière significative sur les billes. Les interactions billes-BM sont semble-t-il de nature aussi bien électrostatique qu'hydrophobe. L'adsorption a été caractérisée selon un modèle de Langmuir.

Il s'agit maintenant de vérifier que le BM adsorbé remplit le rôle d'inhibiteur de la fluorescence des billes.

III.3. Effet de l'ajout de BM sur propriétés des billes de latex Orange : spectroscopie de fluorescence stationnaire

Nous nous intéressons à l'effet sur la fluorescence des billes du BM adsorbé à la surface. Les résultats d'extinction de la fluorescence seront présentés en fonction du nombre de moles de BM adsorbé à la surface des billes, soit σ_{surf} (mol.m⁻²). En effet, ce paramètre est plus significatif que la concentration en BM. La concentration totale de BM ajouté est notée [BM]₀. Pour accéder au nombre de moles de BM adsorbé par m², σ_{surf} , nous avons utilisé les paramètres de l'isotherme de Langmuir précédemment estimés, K_{ads} et $\sigma_{surfMax}$, et nous avons résolu l'équation suivante (Cf. détails des calculs Annexe G) :

$$\sigma_{surf}^2 - \left(\frac{V}{S * K_{ads}} + [BM]_0 * \frac{V}{S} + \sigma_{surfMax} \right) * \sigma_{surf} + [BM]_0 * \frac{V}{S} * \sigma_{surfMax} = 0 \quad (III.4)$$

où V est le volume de l'échantillon, S la surface totale des billes.

Nous allons tout d'abord présenter les résultats expérimentaux selon le type de bille étudiée. Puis nous comparerons les effets du BM sur l'intensité de fluorescence des billes.

III.3.1 Résultats expérimentaux

III.3.1.1. Billes « Orange 100 sulfate »

Nous avons travaillé à nombre de billes constant (4 μL dans 4 mL i.e 8,4.10¹⁰ billes, soit une surface de 0,00386 m²). Nous avons ensuite ajouté du BM en quantité croissante.

Nous présentons figure III.5. quelques spectres d'émission de fluorescence stationnaire :

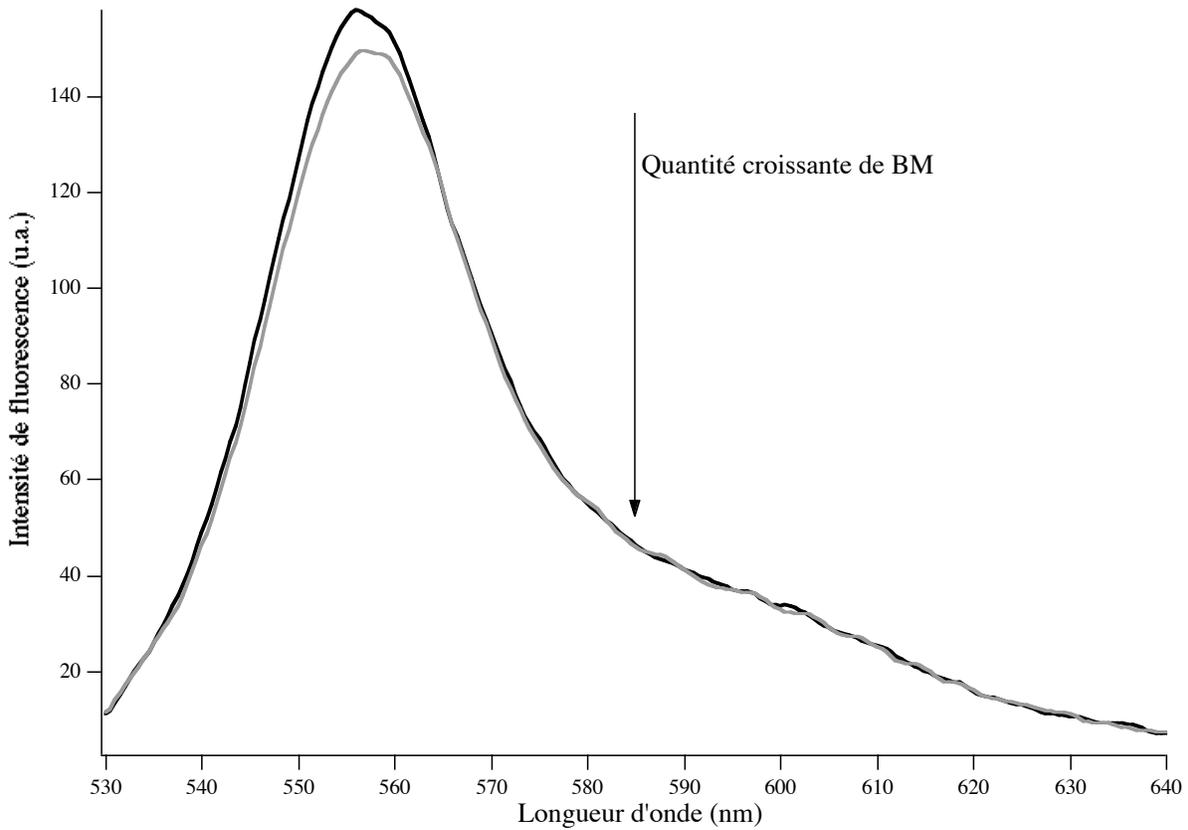


Figure III.5. Spectres de fluorescence stationnaire d'une solution de billes « Orange 100 sulfate » dans l'eau. Excitation : 497 nm ; Emission : 562 nm
 Trait continu noir : Latex seuls (4 μ L + 4 mL d'eau)
 Trait continu gris : Latex et BM ; $[BM]_0 = 8,2 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, $\sigma_{surf} = 4,6 \cdot 10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$
 Traits pointillés noirs : Latex et BM ; $[BM]_0 = 8,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, $\sigma_{surf} = 4,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$
 Traits pointillés gris : Latex et BM ; $[BM]_0 = 7,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $\sigma_{surf} = 3,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.m}^{-2}$

Lorsque la concentration de BM augmente, l'intensité de fluorescence diminue. Il y a extinction de la fluorescence des billes par le BM. Nous avons mesuré l'intensité I au maximum (562 nm) en fonction de la quantité de BM ajouté. Nous représentons, figure III.6., un graphique de type Stern-Volmer i.e $(\frac{I_0}{I} - 1)$ en fonction de σ_{surf} (mol.m^{-2}) où I_0 est l'intensité à 562 nm en l'absence de BM.

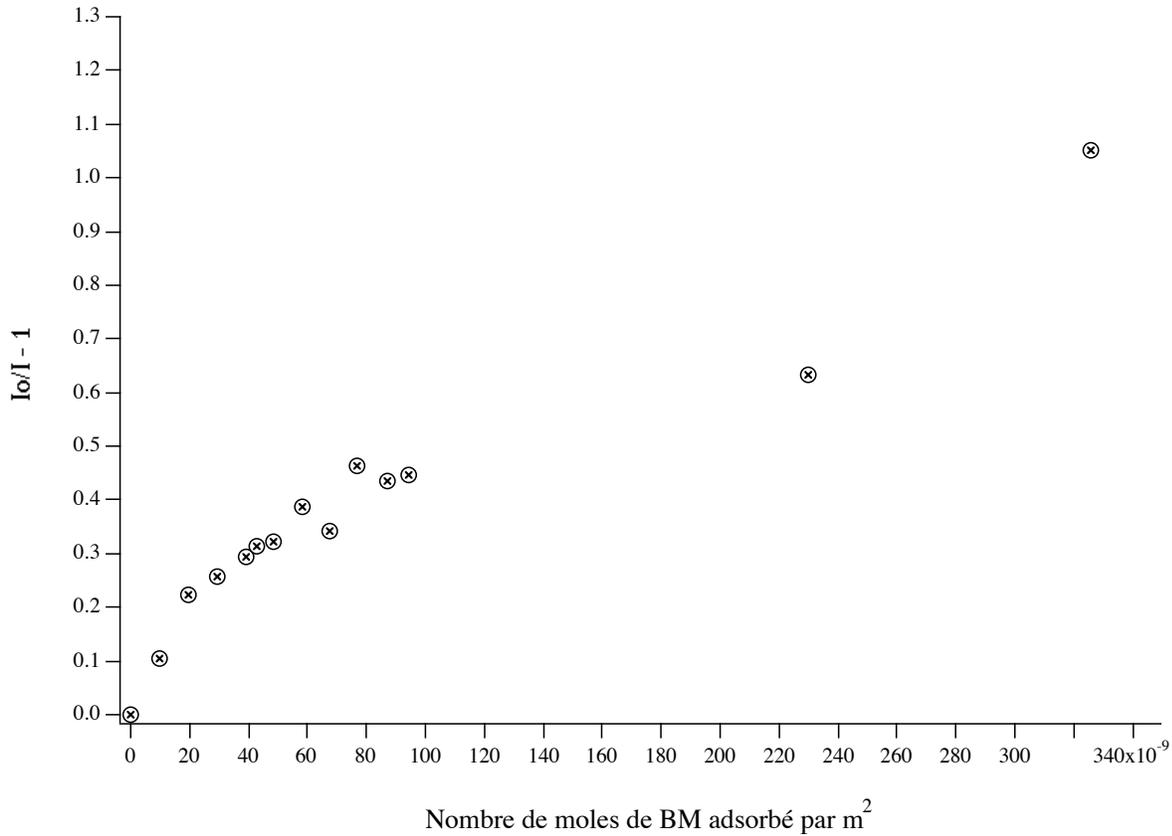


Figure III.6. *Tracé de Stern-Volmer, pour les latex « Orange 100 Sulfate » en présence de BM*

Le tracé de Stern-Volmer n'est pas linéaire, du moins dans la première partie de la courbe. La courbure est inclinée vers le bas. Au dernier point nous avons atteint le taux de couverture maximum. Nous pouvons expliquer l'incurvation par l'existence de deux populations de fluorophores : une accessible au quencher et une inaccessible^{5,138,54}. En ne considérant qu'un type de « quenching » (statique ou dynamique), l'équation de Stern-Volmer peut alors être modifiée selon :

$$\frac{I_0}{I_0 - I} = \frac{1}{f} + \frac{1}{f * K * \sigma_{surf}} \quad (\text{III.5})$$

où f est la fraction de l'intensité initiale de fluorescence des fluorophores accessibles, K la constante de quenching de Stern-Volmer des chromophores accessibles, [Q] la concentration de quencher.

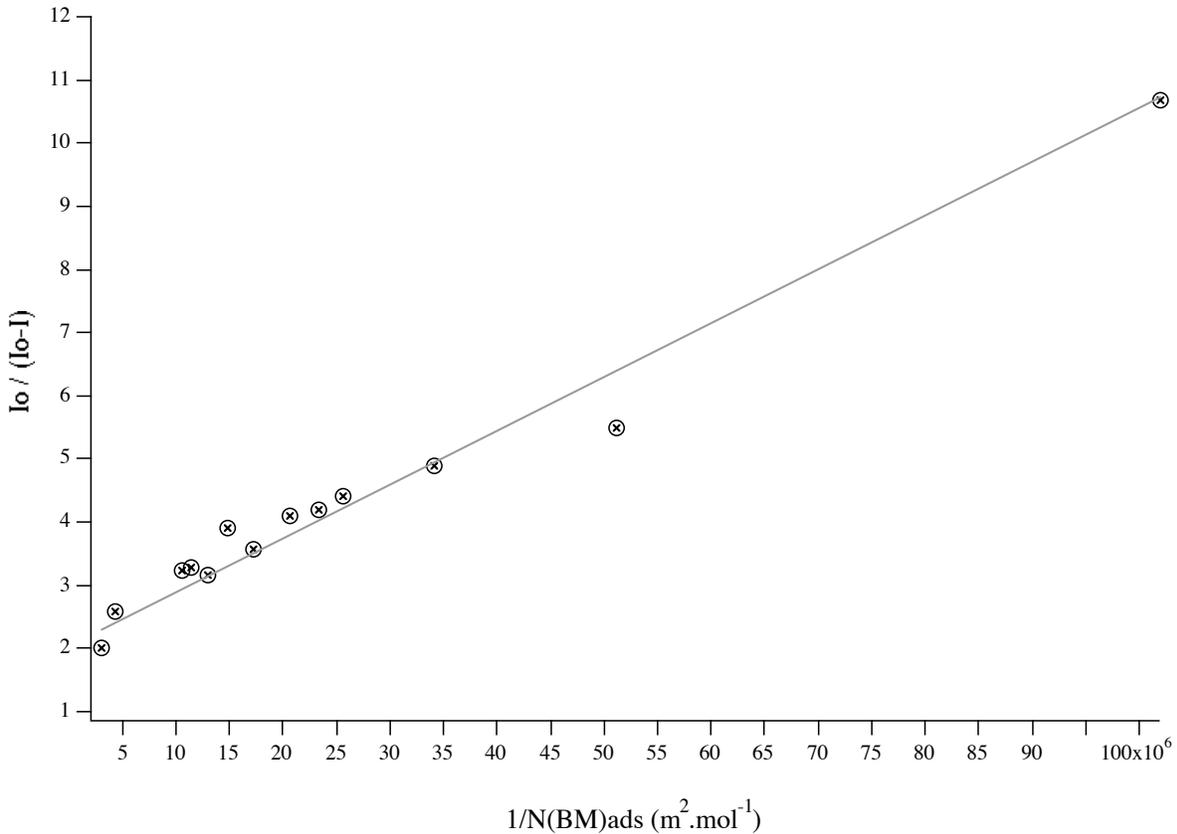


Figure III.7. Latex « Orange 100 sulfate » et BM - Tracé de Stern-Volmer modifié, en supposant l'existence de deux populations de fluorophores

Nous pouvons constater que le tracé modifié de Stern-Volmer (figure III.7.) est linéaire, nous pouvons l'ajuster par une droite d'ordonnée à l'origine $(f)^{-1} = 2,0285 \pm 0,066$ et de pente $8,54 \cdot 10^{-8} \pm 10^{-9}$. Nous trouvons alors une fraction de fluorophores accessibles de 49 % et une constante K de $2,4 \cdot 10^7 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$.

Comme attendu, le BM inhibe la fluorescence des billes « Orange 100 sulfate ». Il semblerait qu'une partie des fluorophores, environ 50 %, ne soit pas accessible à l'extinction.

III.3.1.2. Billes « Orange 100 carboxylate »

Les mesures sont faites à quantité de billes constante ($6 \mu\text{L}$ dans 4 mL , soit $6,4 \cdot 10^{13}$ billes, soit une surface de $0,0073 \text{ m}^2$). Nous avons ensuite ajouté du BM en quantité connue.

Nous présentons, figure III.8., quelques spectres d'émission de fluorescence stationnaire. Nous observons une diminution de l'intensité de fluorescence lorsque la quantité de BM croît.

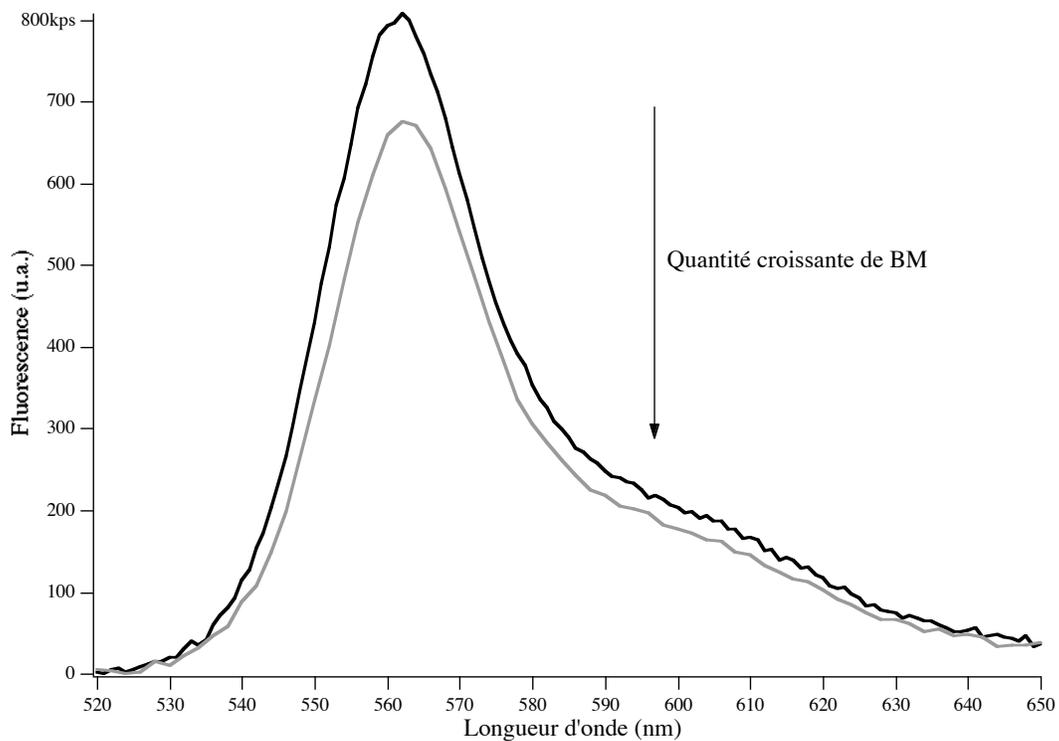


Figure III.8. Spectres de fluorescence stationnaire d'une solution de billes « Orange 100 carboxylate » dans l'eau. Excitation : 497 nm ; Emission : 562 nm
 Trait continu noir : Latex seuls (6 μL + 4 mL d'eau)
 Trait continu gris : Latex et BM ; $[BM]_0 = 2.10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, $\sigma_{surf} = 1,1.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$
 Traits pointillés noirs : Latex et BM ; $[BM]_0 = 2.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$, $\sigma_{surf} = 1,1.10^{-7} \text{ mol.m}^{-2}$

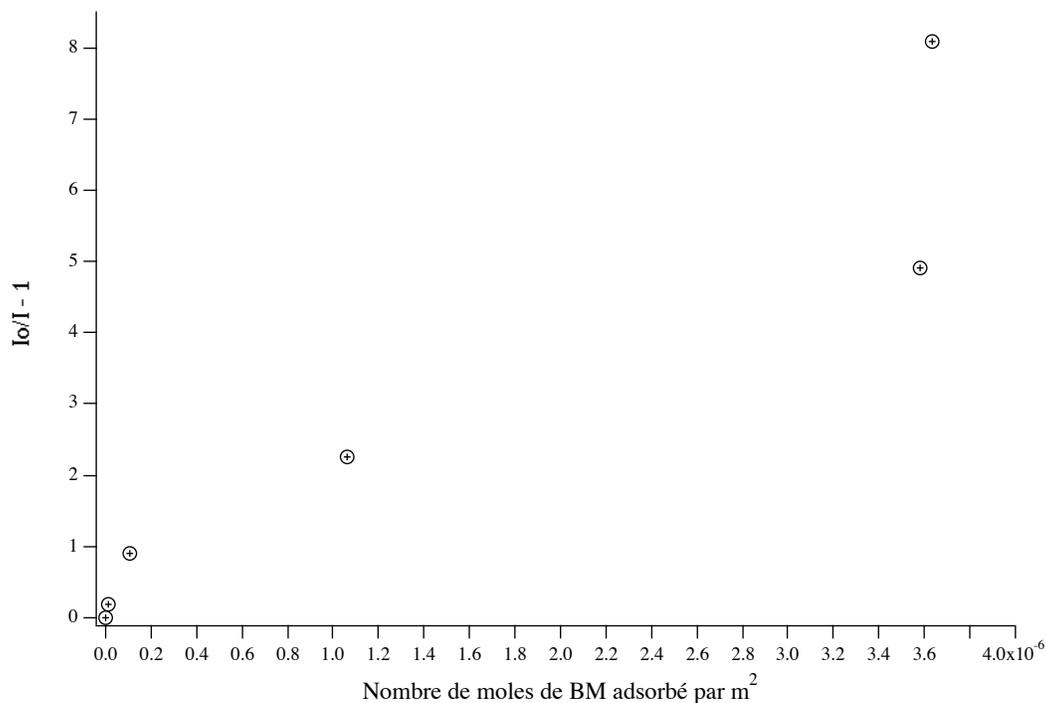


Figure III.9. *Tracé de Stern-Volmer, pour les latex « Orange 100 Carboxylate » en présence de BM.*

Afin de décrire plus quantitativement l'extinction, nous présentons figure III.9 un tracé de Stern-Volmer. Celui-ci ne varie pas linéairement avec la quantité de BM adsorbé par unité de surface. Nous pouvons observer une incurvation vers le bas. Le dernier point correspond à un taux de couverture maximum, la valeur du plateau de saturation de l'adsorption a en effet été mesuré à $3,7 \cdot 10^{-6}$ moles de BM adsorbé par m². Comme pour les billes « Orange 100 sulfate », l'incurvation vers le bas du tracé de Stern-Volmer permet de supposer l'existence de deux populations de fluorophores existents dans la bille. Nous présentons donc, figure III.10., un tracé « modifié » de Stern-Volmer.

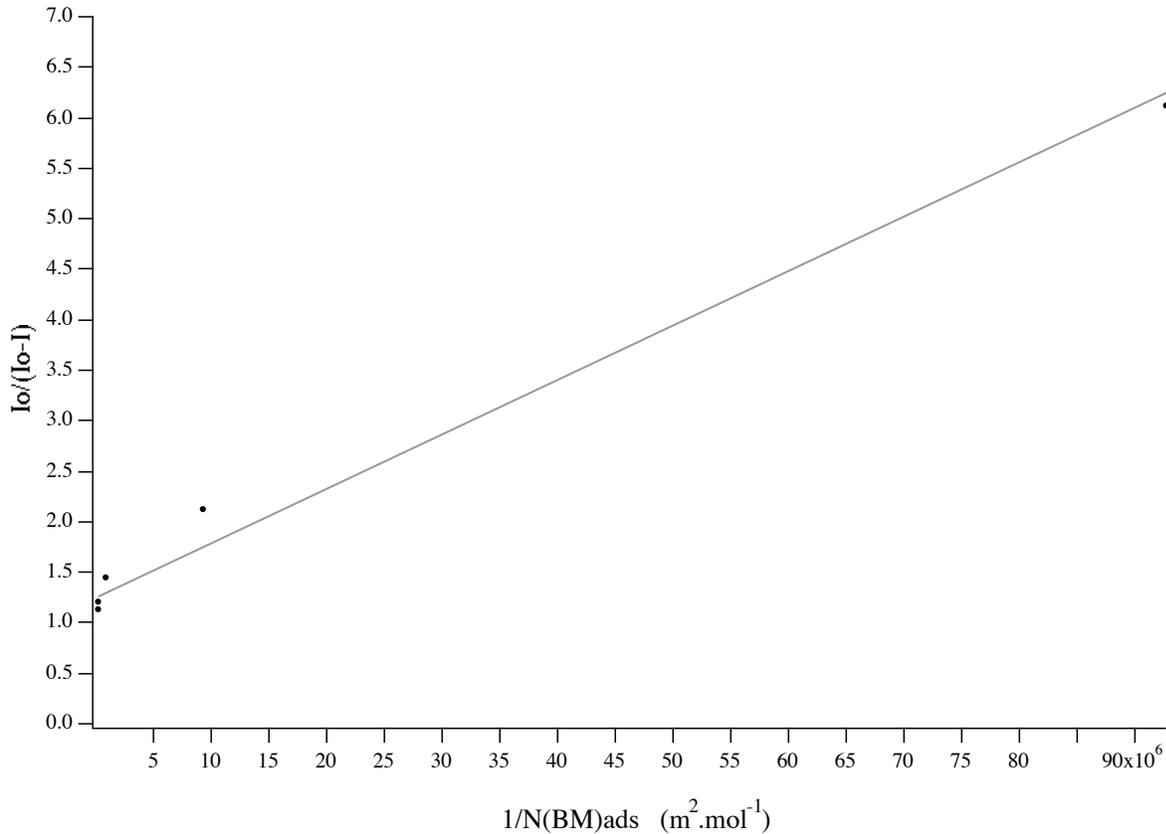


Figure III.10. *Latex « Orange 100 carboxylate » et BM - Tracé de Stern-Volmer modifié, en supposant l'existence de deux populations de fluorophores*

L'ajustement du tracé modifié de Stern-Volmer (figure III.10.) par une droite donne une ordonnée à l'origine $(f)^{-1}=1,252 \pm 0,07$ et une pente $5,4 \cdot 10^{-8} \pm 10^{-8}$. La fraction de fluorophores accessibles est dans ce cas de 80 % et la constante K de $2,3 \cdot 10^7 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. L'incertitude sur les paramètres de l'ajustement linéaire, et en particulier sur la pente, est relativement élevée.

Cet ajustement n'est pas satisfaisant, et nous pouvons nous demander si l'allure du tracé « classique » de Stern-Volmer (figure III.9.) ne vient pas de la formation de dimères à partir de $2 \cdot 10^7 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$. La présence de deux espèces d'inhibiteur provoquerait alors une rupture de pente et un changement de « régime » d'extinction. La rupture de pente observée à $3,7 \cdot 10^6 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ correspond d'une part au seuil de saturation observé (figure III.2) mais pourrait aussi être due à la formation d'agrégats (multimères) à la surface.

III.3.1.3. Billes « Orange 40 carboxylate »

Nous avons travaillé à quantité de billes constante ($9 \mu\text{L}$ dans 5 mL , soit $9,9 \cdot 10^{12}$ billes, soit une surface de $0,06 \text{ m}^2$). Nous avons ensuite ajouté du BM en quantité connue.

Nous présentons sur la figure III.11. quelques spectres de fluorescence stationnaire :

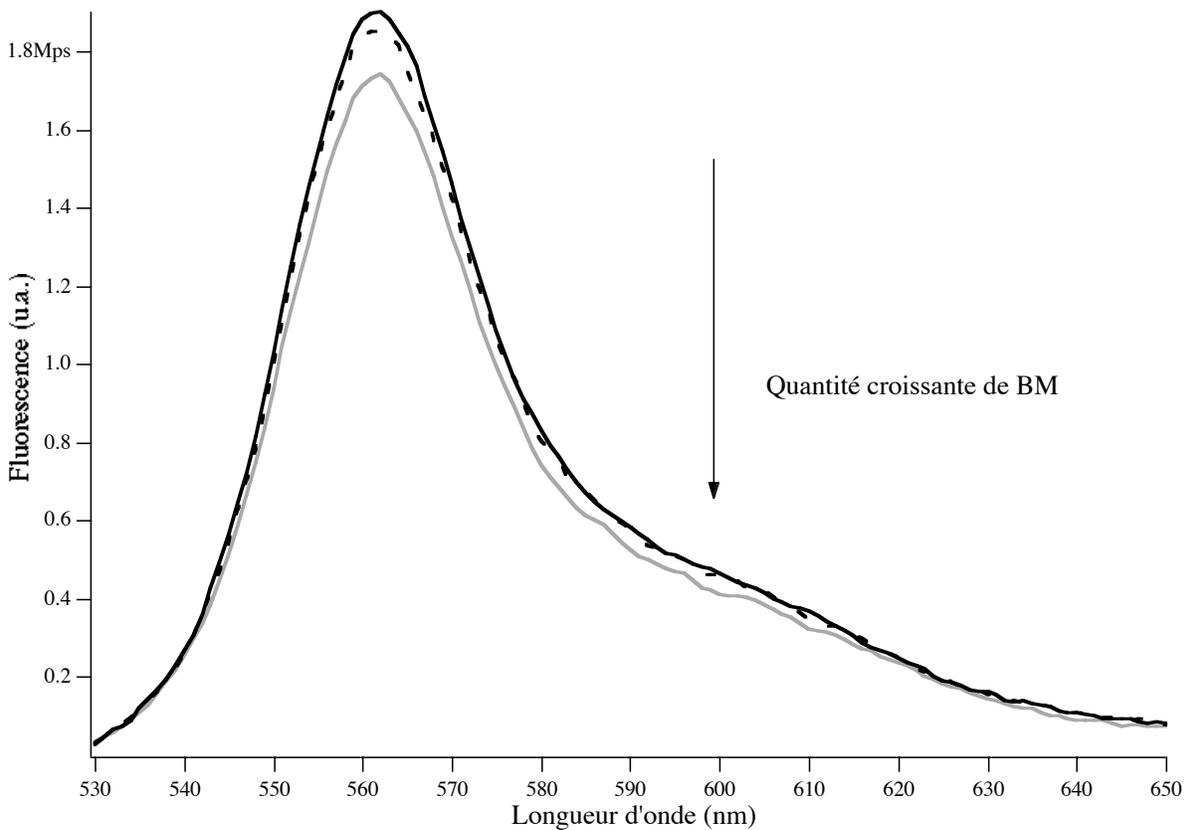


Figure III.11. Spectres de fluorescence stationnaire d'une solution de billes « Orange 40 carboxylate » dans l'eau. Excitation : 497 nm ; Emission : 562 nm
 Trait continu noir : Latex seuls (9 μL + 5 mL d'eau)
 Traits discontinus noirs : Latex et BM ; $[BM]_0 = 1,2 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{\text{surf}} = 10^{-10} \text{ mol.m}^{-2}$
 Trait continu gris : Latex et BM ; $[BM]_0 = 1,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{\text{surf}} = 9,3 \cdot 10^{-10} \text{ mol.m}^{-2}$
 Traits pointillés noirs : Latex et BM ; $[BM]_0 = 1,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{\text{surf}} = 9,2 \cdot 10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$
 Traits pointillés gris : Latex et BM ; $[BM]_0 = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{\text{surf}} = 9,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$

Nous observons une diminution de l'intensité de fluorescence lorsque la quantité de BM croît. Afin de décrire quantitativement l'extinction de fluorescence, nous présentons un tracé de Stern-Volmer, figure III.12. :

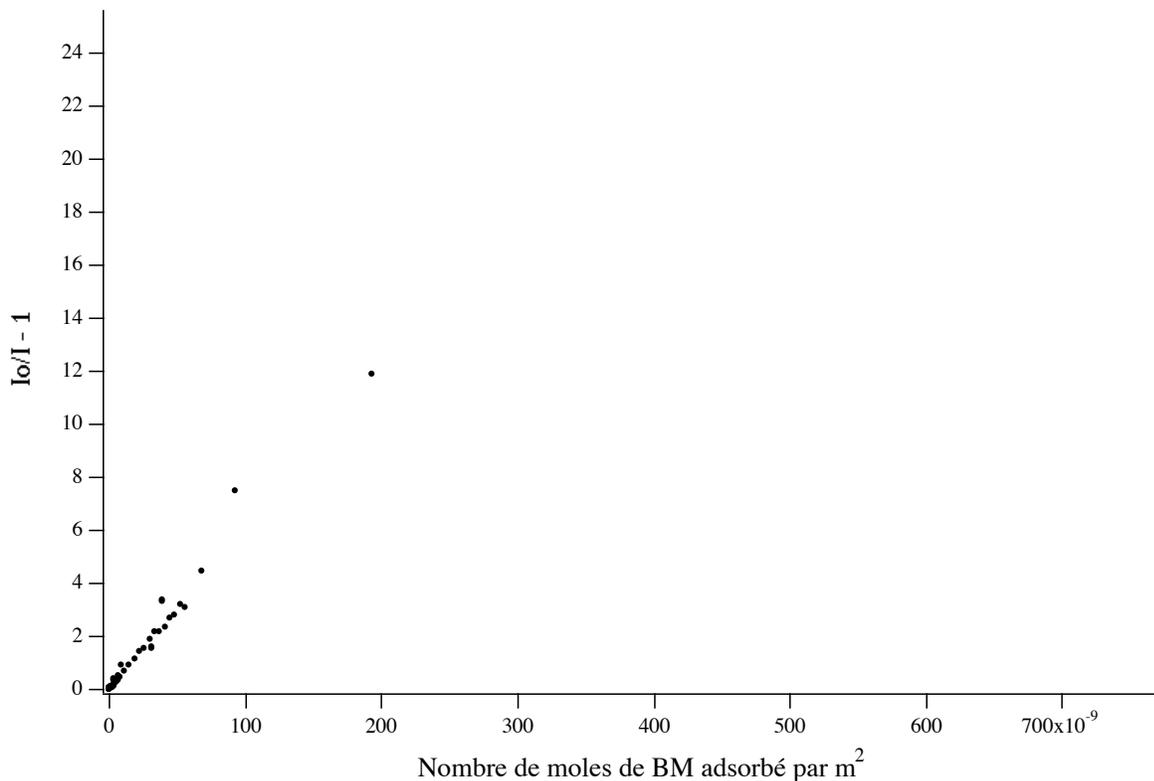


Figure III.12. *Tracé de Stern-Volmer, pour les latex « Orange 40 Carboxylate » en présence de BM.*

Le tracé de Stern-Volmer est linéaire, seul le dernier point ne se corrèle pas linéairement avec la quantité de quencher adsorbé. Nous sommes très en dessous du plateau théorique d'adsorption de Langmuir ($2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$). L'écart du dernier point peut être dû à une surestimation du plateau de saturation, que nous n'avons pu obtenir que par extrapolation. Il peut être aussi l'indication d'une saturation précoce de sites d'adsorption donnant spécifiquement une extinction de fluorescence. Peut-être y-a-t-il aussi formation de dimères à la surface des billes; ce qui modifierait le régime d'extinction.

Nous réalisons donc un ajustement linéaire sur tous les points, sauf celui à plus fort taux de couverture. Nous le présentons à la figure III.13. Par ajustement avec une droite de Stern-Volmer nous obtenons une pente de $6,4 \cdot 10^7 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. Cette valeur correspond à la constante de quenching, presque trois fois supérieure à celle des billes « Orange 100 sulfate » et « Orange 100 carboxylate ».

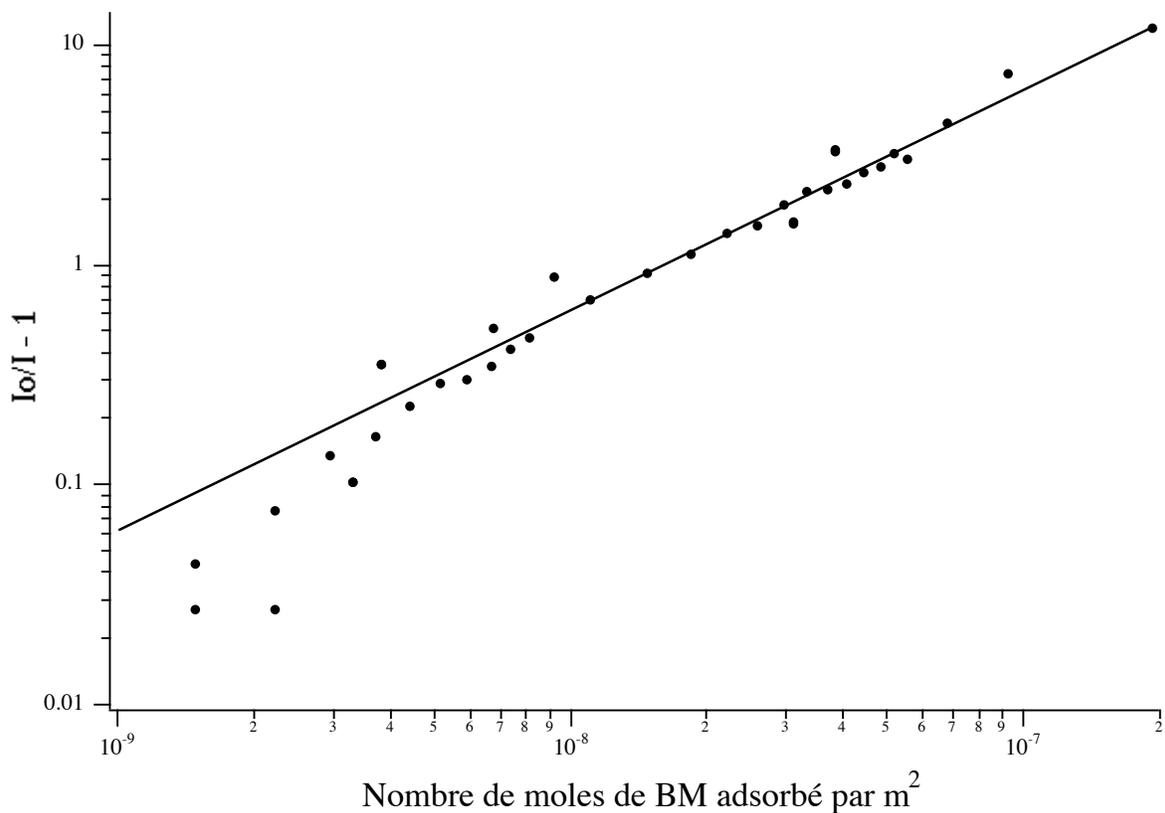


Figure III.13. Agrandissement du tracé de Stern-Volmer pour les billes « Orange 40 carboxylate » et ajustement linéaire.

Un tel comportement peut s'expliquer de deux façons

- soit l'extinction de la fluorescence par le BM est plus efficace avec les billes de 40 nm de diamètre qu'avec celle de 100 nm de diamètre. Ceci est en accord avec les expériences de relaxation d'anisotropie (Chapitre II, figure II.24). La relaxation de l'anisotropie de fluorescence est en effet plus rapide pour les billes de 40 nm de diamètre que celle des billes de 100 nm.
- soit l'hypothèse concernant l'extrapolation des paramètres de Langmuir est partiellement incorrecte. Il est possible que la stabilité du complexe BM-fluorophore augmente avec la densité surfacique de charge. La constante d'affinité du BM pour les billes de 40 nm pourrait être plus élevée que celles des 100 nm carboxylate.

Le comportement linéaire indique qu'il est impossible de distinguer deux populations de fluorophores. La linéarité de l'ajustement de l'extinction de la fluorescence s'observe jusqu'à 91 % d'extinction pour un taux de couverture de 14 %. Une seule population de fluorophores existe dans les billes « Orange 40 carboxylate ». Tous les fluorophores sont équivalents.

Afin de savoir si le BM s'adsorbe et se désorbe pendant le temps des processus photophysiques, *i.e* s'il diffuse durant l'extinction de la fluorescence, nous avons étudié l'effet de la viscosité. Nous avons travaillé avec des solutions aqueuses de saccharose, nous avons accru la viscosité relative du milieu de 2 à 5 centipoises (la viscosité de l'eau est de 0,897 centipoise¹⁴⁰). Pour une concentration donnée en BM, nous n'avons vu aucun effet de la viscosité. Les effets du BM sur l'intensité de fluorescence des billes sont identiques que ce soit dans l'eau ou dans des solutions de saccharose de viscosité variable. Nous en avons donc conclu que l'extinction de la fluorescence par le BM n'est pas contrôlée par la diffusion. De fait les constantes d'affinité du BM pour les billes sont élevées. Elles traduisent une certaine irréversibilité de l'adsorption.

III.3.1.4. Billes « Orange 20 carboxylate »

Nous avons travaillé à quantité de billes constante (13 μL dans 4 mL, soit $1,7 \cdot 10^{14}$ billes, soit une surface de $0,1 \text{ m}^2$). Nous avons rajouté ensuite ajouté du BM en quantité connue.

Nous présentons sur la Figure III.14. quelques spectres de fluorescence stationnaire :

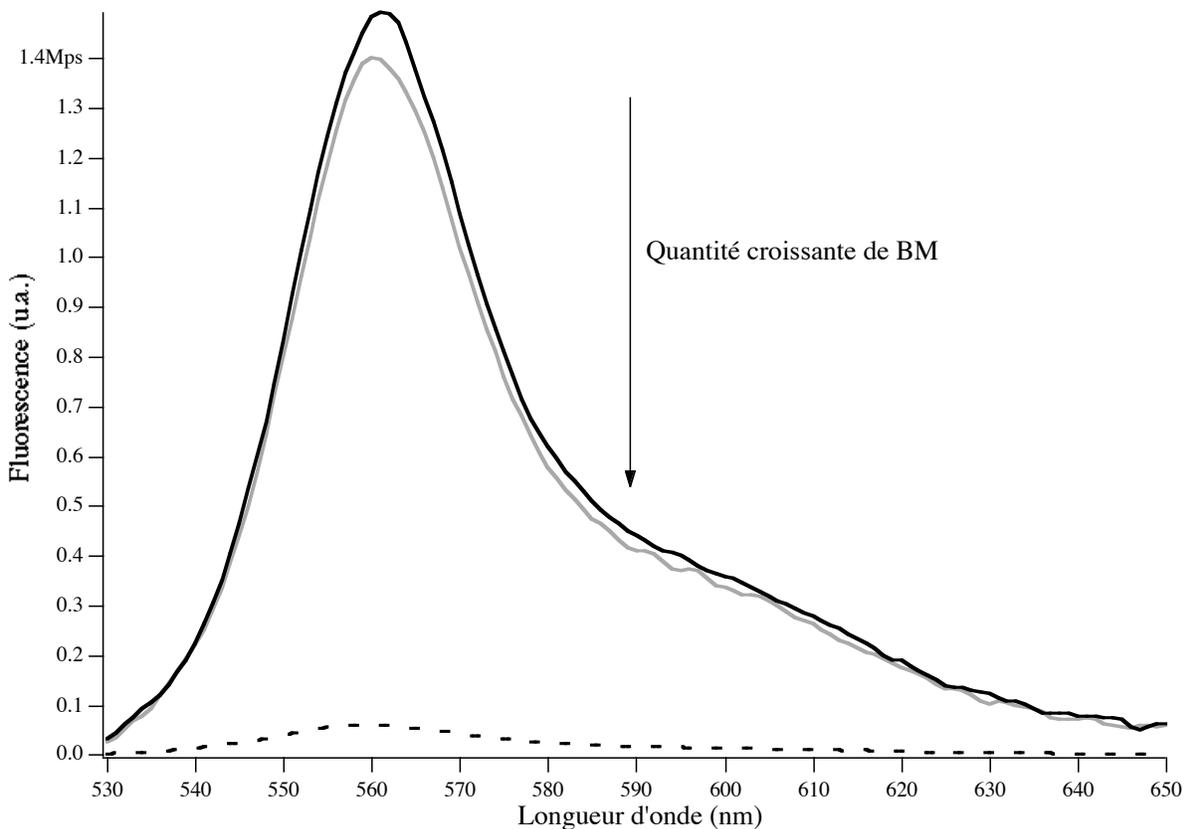


Figure III.14. Spectres de fluorescence stationnaire d'une solution de billes « Orange 20 carboxylate » dans l'eau. Excitation : 497 nm ; Emission : 562 nm
 Trait continu noir : Latex seuls (13 μL + 4 mL d'eau)
 Trait continu gris : Latex et BM ; $[BM]_0 = 2 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{surf} = 9,6 \cdot 10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}$
 Traits pointillés noirs : Latex et BM ; $[BM]_0 = 2,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{surf} = 10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$

Traits pointillés gris : *Latex et BM* ; $[BM]_0 = 1,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{surf} = 8,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$
 Traits discontinus noirs : *Latex et BM* ; $[BM]_0 = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{surf} = 9,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$

Nous observons une diminution de l'intensité de fluorescence lorsque la quantité de BM croît, nous mettons ainsi en évidence une extinction de la fluorescence des billes par le BM.

Nous avons représenté, figure III.15., l'ajustement par un modèle de Stern-Volmer. Nous pouvons observer un comportement linéaire jusqu'à un taux de couverture de $10^{-7} \text{ mol.m}^{-2}$. Ce taux correspond au seuil théorique de saturation de l'adsorption. Pour les échantillons beaucoup plus concentrés ($[BM]_0 = 1,7 \cdot 10^{-5}$ et $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ respectivement), le processus ne suit plus la même loi, nous sommes alors au-delà de la saturation de la surface, nous changeons donc de régime, il pourrait y avoir formation de dimères à la surface des billes.

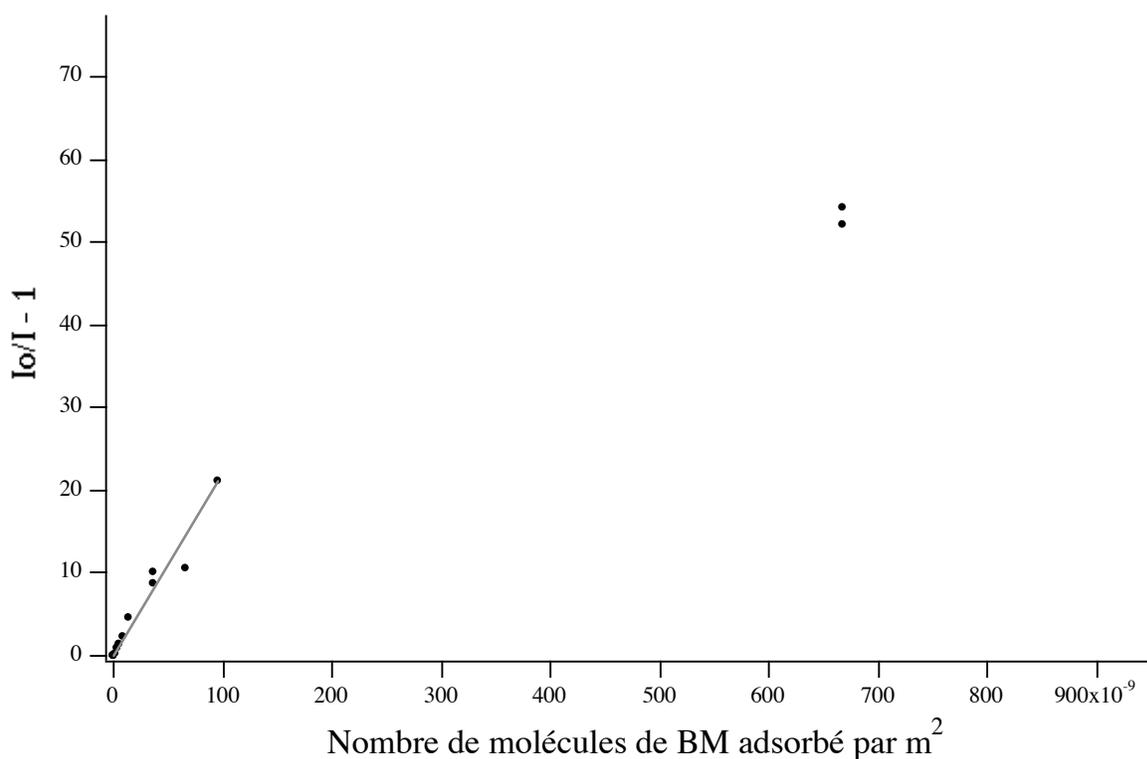


Figure III.15. *Tracé de Stern-Volmer pour les latex « Orange 20 carboxylate » en présence de BM.*

Un ajustement linéaire sur la première partie du tracé, jusqu'au seuil de saturation nous donne une constante K de $2,2 \cdot 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. Cette constante est trois fois plus élevée que pour les latex « Orange 40 carboxylate ». Il y a une seule population de fluorophores.

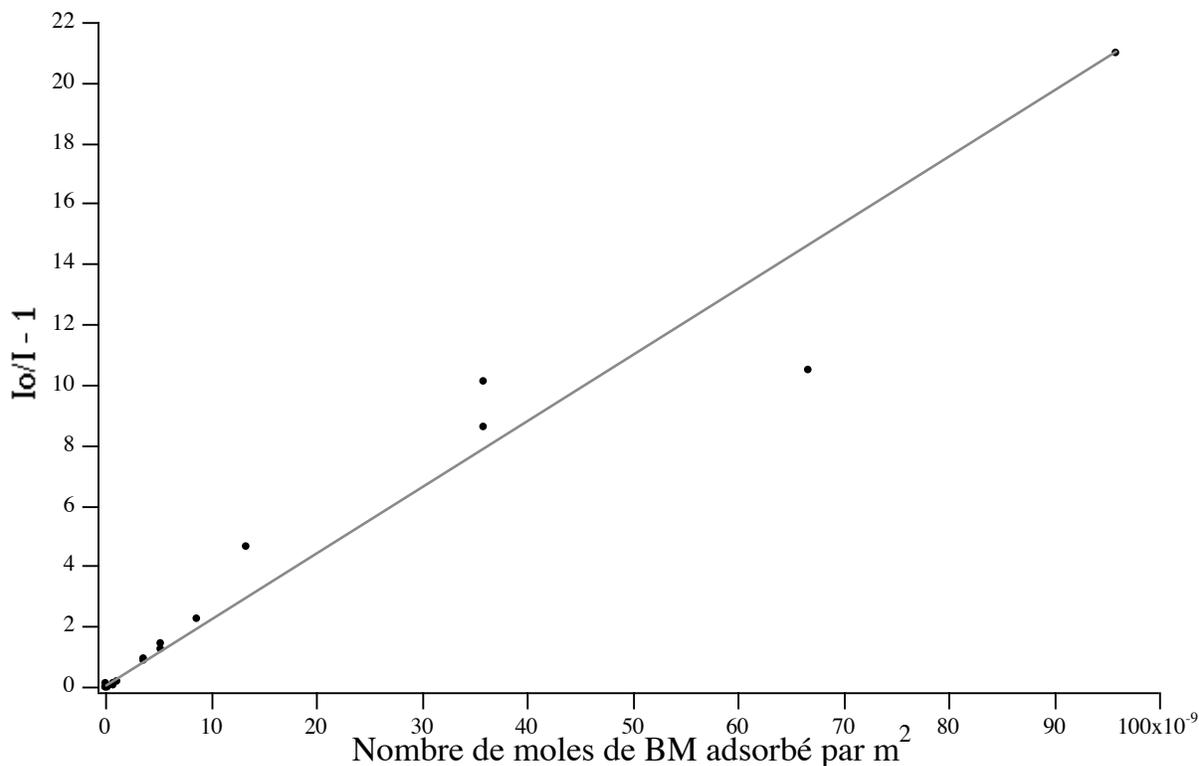


Figure III.16. *Agrandissement du tracé de Stern-Volmer, ajustement linéaire*

Cette différence, en terme d'efficacité d'extinction, ne se corrèle pas avec les résultats de relaxation d'anisotropie : en effet, nous avons observé au chapitre II (figure II.24) une dépolarisation de la fluorescence un peu plus rapide pour les « Orange 40 carboxylate » que pour les « Orange 20 carboxylate ».

Il nous faut remarquer que nous n'avons pas pu mesurer l'isotherme d'adsorption du BM sur les billes de 20 et 40 nm. Nous pouvons nous demander si la différence des constantes de quenching ne révèle pas une différence de constante d'affinité.

III.3.2. De l'existence du transfert d'énergie des billes vers le BM

Nous avons affirmé jusqu'à présent que l'extinction de fluorescence avait lieu selon un transfert d'énergie résonant. Nous présentons ici quelques expériences qui confirment que l'inhibition de la fluorescence se fait par transfert d'énergie résonant et non par un autre phénomène.

Nous présentons tout d'abord des spectres d'émission de fluorescence stationnaire réalisés avec une longueur d'onde d'excitation de 390 nm (figure III.17.) qui correspond à un minimum d'absorption du BM. Nous étudions une solution de latex « Orange 40 carboxylate » ($9,9 \cdot 10^{12}$ billes) tout d'abord en absence de BM (courbe 1), puis une solution de BM à $6,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$

(courbe 3) et enfin une solution de latex ($9,9 \cdot 10^{12}$ billes) en présence de BM ($6,6 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹) (courbe 2).

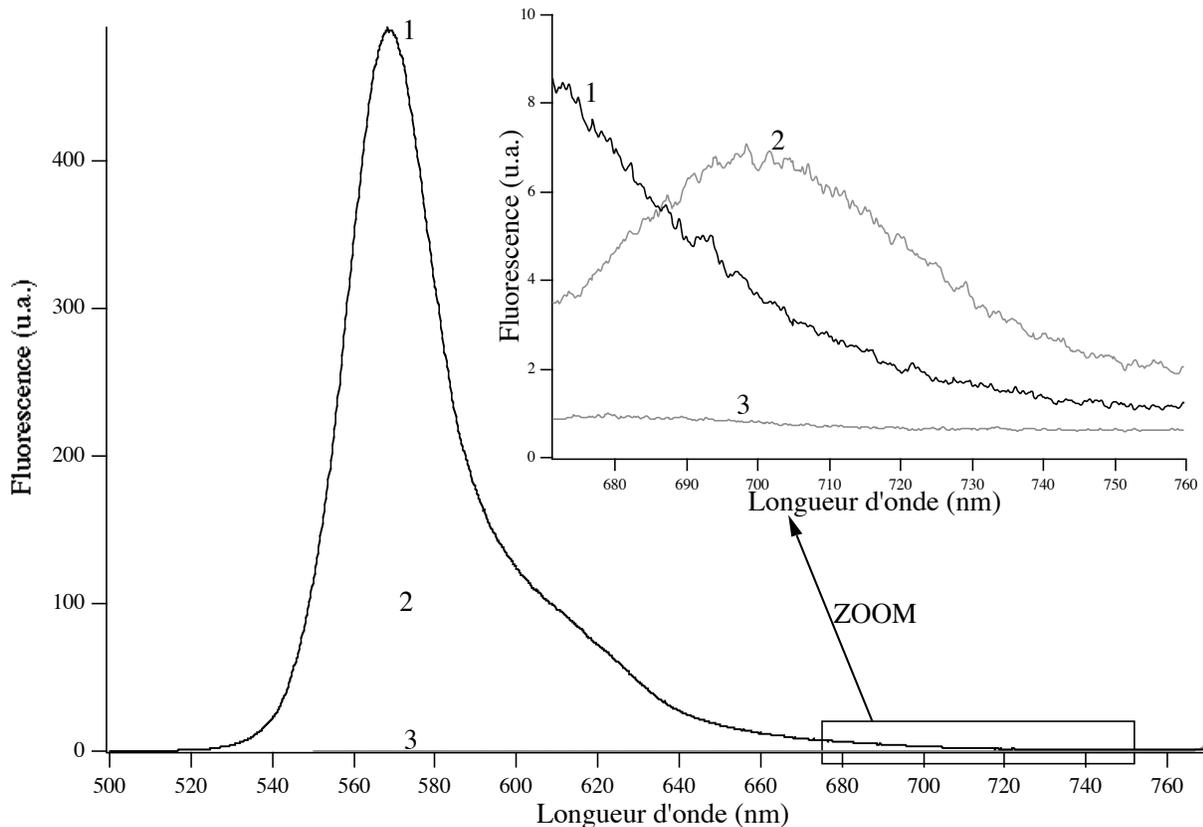


Figure III.17. Spectres d'émission de fluorescence (excitation 390 nm) d'une solution de latex « Orange 40 carboxylate » en absence (1) et en présence de BM (2). La courbe (3) est une solution référence de BM.

Les courbes (3) et (1) nous servent de référence. Intéressons-nous à la courbe (2) : il s'agit d'une solution de latex en présence de BM. La bande d'émission de fluorescence du latex (562 nm) a diminué en intensité par rapport à (1), et si nous faisons un agrandissement sur la gamme de longueur d'onde 680-750 nm nous observons l'apparition d'une bande de fluorescence qui n'existait ni dans (1) ni dans (3). Le BM est fluorescent, mais avec un faible rendement quantique. La solution (3), solution de BM de référence, ne montre quasiment pas de fluorescence, en revanche la même solution mise en présence de latex (2) possède une fluorescence accrue. Il y a donc transfert d'énergie des billes au BM : la bande d'émission de fluorescence des latex diminue alors que celle du BM augmente.

Le même phénomène est observé pour toutes les autres billes.

Nous avons également réalisé les spectres d'excitation (figure III.18.) des solutions 1, 2, 3 en fixant la longueur d'onde d'émission à 700 nm (nous observons essentiellement la fluorescence du BM).

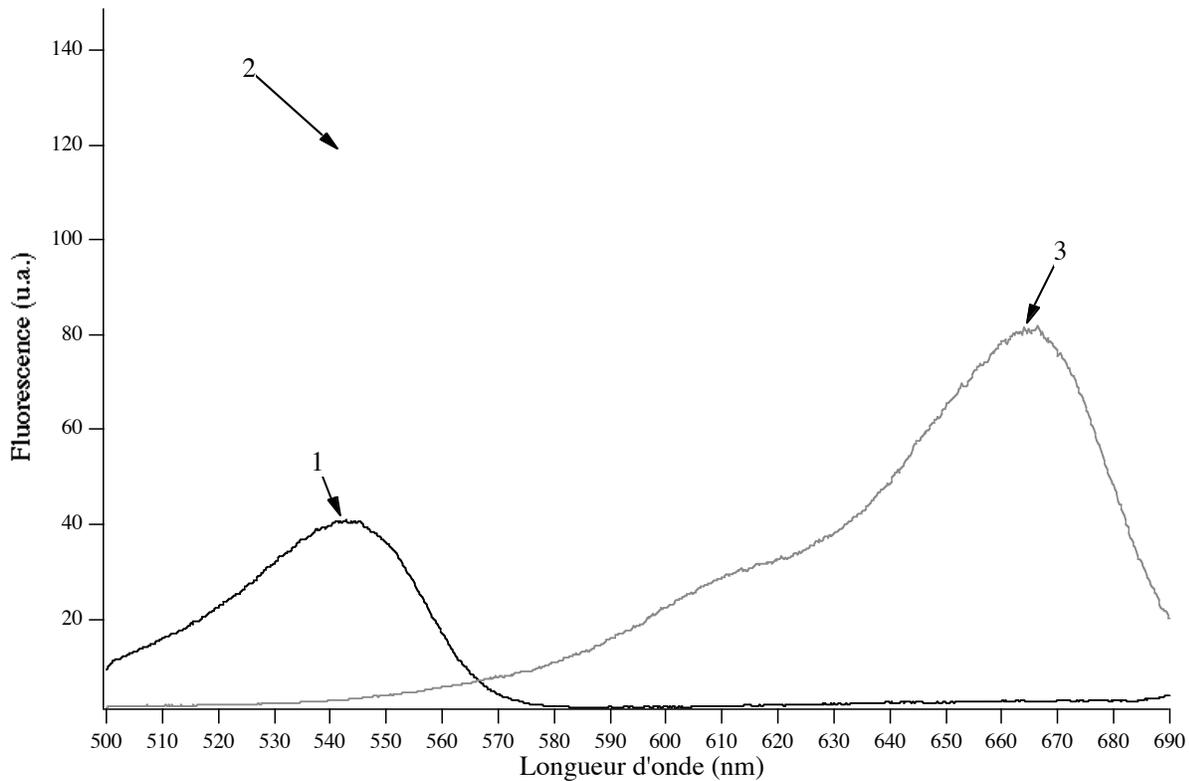


Figure III.18. Spectres d'excitation de fluorescence (émission 700 nm) (1) solution de latex « Orange 40 carboxylate » (2) latex et BM (3) solution de référence de BM

Nous nous servons des tracés (3) et (1) comme de référence (BM seul et latex seuls). Commentons l'allure de la courbe (2) : la bande de fluorescence du BM est plus intense que celle de la solution de référence (3). Ceci montre qu'il y a transfert d'énergie des billes vers le BM. Il faut aussi remarquer que la bande d'excitation des latex est plus intense en présence de BM qu'en absence de quencher (1). Ceci est une autre preuve du transfert d'énergie des fluorophores des billes vers le BM. Les mêmes observations peuvent être faites avec toutes les autres billes.

III.3.3. Bilan et conclusions

Nous avons rassemblé dans le tableau III.4. les résultats des ajustements de type Stern-Volmer et Stern-Volmer modifié pour les quatre types de billes étudiées. Le BM adsorbé à la surface des billes de latex induit une extinction de la fluorescence des molécules de BODIPY de la matrice, et ce quel que soit le type de billes étudié. Cette inhibition de la fluorescence semble d'autant plus efficace

(constante de Stern-Volmer) que le diamètre des billes est petit. Ceci peut être dû à l'augmentation du volume de la bille accessible au quenching direct par le BM lorsque la taille diminue. Cependant cet effet ne peut pas entièrement expliquer le pourcentage effectivement accessible, il faut donc supposer qu'il y a homotransfert au sein des billes.

	Pourcentage de fluorophores accessibles	Constante de Stern-Volmer (m ² .mol ⁻¹)	Fraction du volume de la sphère accessible au transfert direct D-A (c)
« Orange 100 sulfate »	49 %	2,4.10 ⁷ (a)	21 %
« Orange 100 carboxylate »	80 % -	2,3.10 ⁷ (a) non linéaire (b)	27 %
« Orange 40 carboxylate »	100 %	6,4.10 ⁷ (b)	52 %
« Orange 20 carboxylate »	100 %	2,2.10 ⁸ (b)	97 %

Tableau III.4. *Extinction de la fluorescence de billes de latex par le BM, résultats des ajustements de Stern-Volmer*

(a) Equation de Stern-Volmer modifiée car l'existence de deux populations de fluorophores est supposée

(b) Equation de Stern-Volmer classique, tous les fluorophores sont équivalents.

(c) la fraction se calcule selon $1 - \frac{(R_{bille} - R_0)^3}{R_{bille}^3}$

Pour les billes de 100 nm « sulfate », une incurvation vers le bas du tracé de Stern-Volmer a pu être interprétée grâce à l'existence de deux populations de fluorophores. Le modèle pour ces billes pourrait être le suivant : une partie des BODIPY serait accessibles aux quenchers, et une autre non. Nous pouvons imaginer un modèle de type « couronne » (Cf. Figure III.19.) où la fluorescence des molécules du coeur de la bille n'est pas éteinte, alors que celle des molécules plus en surface, réparties dans une couronne, est sensible au BM.

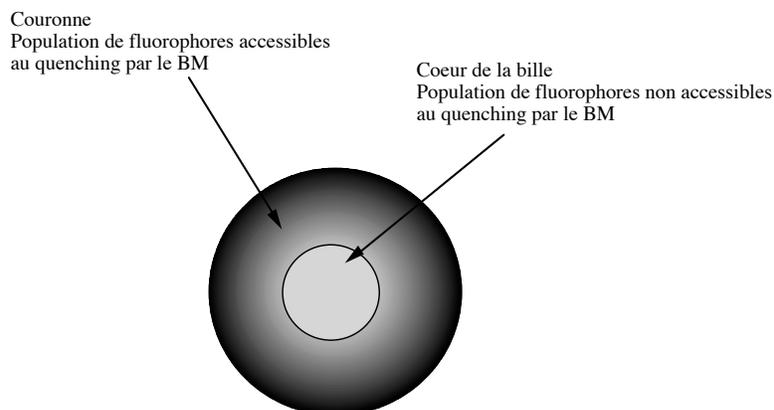


Figure III.19. Schéma selon un modèle de « couronne » des deux populations de fluorophores dans les billes de 100 nm de diamètre

Il faut envisager la possibilité que le transfert d'énergie entre chromophores s'effectue sur une distance inférieure à quelques dizaines de nanomètres, et ne soit pas effectif sur tout le volume de la bille.

Ce modèle semble cependant peu convaincant en ce qui concerne les latex « Orange 100 carboxylate ».

Le quenching sur les billes de 20 et 40 nm de diamètre présente un comportement de Stern-Volmer linéaire. Ainsi il n'y aurait dans les plus petites billes qu'une seule population de fluorophores. Des effets de viscosité sur les latex « Orange 40 carboxylate » ont montré que le quenching par le BM n'est pas limité par la diffusion de BM. Ainsi seules les molécules adsorbées à la surface des billes au moment de l'excitation participent à l'extinction de la fluorescence des billes.

Afin de mieux visualiser les différences lorsque le support change de taille et/ou de groupements de surface, nous allons comparer sur une même figure les tracés de Stern-Volmer obtenus pour les différentes billes (Figure III.20.) :

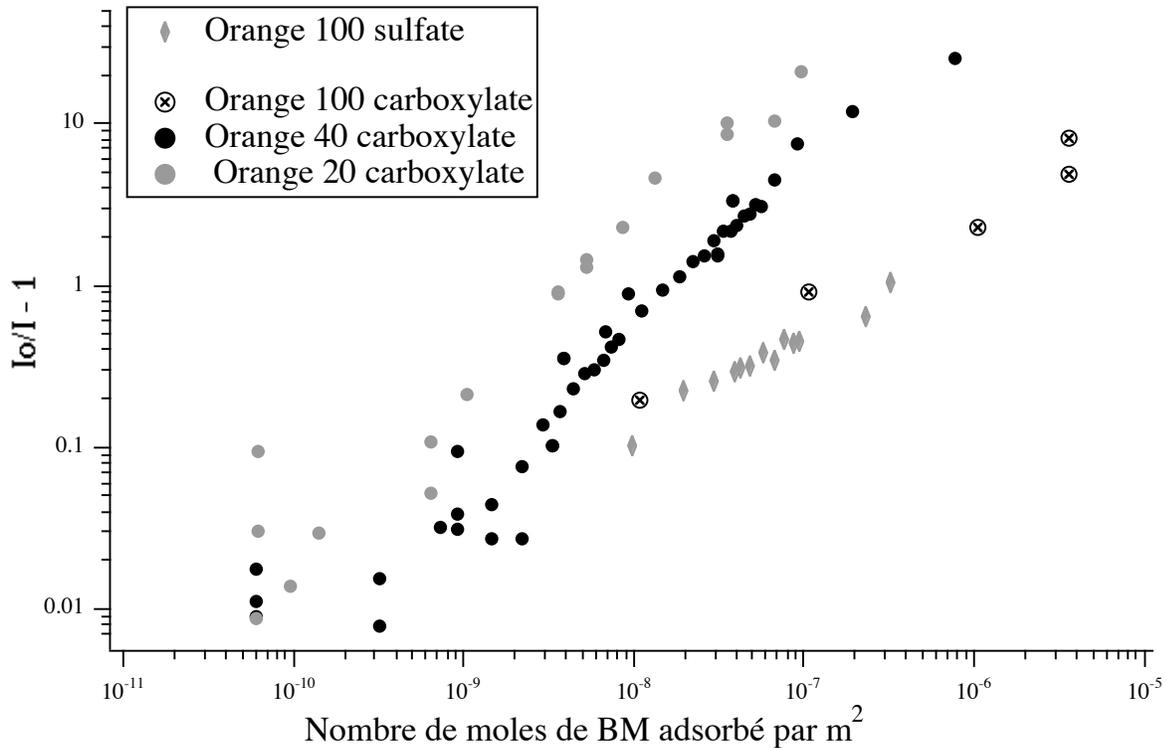


Figure III.20. *Tracés de Stern-Volmer pour les « Orange Fluospheres » en présence de BM, comparaison de l'extinction de fluorescence par le BM pour les quatre types de bille étudiées en fonction de la quantité de BM adsorbé par unité de surface.*

L'effet du BM commence à être significatif et mesurable à partir de 10^{-9} mol.m⁻² pour les latex « Orange 20 carboxylate » et « Orange 40 carboxylate » soit 1-4 molécules par bille. Avec les latex de 100 nm de diamètre nous n'avons eu d'effets mesurables que pour des densités surfaciques supérieures à 10^{-8} mol.m⁻² soit environ 200 molécules par bille. Les billes sont d'autant plus sensibles que leur surface est petite.

Conclusions :

Nous savons maintenant que l'adsorption du BM à la surface de billes « Orange Fluospheres » induit une extinction de la fluorescence des billes. Jusqu'ici le BM répond aux exigences requises comme sonde modèle.

III.4. Effet de l'ajout de BM sur les propriétés des billes de latex Orange : spectroscopie de fluorescence résolue en temps.

Nous allons étudier les déclin de fluorescence résolue en temps de solutions aqueuses de latex mises en présence de BM. Nous travaillons en cuve, avec le montage décrit dans l'annexe B. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 497 nm. La longueur d'onde de détection est à 562 nm. Les résultats d'extinction de la fluorescence seront présentés, comme précédemment, en fonction du nombre de moles de BM adsorbé à la surface des billes, soit σ_{surf} (mol.m⁻²).

Nous allons tout d'abord présenter les résultats expérimentaux selon le type de bille étudié. Puis nous comparerons les effets du BM sur la fluorescence résolue en temps des billes.

III.4.1 Résultats expérimentaux

III.4.1.1. Billes « Orange 100 sulfate »

Nous avons travaillé avec un nombre constant de billes de latex (4 μL dans 4 mL d'eau soit $8,4 \cdot 10^{10}$ billes), puis nous avons ajouté du BM sur une gamme de concentrations allant de 10^{-10} mol.L⁻¹ à $7,4 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Nous présentons, figure III.21., quelques déclin de fluorescence des billes « Orange 100 sulfate » avec et sans BM. Les déclin sont normalisés au maximum afin de mieux visualiser les différences de durées de vie.

Nous constatons que le déclin de fluorescence est d'autant plus rapide que la quantité de BM est grande. Ainsi le BM adsorbé induit un effet d'extinction.

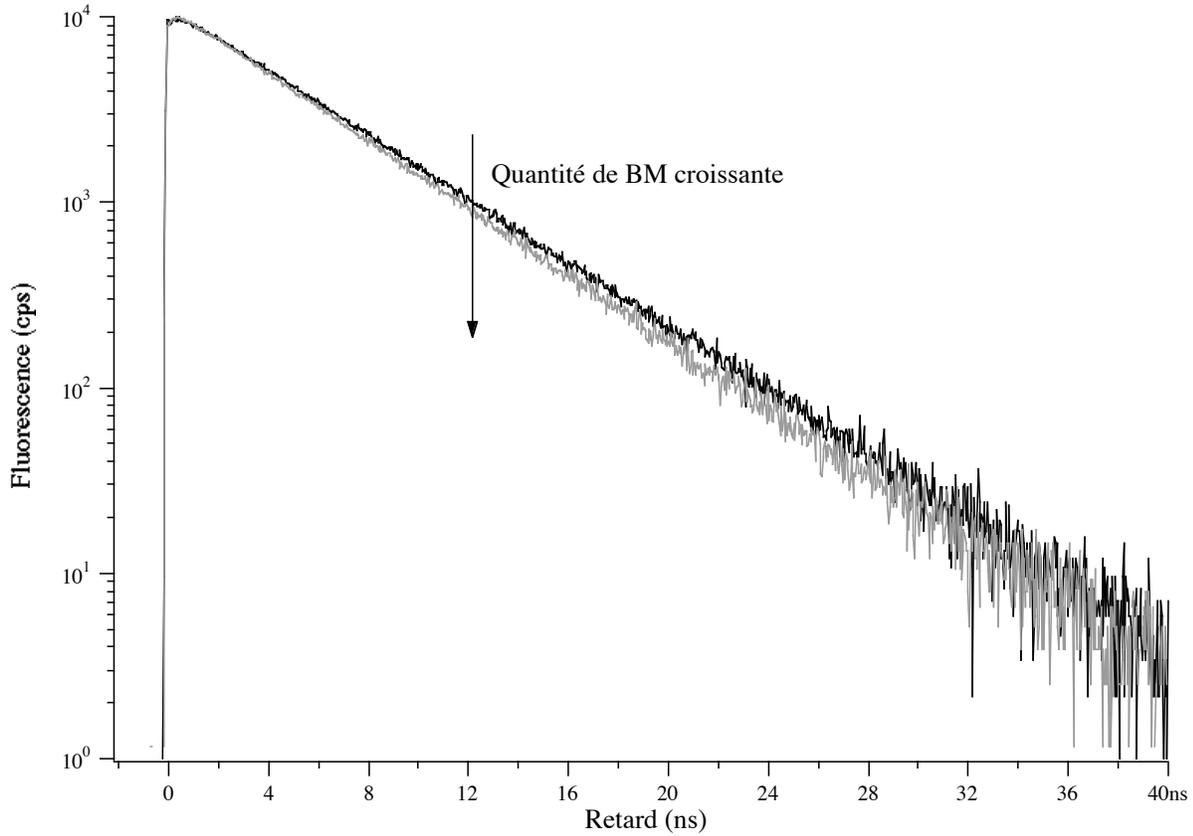


Figure III.21. *Déclins de fluorescence de billes de latex « Orange 100 sulfate » sans et avec BM - Excitation 497 nm - Emission 562 nm*

Trait noir : *Latex seuls (4 μ L + 4 mL eau soit 2.10¹³ billes)*

Trait gris : *Latex et BM ; [BM]₀ = 8,2.10⁻⁹ mol.L⁻¹ σ_{surf} = 4,6.10⁻⁹ mol.m⁻²*

Pointillés noirs : *Latex et BM ; [BM]₀ = 8,2.10⁻⁸ mol.L⁻¹ σ_{surf} = 4,3.10⁻⁸ mol.m⁻²*

Pointillés gris : *Latex et BM ; [BM]₀ = 8,2.10⁻⁷ mol.L⁻¹ σ_{surf} = 2,3.10⁻⁷ mol.m⁻²*

L'analyse des déclin montre que la présence de BM se traduit par un comportement biexponentiel. Nous avons pu ajuster les déclin en présence de BM par un déclin dont une durée de vie est laissée fixe à 5,2 ns, et la seconde durée de vie est libre de varier selon la quantité de BM. Ainsi le déclin est ajusté selon une équation de la forme :

$$I(t) = a * \exp\left(-\frac{t}{\tau_0}\right) + b * \exp\left(-\frac{t}{\tau_q}\right) \quad (\text{III.6})$$

où τ_0 est la durée de vie des billes sans quencher ($\tau_0 = 5,2$ ns), τ_q est la durée de vie des fluorophores quenchés par le BM. Ce type de modèle est en accord avec le modèle de la couronne avec deux populations de fluorophores : une accessible à l'extinction par le BM, de durée de vie τ_q ; et une autre population non accessible à l'extinction, de durée de vie $\tau_0 = 5,2$ ns (Cf. figure III.19.)

Nous avons tracé la constante de vitesse de quenching k_q (τ_q^{-1}) en fonction du nombre de moles de BM adsorbé par unité de surface (Figure III.22.).

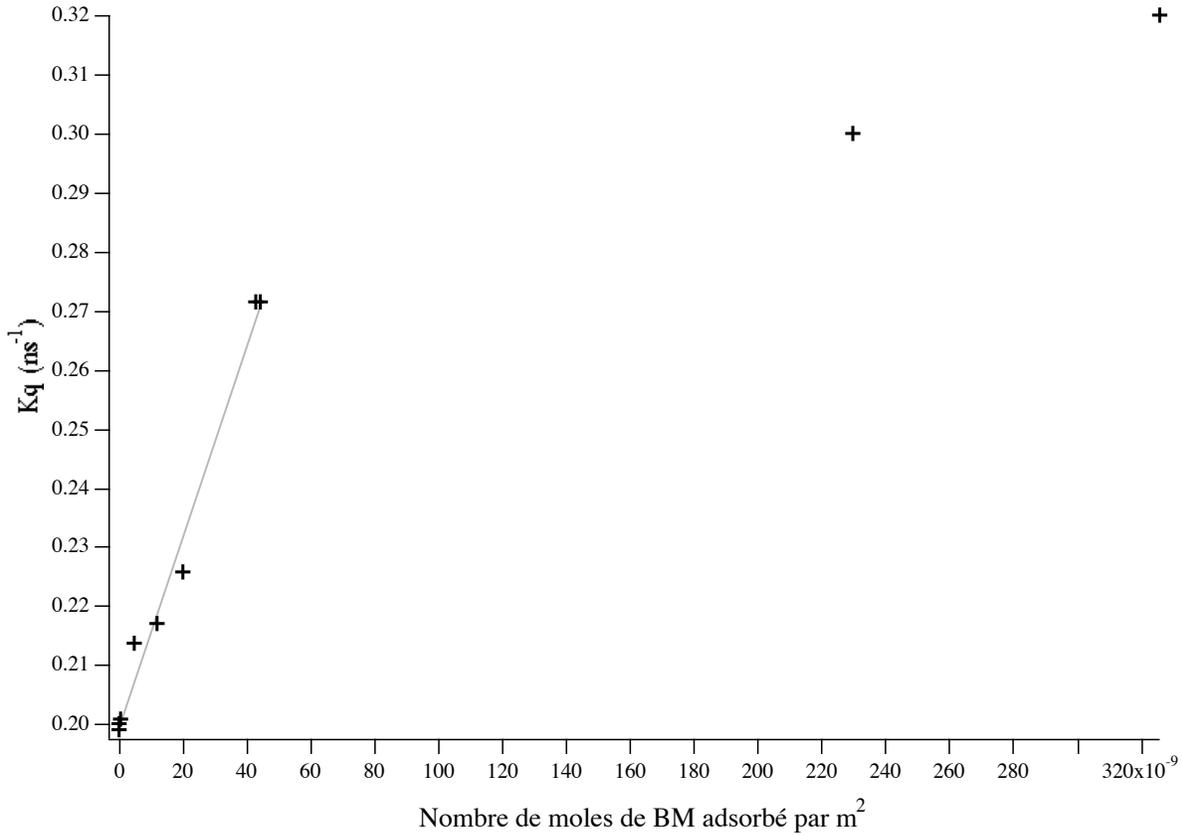


Figure III.22. *Evolution de la constante de vitesse de quenching en fonction de la quantité de BM adsorbé sur les billes « Orange 100 sulfate » - Ajustement par une droite*

La fluorescence des BODIPY accessibles par le BM décline d'autant plus rapidement que la quantité de BM adsorbé est grande. Le seuil de détection se situe à partir de $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$, soit 140 molécules de BM par bille. A faibles taux de couvertures la constante de vitesse peut être ajustée par une droite de pente de $1,6 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \cdot \text{ns}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \pm 8 \cdot 10^4$. Lorsque nous nous rapprochons du taux de couverture maximal, la durée de vie des déclins semble atteindre un plateau.

A partir des coefficients a et b qui pondèrent les termes de l'ajustement biexponentiel, nous pouvons déduire le poids (P_q) de la composante quenchée selon :

$$P_q = \frac{b}{a + b} \quad (\text{III.7})$$

Sur la figure III.23., nous avons représenté l'évolution de ce poids, P_q , en fonction de la quantité de BM adsorbé. Ce poids est représentatif du pourcentage de fluorophores qui sont accessibles à l'extinction par le BM.

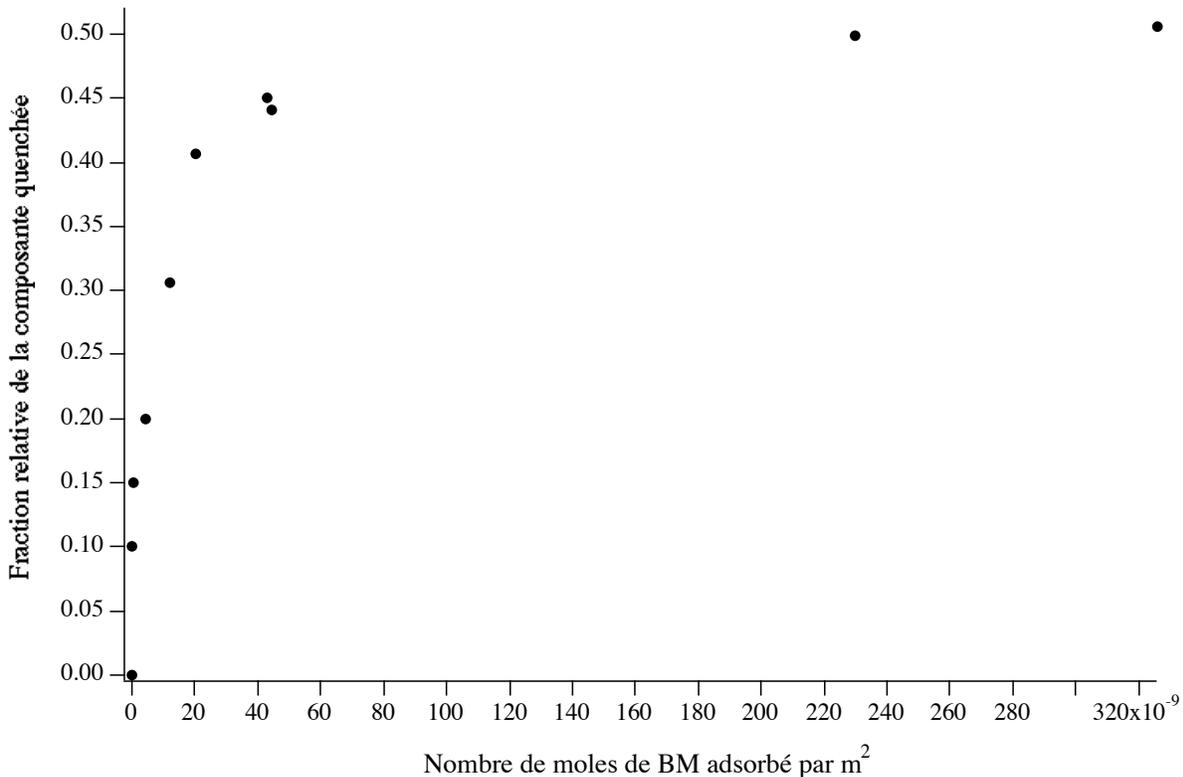


Figure III.23. *Evolution du poids de la composante quenchée dans les déclins de fluorescence des billes « Orange 100 sulfate » en fonction de la quantité de BM adsorbé par unité de surface*

A faible taux de couverture, le poids de la composante quenchée augmente avec la quantité de BM adsorbé. Ainsi plus il y a de molécules de BM adsorbés à la surface des billes, plus il y a de fluorophores touchés par l'extinction de fluorescence. Cependant pour des taux de couverture supérieurs à 10^{-7} mol.m⁻², le poids de la composante quenchée atteint un palier. Ce palier est atteint avant le taux de couverture maximal ($3,4 \cdot 10^{-7}$ mol.m⁻²). La valeur du plateau du poids est alors d'environ 50 % : ainsi 50 % des fluorophores sont éteints, cela correspond à la valeur du pourcentage de fluorophores accessibles à l'extinction par le BM évaluée lors des expériences de fluorescence stationnaire. La saturation du poids de la composante éteinte peut s'expliquer par le fait que seule une partie des fluorophores est accessible, par exemple une couronne (Cf. Figure III.19.) Si le nombre d'inhibiteurs en surface est suffisant (10^{-7} mol.m⁻²) les fluorophores accessibles sont tous éteints. Pour des taux de couverture supérieurs la fraction de fluorophores

accessibles ne peut plus augmenter, mais la constante de vitesse augmente car l'adsorption de BM supplémentaire ajoute des voix de désactivations et augmente la probabilité de quenching.

Si nous faisons l'hypothèse d'une distribution uniforme, nous pouvons calculer l'épaisseur e de la couronne dans laquelle se situent les chromophores accessibles. Il suffit pour cela de définir une sphère de rayon r au coeur de la bille, de rayon R_{bille} . L'épaisseur de la couronne s'écrit comme :

$$e = R_{bille} - r \quad (\text{III.8})$$

Le volume de la sphère au coeur occupe 50% du volume de la bille, nous pouvons donc écrire

$$r = \frac{R_{bille}}{2^{\frac{1}{3}}} \quad (\text{III.9})$$

En combinant les expressions (III.8) et (III.9) nous trouvons une épaisseur de 12 nm pour la couronne, soit 2,5 fois la distance de Förster entre fluorophores et inhibiteur.

Nous pouvons évaluer l'efficacité de transfert pour un déclin multiexponentiel selon la relation :

$$E = 1 - \frac{\int I_{DA}(t) dt}{\int I_D(t) dt} \quad (\text{III.10})$$

où $I_{DA}(t)$ est le déclin de fluorescence des billes en présence de BM, et $I_D(t)$ est le déclin des billes sans BM⁵.

Pour une analyse multiexponentielle le déclin peut s'écrire comme :

$$I(t) = \sum_i \alpha_i * \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (\text{III.11})$$

et nous pouvons définir le paramètre $\langle \tau \rangle$ comme suit⁵ :

$$\langle \tau \rangle = \int I(t) dt = \sum_i \alpha_i * \tau_i \quad (\text{III.12})$$

Ainsi l'efficacité de transfert peut aussi s'écrire comme :

$$E = 1 - \frac{\langle \tau_{DA} \rangle}{\langle \tau_D \rangle} \quad (\text{III.13})$$

où $\langle \tau_D \rangle$ fait référence au déclin sans BM, et $\langle \tau_{DA} \rangle$ fait référence au déclin avec BM.

Nous avons représenté à la figure III.24, l'efficacité E en fonction de la quantité de BM adsorbé:

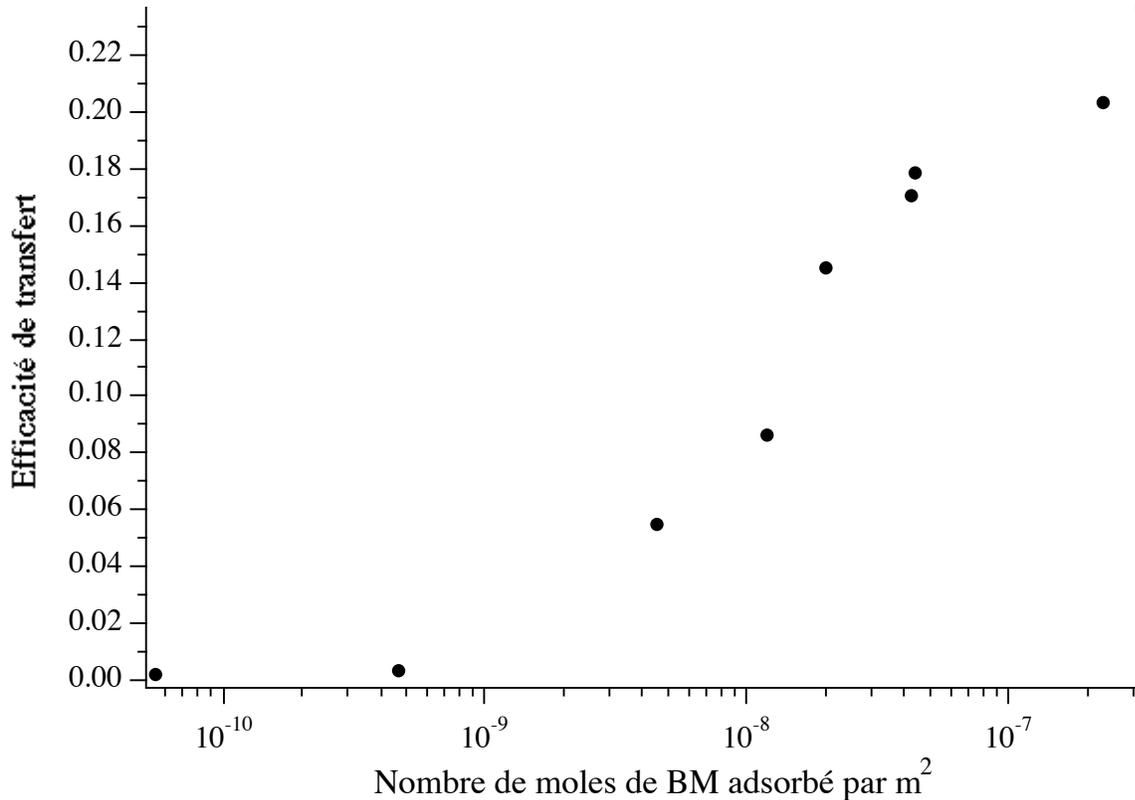


Figure III.24. *Efficacité du transfert d'énergie entre les billes « Orange 100 sulfate » et le BM adsorbé à la surface.*

Le transfert d'énergie est d'autant plus efficace que la quantité de BM adsorbé est grande. Cependant, aux taux de couverture élevés proches de la saturation, l'efficacité atteint une limite de l'ordre de 24 %. Cette valeur est faible et ne permet pas d'obtenir une bonne sensibilité.

Les expériences de fluorescence résolues en temps ont confirmé l'existence de deux populations de fluorophores : une au coeur dont la durée de vie n'est pas affectée par l'adsorption de BM, et une autre population en « couronne » qui représente 50 % des fluorophores et qui se trouverait sur épaisseur d'environ 12 nm.

Les effets du BM ne sont cependant pas satisfaisants dans la mesure où la sensibilité n'est pas optimale. D'autre part, seuls 50% des fluorophores sont quenchés, et les effets de l'adsorption croissante de BM sur l'allure des déclins ne sont pas très contrastés.

III.4.1.2. Billes « Orange 100 carboxylate »

Nous avons travaillé avec une quantité constante de billes de latex ($6 \mu\text{L}$ dans 4 mL d'eau soit $6,4 \cdot 10^{13}$ billes), puis nous avons ajouté du BM sur une gamme de concentrations allant de $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ à $3,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Nous présentons, figure III.25., quelques déclin de fluorescence des billes « Orange 100 carboxylate » avec et sans BM. Les déclin sont normalisés afin de mieux visualiser les différences de durées de vie.

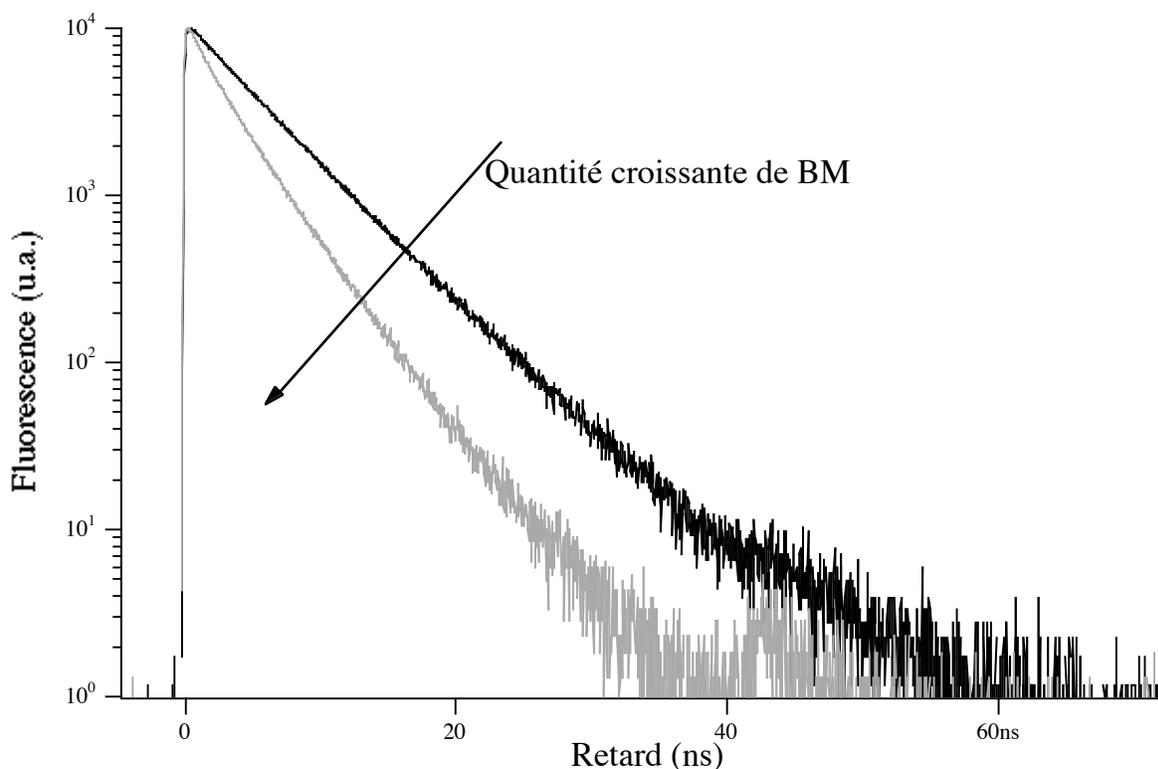


Figure III.25. Déclin de fluorescence de billes « Orange 100 carboxylate » avec et sans BM - Excitation 497 nm ; Emission 560 nm

Trait noir : Latex seuls ($6 \mu\text{L} + 4 \text{ mL}$ eau soit $6,4 \cdot 10^{13}$ billes)

Pointillés noirs : Latex et BM ; $[BM]_0 = 2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{\text{surf}} = 10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$

Trait gris : Latex et BM ; $[BM]_0 = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{\text{surf}} = 10^{-7} \text{ mol.m}^{-2}$

Pointillés gris : Latex et BM ; $[BM]_0 = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{\text{surf}} = 10^{-6} \text{ mol.m}^{-2}$

Pointillés noirs : Latex et BM ; $[BM]_0 = 3,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{\text{surf}} = 3,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.m}^{-2}$

Nous pouvons observer que les déclin de fluorescence sont d'autant plus rapides que la quantité de BM ajoutée est grande. De manière qualitative, la sensibilité des billes « Orange 100 carboxylate » est plus grande que celle des billes « Orange 100 sulfate ». En effet, le contraste de temps de déclin est plus large pour une même différence de concentration en BM.

Nous l'avons déjà signalé, chapitre II, les déclin sans BM ont un comportement qui peut être ajusté par une fonction biexponentielle (durées de vie : 6 ns et $4,3 \text{ ns}$). Comme nous pouvons le voir sur la

figure III.25, l'ajout du quencher rend le déclin plus complexe encore. Des tentatives d'ajustements à partir de modèles classiques sont restées infructueuses (Annexe F). Il n'apparaît pas de population de chromophores non éteints. Nous ne pouvons plus appliquer ici le modèle biexponentiel de la « couronne ». En effet, en fixant une durée de vie soit à 6 ns soit à 4,3 ns, les ajustements ne sont pas satisfaisants. Les déclins montrent que tous les chromophores sont sensibles à la présence du BM. Ainsi il n'y a pas de chromophores isolés. L'hypothèse de deux populations de fluorophores évoquée précédemment et déjà remise en cause (§ III.3.1.2.) n'est sans doute pas valable pour les « Orange 100 carboxylate ».

Seule une analyse multi-exponentielle convient. Cependant, nous ne pouvons attribuer de « réalité physique » aux différentes durées de vie de l'analyse. J. Lakowicz écrit cependant que l'analyse multiexponentielle est le modèle le plus puissant pour ajuster les déclins complexes⁵. Le paramètre dont l'évolution est intéressante à étudier en fonction de la quantité de quencher est alors la durée de vie moyenne $\bar{\tau}$, définie comme :

$$\bar{\tau} = \frac{\int_0^{\infty} t * I(t) * dt}{\int_0^{\infty} I(t) * dt} \quad (\text{III.14})$$

Nous nous intéresserons donc à l'évolution de $\bar{k} = \frac{1}{\bar{\tau}}$ en fonction du nombre de moles de BM adsorbé à la surface des billes, σ_{surf} (mol.m⁻²). Nous la présentons à la figure III.26. Afin de dilater l'abscisse nous avons choisi une représentation en échelle logarithmique :

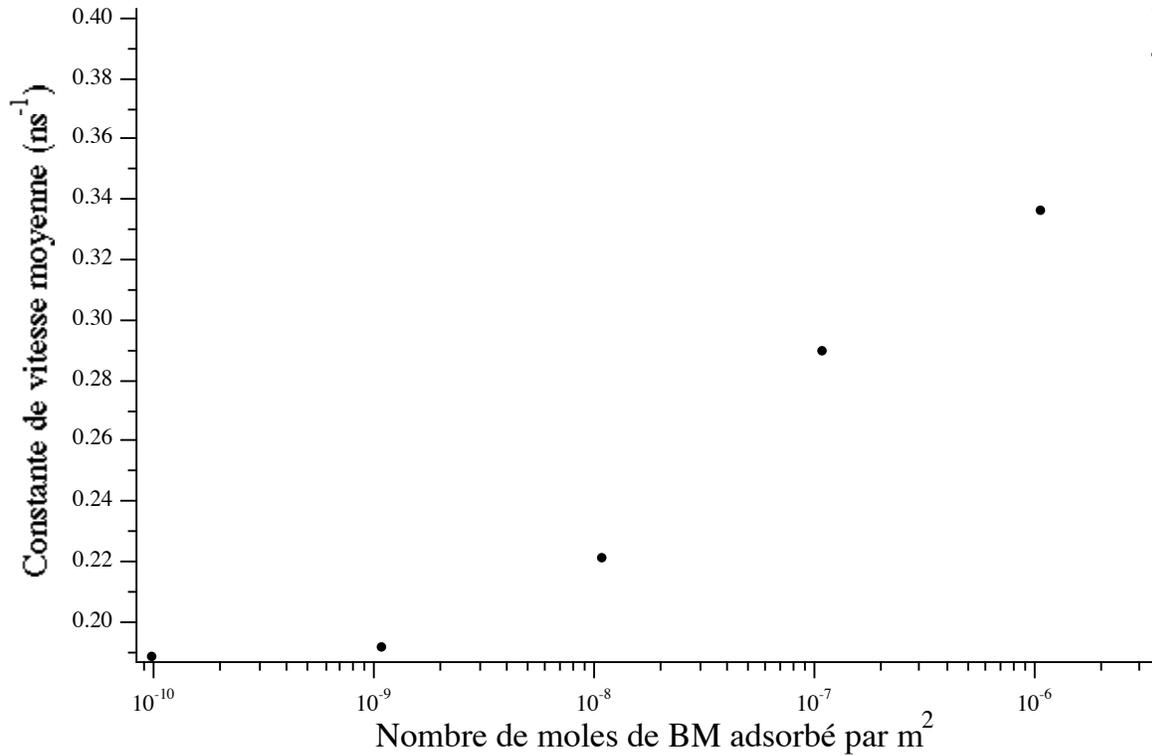


Figure III.26. Constante de vitesse moyenne ($\bar{k} = \frac{1}{\bar{\tau}}$) en fonction de la quantité de BM adsorbé par unité de surface (σ_{surf} mol.m⁻²).

Le seuil de détection du BM par les latex « Orange 100 carboxylate » se situe à partir de 10⁻⁹ mol.m⁻² soit environ 20 molécules de BM par bille. Lorsque le taux de couverture maximal est atteint la constante de vitesse moyenne atteint elle aussi un plateau. La sensibilité des latex est très grande dans la gamme 10⁻⁹-5.10⁻⁷ mol.m⁻². La durée de vie moyenne tend vers une valeur limite (2,5 ns) pour les forts taux de couverture.

Afin d'évaluer quantitativement l'efficacité de transfert E , nous pouvons utiliser la relation décrite précédemment :

$$E = 1 - \frac{\langle \tau_{DA} \rangle}{\langle \tau_D \rangle} \quad (\text{III.13})$$

où $\langle \tau_D \rangle$ fait référence au déclin sans BM, et $\langle \tau_{DA} \rangle$ fait référence au déclin avec BM.

Nous avons représenté sur la figure III.27., l'efficacité E en fonction de la quantité de BM adsorbé :

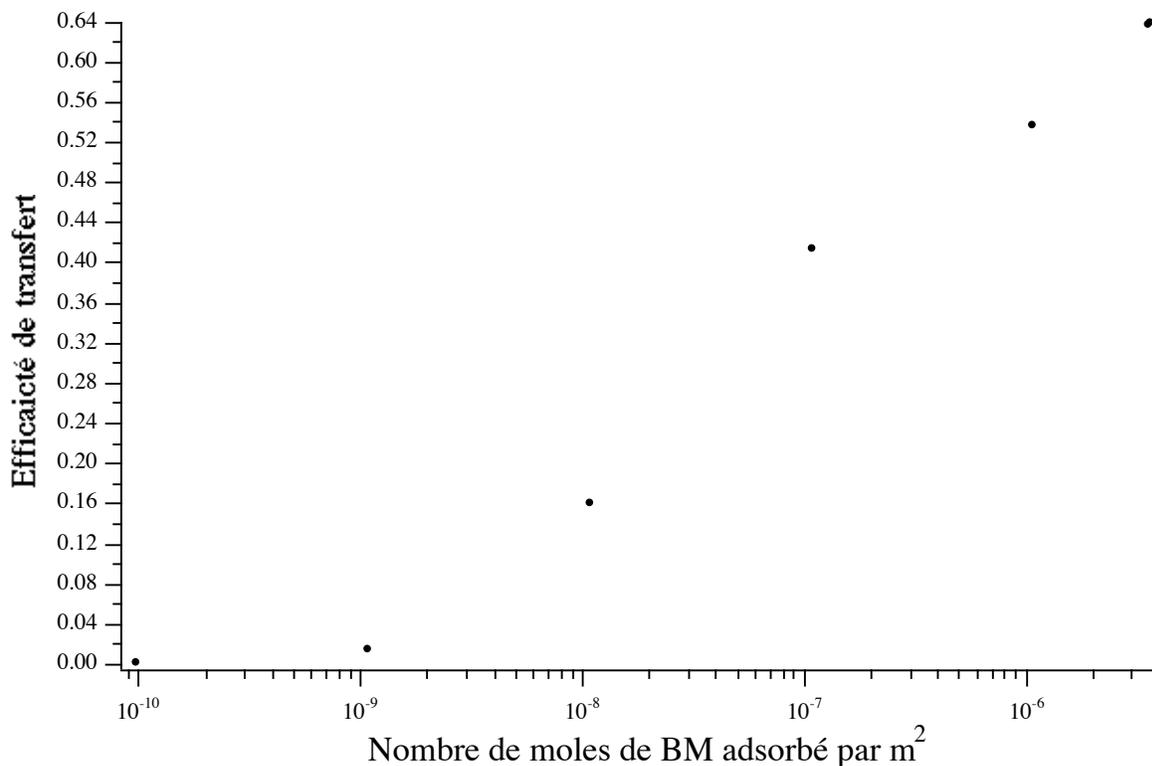


Figure III.27. *Efficacité de transfert d'énergie dans les billes « Orange 100 carboxylate », en fonction de la quantité de BM adsorbé à la surface des billes.*

L'efficacité du transfert est d'autant plus efficace que la quantité de BM adsorbé est grande. Elle atteint néanmoins un palier de 64% environ, pour les taux de couverture proches du seuil de saturation. Le seuil de saturation de l'adsorption du BM sur la surface coïncide avec le seuil de la constante de vitesse moyenne ainsi qu'avec le palier d'efficacité de transfert. Ainsi les sites d'adsorption sont des sites efficaces pour l'extinction. Plus on ajoute de BM adsorbé à la surface, plus on ajoute de voix de désactivations, plus le nombre de « pièges » est grand et plus la probabilité de transfert d'énergie est grande.

Toutefois, le seuil à 64 % n'est pas satisfaisant, pour avoir un bon « capteur » un seuil de 100 % i.e une extinction totale de la fluorescence serait souhaitable.

Il est intéressant de remarquer que les billes « Orange 100 carboxylate » présente une meilleure sensibilité au BM que les billes « Orange 100 sulfate ». De plus, l'efficacité de transfert y est presque trois fois supérieure. Ceci est à mettre en relation avec les observations faites au chapitre II (figure II.24) : la relaxation d'anisotropie de fluorescence est plus rapide avec les billes « Orange 100 carboxylate » qu'avec les « Orange 100 sulfate ». Si la dépolarisation est plus rapide c'est que l'homotransfert est plus efficace. Les billes « carboxylate » ont un meilleur effet d'antenne que les

billes « sulfate ». De telles différences peuvent provenir d'hétérogénéités de répartition des fluorophores dans les billes, peut-être dû au mode de « chargement » des BODIPY ou bien à l'apparition de concentrations localement fortes dans le polystyrène après évaporation des solvants ayant servi à gonfler les billes.

Les billes de 100 nm fonctionnalisées par des groupes carboxylates semblent être de meilleurs candidats comme supports pour des capteurs que les billes fonctionnalisées par des groupes sulfates.

Nous allons maintenant étudier les billes fonctionnalisées par des groupes carboxylates, mais de diamètre plus petit.

III.4.1.3. Billes « Orange 40 carboxylate »

Nous avons travaillé avec une quantité constante de billes de latex ($9 \mu\text{L}$ dans 5 mL d'eau soit $9,9 \cdot 10^{12}$ billes), puis nous avons ajouté du BM sur une gamme de concentrations allant de $1,1 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ à $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Nous présentons, figure III.28., quelques déclin de fluorescence des billes « Orange 40 carboxylate » avec et sans BM. Les déclin sont normalisés afin de mieux visualiser les différences de durées de vie. Nous pouvons observer que les déclin de fluorescence des billes sont d'autant plus rapides que la quantité de BM ajoutée est grande. De manière qualitative, les billes « Orange 40 carboxylate » sont plus sensibles à l'ajout de BM que les autres billes étudiées jusqu'à présent. L'évolution des déclin est en effet plus nette.

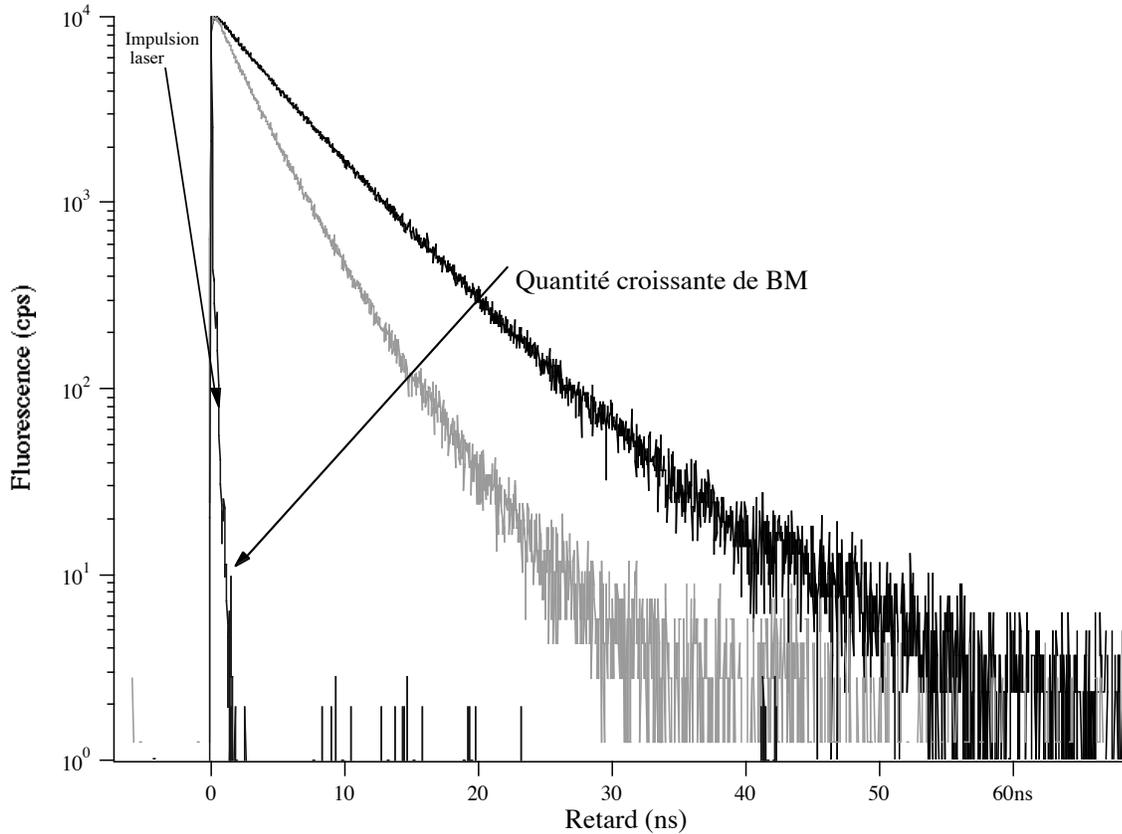


Figure III.28. *Déclins de fluorescence de billes « Orange 40 carboxylate » avec et sans BM - Excitation 497 nm ; Emission 560 nm*
 Trait noir : *Latex seuls* ($9 \mu\text{L} + 5 \text{mL}$ d'eau soit $1,9 \cdot 10^{15}$ billes)
 Pointillés noirs : *Latex et BM* ; $\sigma_{\text{surf}} = 9,3 \cdot 10^{-10} \text{ mol.m}^{-2}$
 Trait gris : *Latex et BM* ; $\sigma_{\text{surf}} = 9,2 \cdot 10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$
 Pointillés noirs : *Latex et BM* ; $\sigma_{\text{surf}} = 3,4 \cdot 10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$
 Pointillés gris : *Latex et BM* ; $\sigma_{\text{surf}} = 9,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$
 Pointillés noirs : *Latex et BM* ; $\sigma_{\text{surf}} = 8,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol.m}^{-2}$

L'extinction de la fluorescence est presque totale pour un taux de couverture de $8,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol.m}^{-2}$ soit 3040 molécules de BM par bille ou encore 60 % de la surface géométrique d'une bille occupés. Ce taux de couverture est très inférieur au taux de couverture maximal que nous avons calculé par extrapolation au § III.2.3.3. ($2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.m}^{-2}$).

Comme pour les billes « Orange 100 carboxylate », les déclin en l'absence de BM sont biexponentiels et l'ajout d'inhibiteur rend le déclin plus complexe encore. Un ajustement biexponentiel ou triexponentiel est satisfaisant. Cependant aucune réalité physique n'est associée aux durées de vie de tels ajustements multiexponentiels. Comme précédemment, nous étudierons (Cf. Figure III.29.) la durée de vie moyenne $\bar{\tau}$ ou plus exactement la constante de vitesse moyenne

$(\bar{k} = \frac{1}{\tau})$ en fonction de la quantité de BM adsorbé par unité de surface σ_{surf} (mol.m^{-2}). L'abscisse a été dilatée selon une échelle logarithmique.

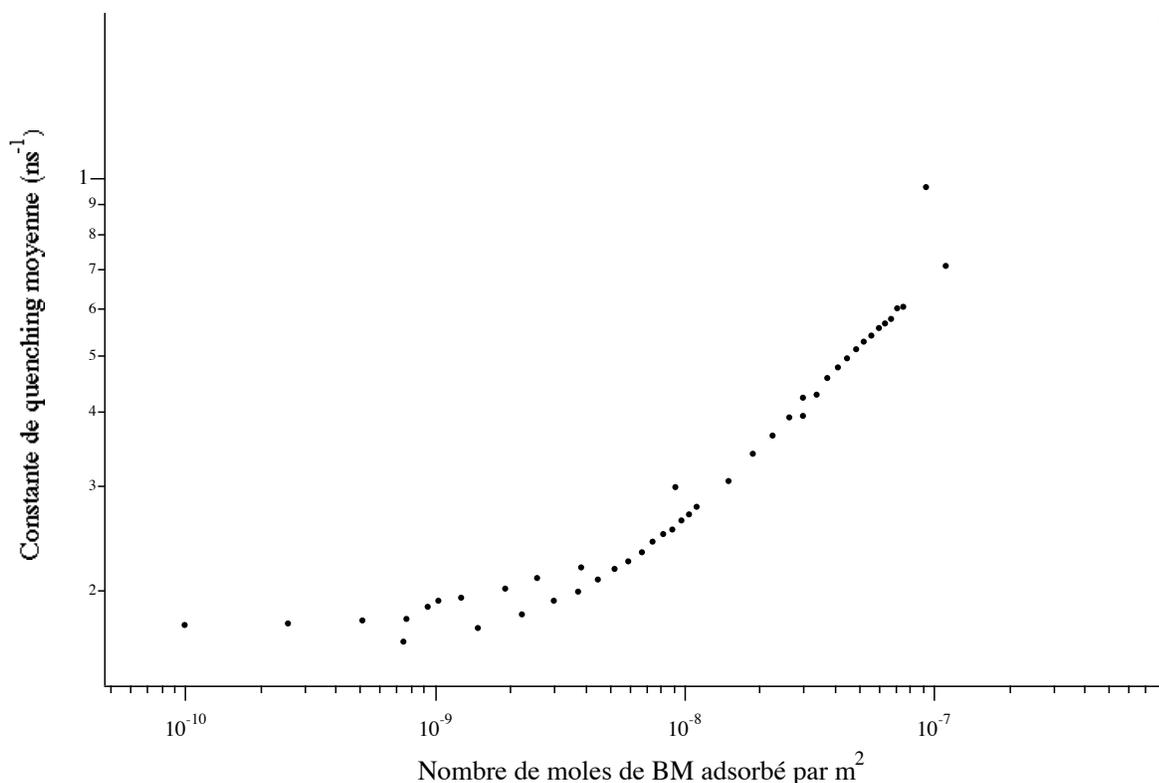


Figure III.29. Constante de vitesse moyenne des déclins de fluorescence des billes « Orange 40 carboxylate » en fonction du nombre de moles de BM adsorbé par m².

Le seuil de détection du BM par les latex « Orange 40 carboxylate » se situe aux alentours de 2.10^{-9} mol.m⁻² (soit 7-10 molécules par bille ou un taux d'occupation de 0,2% de la surface de la bille). Nous avons toujours travaillé à des taux de couverture inférieurs au seuil de saturation calculé au début de ce chapitre ($2,55.10^{-4}$ mol.m⁻²) ; cependant il semblerait que la constante de vitesse atteigne un seuil vers 10^{-6} mol.m⁻² de BM (soit 3700 molécules par billes, ou encore un taux de couverture de 72% de la surface géométrique de la bille). Il se pourrait qu'il existe plusieurs sites d'adsorption dont seulement une partie soit des sites qui permettent l'extinction de la fluorescence des billes par le BM. Ainsi à partir de 10^{-6} mol.m⁻² de BM adsorbé, tous les sites « quenchers » seraient occupés. Il se peut aussi que les hypothèses avancées au § III.2.3.3. pour calculer le seuil de saturation soient trop restrictives et que le plateau de la constante de vitesse corresponde à la saturation des sites occupables.

Nous avons également étudié l'efficacité du transfert d'énergie des billes vers le BM en représentant sur la figure III.30. l'évolution du paramètre E défini précédemment en fonction de la quantité d'inhibiteur adsorbé à la surface.

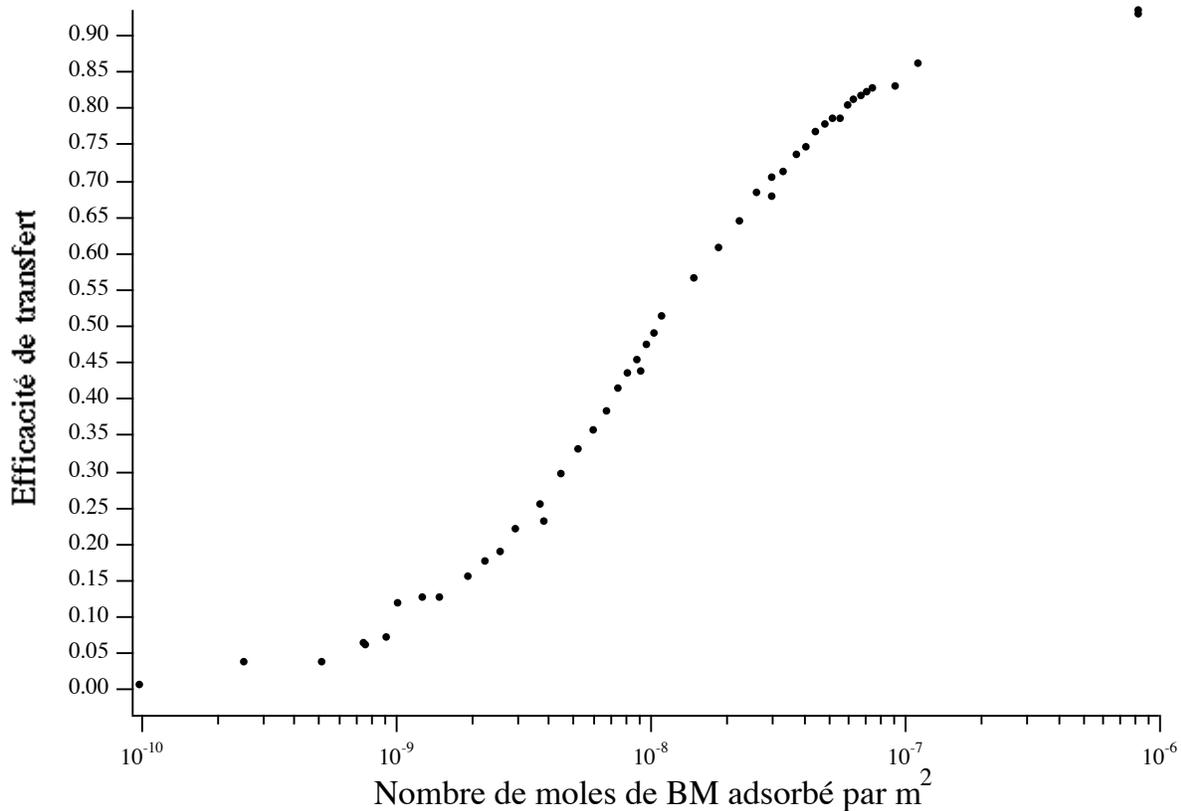


Figure III.30. *Efficacité du transfert d'énergie dans les billes « Orange 40 carboxylate » vers le BM adsorbé en surface.*

L'efficacité du transfert est d'autant plus grande que la quantité de BM adsorbé est importante. Pour des taux de couverture de l'ordre de 10⁻⁶ mol.m⁻², l'efficacité atteint un seuil de l'ordre de 95 %. Ces résultats sont satisfaisants ; tous les fluorophores sont équivalents vis à vis des molécules d'inhibiteur et l'extinction de la fluorescence est quasi totale pour des taux de couverture de l'ordre de 10⁻⁶ mol.m⁻². Ce seuil correspond à celui observé pour la constante de vitesse moyenne.

Comme en spectroscopie d'émission de fluorescence stationnaire, nous avons fait varier la viscosité des solutions de latex, à différentes concentrations de BM (Figure III.31.).

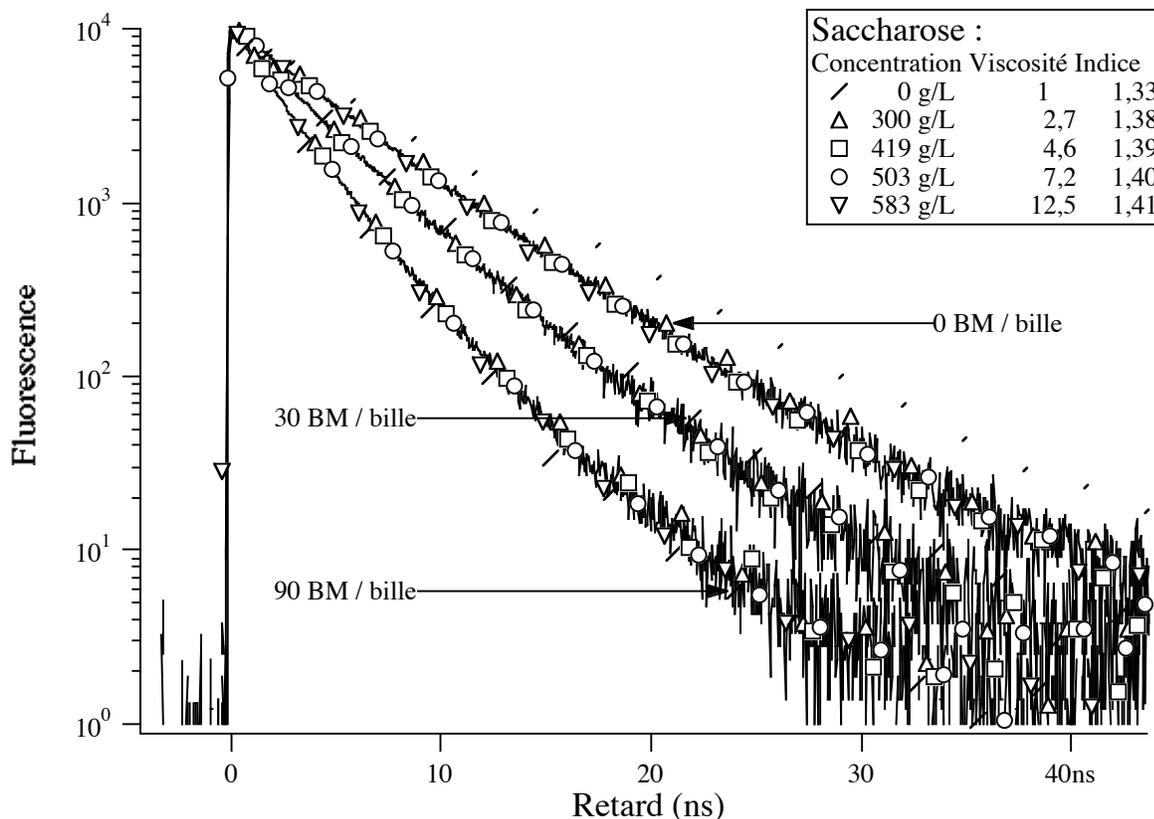


Figure III.31. Effet de la viscosité sur la durée de vie de fluorescence de billes « Orange 40 carboxylate » pour différentes concentrations de BM.

La viscosité n'a aucun effet, ce qui montre que la diffusion du BM vers la bille et/ou la diffusion du BM à la surface de la bille n'a pas lieu pendant le temps caractéristique de la fluorescence.

Les billes « Orange 40 carboxylate » sont jusqu'à présent les meilleurs candidats comme supports-émetteurs :

- la relaxation de l'anisotropie de fluorescence y est la plus rapide ce qui laisse penser que la migration d'énergie est la plus efficace dans les billes (Cf. chapitre II)
- le seuil de détection du BM est le plus bas : 7-10 molécules pour une bille.
- l'extinction de fluorescence par le BM est la plus efficace, nous arrivons à éteindre quasiment le signal des billes avec 3700 molécules par bille, soit un taux de couverture de 72%.

III.4.1.4. Billes « Orange 20 carboxylate »

Nous avons travaillé avec $1,69 \cdot 10^{14}$ billes (13 μL de solution « mère » dans 4 mL d'eau). Nous avons ajouté des concentrations croissantes de BM.

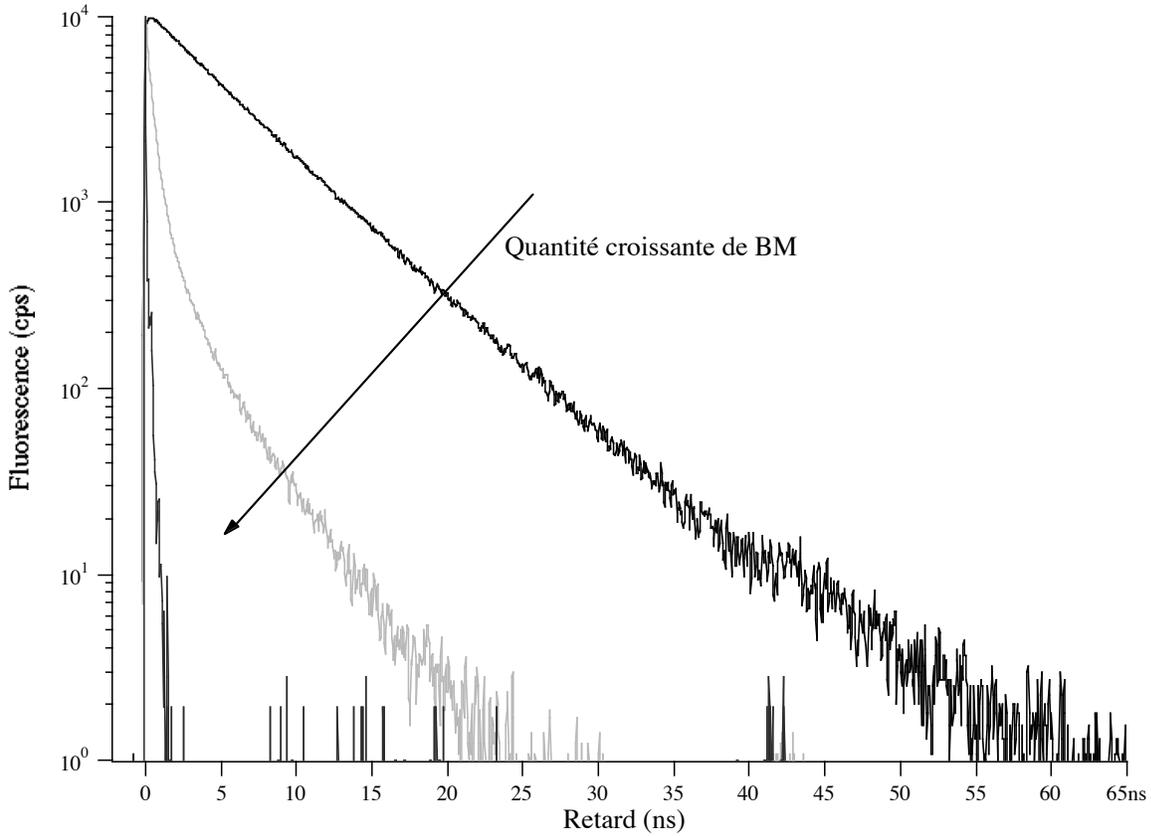


Figure III.32. *Déclins de fluorescence de billes « Orange 20 carboxylate » avec et sans BM - Excitation 497 nm ; Emission 560nm*
 Trait noir : *Latex seuls (13 μ L + 4 mL d'eau soit $1,69 \cdot 10^{14}$ billes)*
 Pointillés gris : *Latex et BM ; $[BM]_0 = 2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{surf} = 10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$*
 Pointillés noirs : *Latex et BM ; $[BM]_0 = 1,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{surf} = 8,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$*
 Trait gris : *Latex et BM ; $[BM]_0 = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{surf} = 9,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$*
 Pointillés noirs : *Latex et BM ; $[BM]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ $\sigma_{surf} = 9,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol.m}^{-2}$*

Une fois de plus nous constatons que le BM induit une extinction de fluorescence des billes « Orange 20 carboxylate ». L'extinction est presque totale. Les déclinés sont multiexponentiels, et nous les traiterons de la même façon que précédemment. Nous présentons sur la figure III.33., l'évolution de la constante de vitesse moyenne ($\bar{k} = \frac{1}{\tau}$) en fonction de la quantité de BM adsorbé σ_{surf} (mol.m^{-2}).

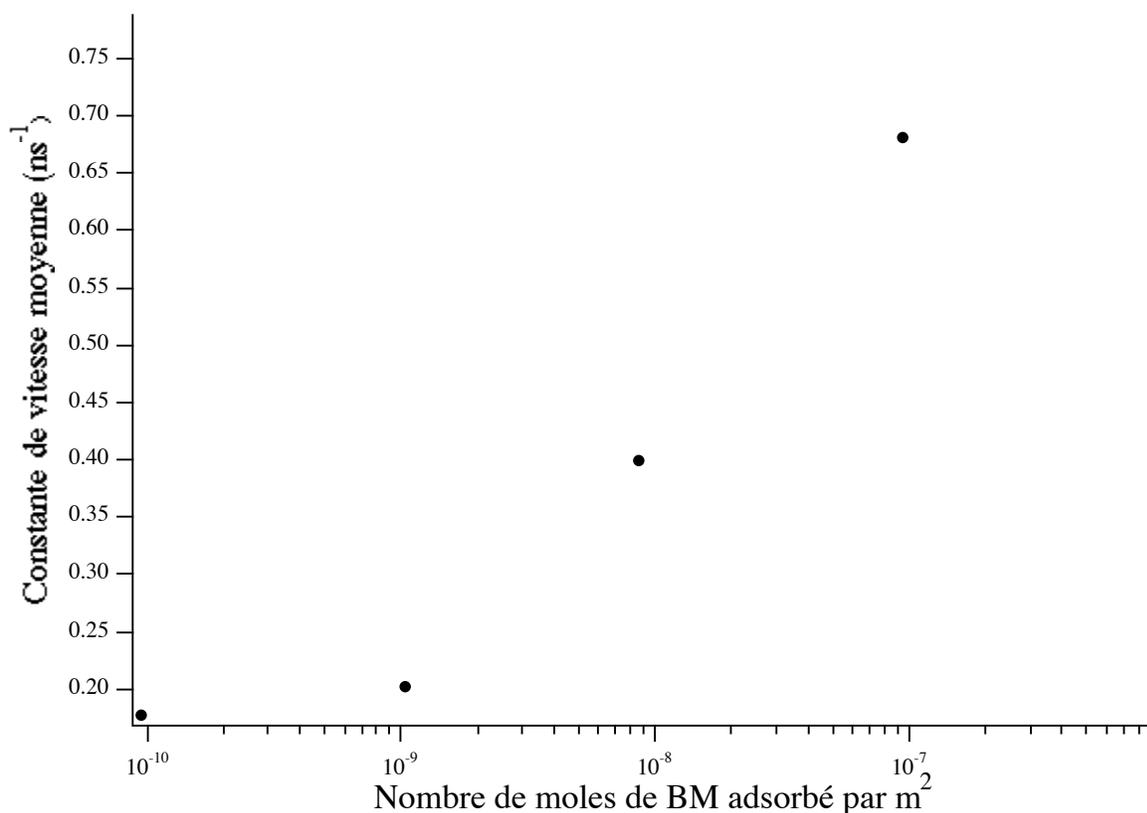


Figure III.33. Constante de vitesse moyenne ($\bar{k} = \frac{1}{\tau}$) des billes « Orange 20 carboxylate » en fonction de la quantité de BM adsorbé par unité de surface σ_{surf} (mol.m⁻²).

Le seuil de détection des latex semble supérieur à 10⁻⁹ mol.m⁻² soit moins d'une molécule par bille ! Nous avons travaillé à des taux de couverture inférieurs au seuil de saturation. La constante de vitesse moyenne est très sensible aux variations de concentration en BM dans le domaine 10⁻⁹ à 10⁻⁷ mol.m⁻². Au delà il semblerait que la sensibilité soit moins élevée, il existe vraisemblablement un seuil de saturation de la constante de vitesse (pour environ 350 molécules par bille, soit 70 % de la surface totale occupée). Nous pouvons là encore envisager l'existence de sites d'adsorption qui permettent l'extinction de fluorescence des billes, alors que d'autres sites d'adsorption ne sont pas des sites « quenchers ». Ainsi pour des taux de couverture de l'ordre de 10⁻⁶ mol.m⁻², les sites d'adsorption-quenchers seraient tous occupés. Il se peut également que le seuil de saturation « extrapolé » précédemment soit surestimé.

Nous présentons à la figure III.34., l'évolution de l'efficacité du transfert d'énergie des billes vers le BM, en fonction de la quantité de quencher adsorbé :

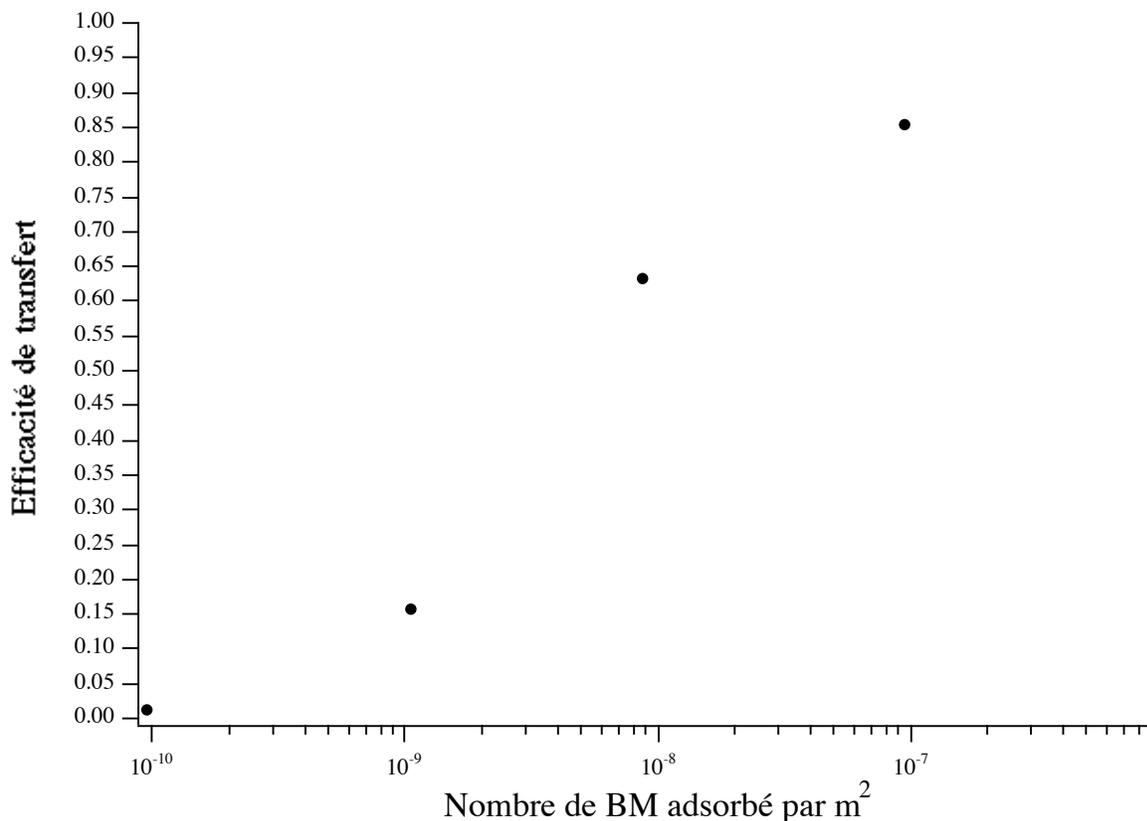


Figure III.34. *Efficacité de transfert d'énergie dans les billes « Orange 20 carboxylate », en fonction de la quantité de BM adsorbé par m².*

L'efficacité de transfert est d'autant plus grande que la quantité de BM adsorbé est grande. Il existe un seuil de saturation (environ 80-85 %) pour des taux de couverture de l'ordre de 10⁶ mol.m⁻² (370-400 molécules par bille, environ 70% de la surface de la bille occupée). Ce seuil est le même que celui observé pour la constante de vitesse moyenne.

L'efficacité de transfert maximale est inférieure à celle observée pour les billes « Orange 40 carboxylate ».

Il est intéressant de comparer ici l'allure des déclins de fluorescence des billes « Orange 40 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate ». En effet, il faut constater qu'il existe une composante lente dans les déclins des latex « Orange 20 carboxylate » qui n'est pas affectée par l'ajout de BM. En revanche, nous n'observons pas de tels effets pour les billes « Orange 40 carboxylate ». Le déclin semble affecté dans son intégralité par l'ajout de BM. Il semblerait donc que l'ensemble des fluorophores des billes de 40 nm soient touchés par l'extinction : tous les fluorophores sont équivalents vis à vis du quencher, ils sont tous éteints pour un taux de couverture de l'ordre 10⁶ mol.m⁻². Dans les billes de 20 nm, il semblerait qu'une partie de la population des fluorophores

(environ 10 %) ne soit pas affectée par l'extinction par le BM. C'est pourquoi nous ne mesurons pas de transfert d'énergie efficace à 100% ni une extinction totale.

Nous avons donc essayé de modéliser l'effet du BM sur les billes de 20 nm de diamètre par un schéma de type « couronne ». Mais un ajustement bi-exponentiel en fixant une des composantes n'est pas satisfaisant. Une analyse systématique des déclinés avec une fonction triexponentielle en fixant une composante ne nous a pas semblé être un modèle physique adéquat. La question de l'ajustement des déclinés reste à ce jour sans réponse.

III.4.2 Bilan et Conclusions

Les billes « Orange 100 sulfate » se distinguent des autres billes : elles présentent, tout d'abord, sans inhibiteur, un déclin de fluorescence monoexponentiel. Lorsque l'on rajoute du BM, les expériences de fluorescence stationnaire et résolue en temps montrent qu'il existe deux populations de fluorophores, nous avons utilisé un modèle de couronne. Le cœur des billes n'est pas affecté par l'extinction de la fluorescence due au BM, cette population conserve la même durée de vie que celle des billes sans quencher (5,2 ns). La moitié des fluorophores serait concentrée au cœur de la bille. L'autre moitié se trouverait dans une couronne de 10-12 nm d'épaisseur, et est sensible au quenching par le BM. Cette épaisseur est supérieure à la distance de Förster entre les fluorophores et le BM. Ceci est une indication de l'existence d'homotransfert dans les billes.

Les autres billes, fonctionnalisées par des groupes carboxylates, ont un comportement biexponentiel en l'absence de quencher, puis l'ajout de BM induit un déclin que l'on peut ajuster par une fonction multiexponentielle. Le modèle de la couronne n'a pas pu être mis en œuvre pour les billes de 100, 40 et 20 nm de diamètre. Cependant, l'allure des déclinés des billes « Orange 20 carboxylate » laisse à penser qu'une composante lente n'est pas affectée par l'adsorption du BM.

Il nous a semblé intéressant de comparer pour chaque bille les mêmes paramètres en fonction de la quantité d'inhibiteur adsorbé. Nous nous sommes donc plus particulièrement attachés à comparer la constante de vitesse moyenne des déclinés, ainsi que l'efficacité du transfert d'énergie. Nous avons

donc reporté sur la figure III.35., $\bar{k} = \frac{1}{\bar{\tau}}$ en fonction de la quantité de BM adsorbé σ_{surf} (mol.m⁻²).

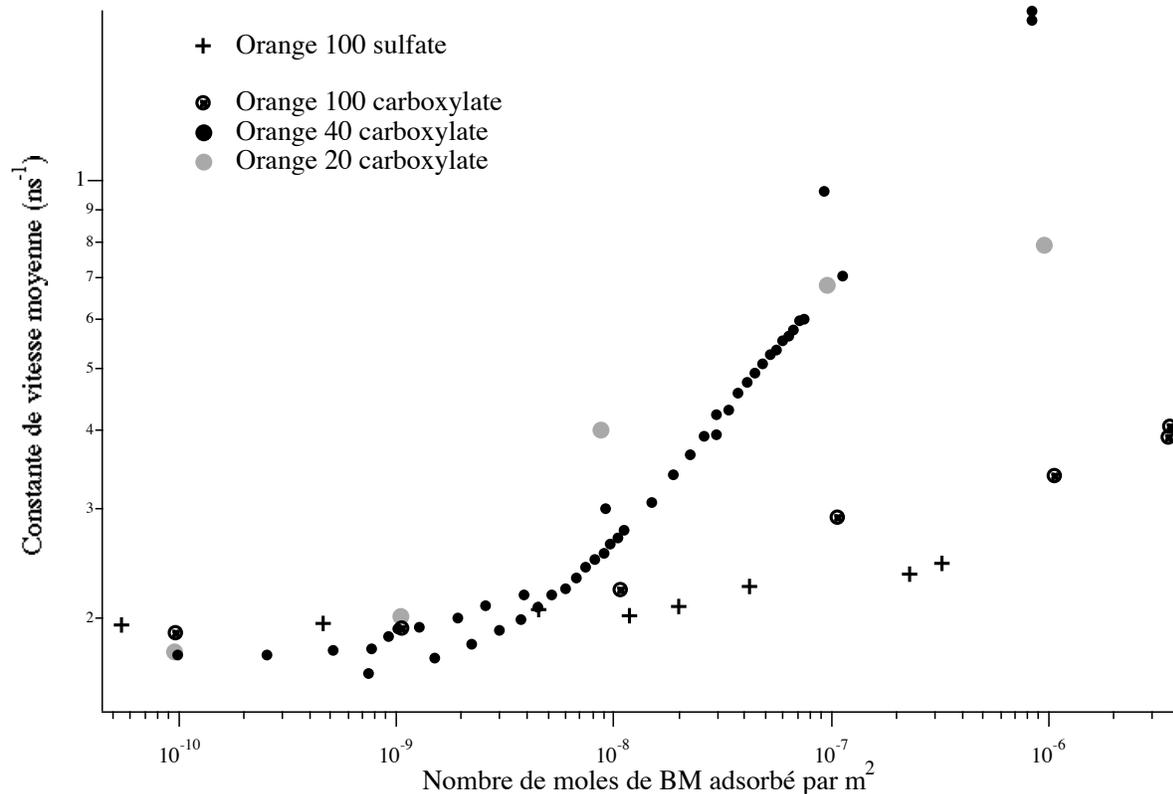


Figure III.35. Comparaison pour les quatre types de billes étudiés, de la constante de vitesse moyenne en fonction de la quantité de BM adsorbé.

Quel que soit le type de billes, le seuil de détection du BM se situe au-delà de $3 \cdot 10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$. Plus la quantité de BM adsorbé augmente, plus la constante de vitesse moyenne augmente, ainsi plus il y a de BM adsorbé, plus le déclin est rapide : ceci est la signature de l'extinction de la fluorescence des billes par le BM.

Il nous faut cependant remarquer qu'il existe des différences, l'effet du BM est beaucoup moins visible sur les billes « Orange 100 sulfate » que sur les « Orange 100 carboxylate ». Les meilleurs résultats sont obtenus pour les billes de plus petit diamètre : 40 et 20 nm. Le contraste obtenu entre deux concentrations de BM est beaucoup plus grand. Pour une quantité de BM adsorbé identique, les billes « Orange 20 carboxylate » semblent plus efficacement quenchées que les billes « Orange 40 carboxylate », et ce dans une gamme allant de $3 \cdot 10^{-9}$ à $10^{-7} \text{ mol.m}^{-2}$. Au delà les billes de 20 nm semblent présenter un seuil de saturation, alors que l'effet de l'extinction par le BM continue d'augmenter pour les billes de 40 nm. Nous avons pu observer pour toutes les billes fonctionnalisées par des groupes carboxylates un seuil de quenching. Ce seuil ne correspond pas au taux de couverture maximum de l'adsorption du BM, sauf pour les billes de 100 nm de diamètre. Nous pouvons donc envisager pour les billes de 20 et 40 nm de diamètre l'existence de sites

d'adsorption qui sont des sites actifs pour l'extinction, alors que d'autres sites d'adsorption sont « inactifs ». Puisque l'on atteint le palier de quenching avant le taux de couverture maximal, il semblerait que les sites dits « actifs » soient occupés les premiers et saturés avant les sites dits « inactifs ». De tels effets n'ont pu être observés pour les billes « Orange 100 carboxylate ».

Intéressons-nous maintenant à l'évolution de l'efficacité de transfert des billes au BM adsorbé en surface (Cf. Figure III.36). Les billes « Orange 100 sulfate » sont les candidats les plus médiocres pour un support-émetteur car le transfert n'y est pas efficace (palier à 25 % environ). Le comportement des billes de 100 nm est sensiblement identique, quel que soit le groupe fonctionnel de surface.

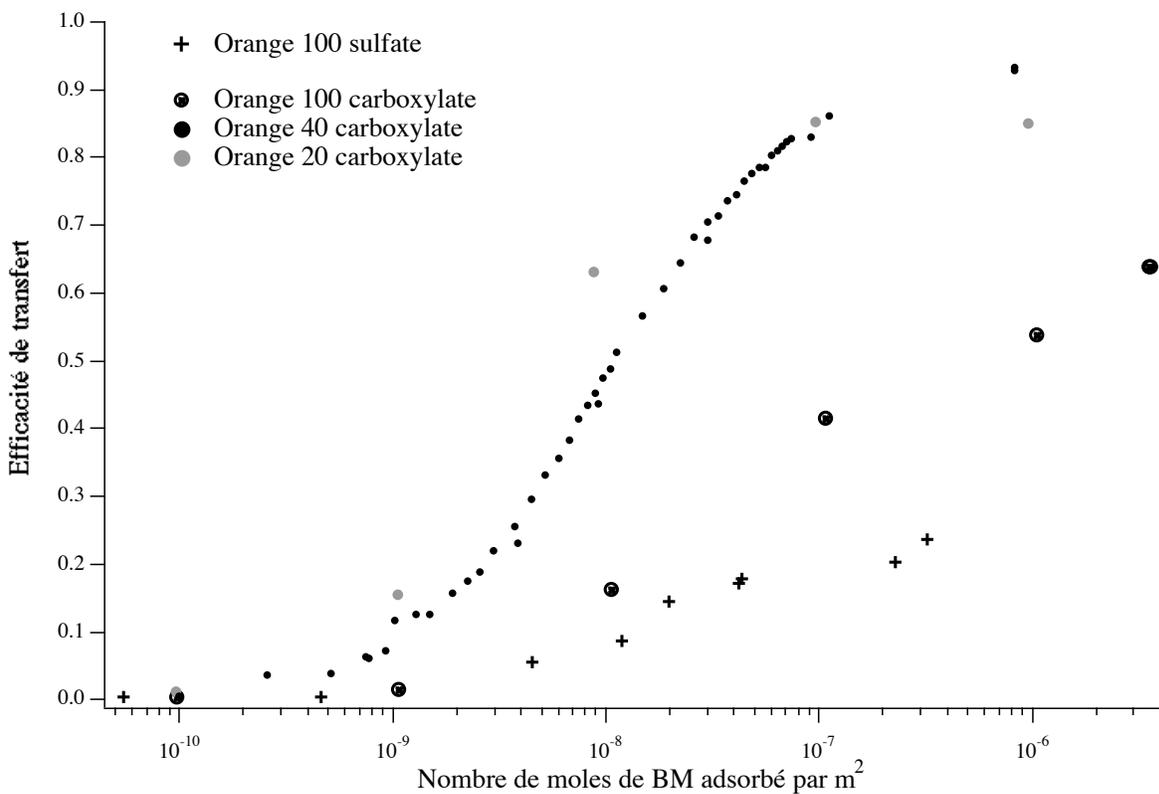


Figure III.36. Comparaison des efficacités de transfert des billes vers le quencher BM, pour les quatre types de billes étudiées.

Si nous voulons construire des systèmes qui mettent à profit un transfert d'énergie efficace, les billes « Orange 40 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate » semblent être les meilleurs supports. Le transfert à la sonde modèle y est de plus de 80%. Le comportement des billes de 20 et 40 nm est sensiblement identique, une différence majeure est qu'une partie des fluorophores ne semble pas affectée par le quenching par le BM dans les billes « Orange 20 carboxylate » alors que tous les

fluorophores sont équivalents pour le BM dans les latex « Orange 40 carboxylate », ils sont tous éteints.

C'est pourquoi dans les études suivantes, études d'autres sondes, nous nous sommes concentrés sur les billes « Orange 40 carboxylate ».

Conclusions :

Le BM ne diffuse pas dans le temps caractéristique du quenching. Si nous considérons comme système l'ensemble du capteur (bille-sonde) le processus d'extinction est analogue à un quenching statique. Si maintenant nous nous « plaçons du point de vue du photon », l'énergie migre parmi les chromophores jusqu'au BM. Et le processus est alors analogue à un quenching dynamique. De fait la durée de vie de fluorescence varie avec la concentration de quencher.

En émission de fluorescence stationnaire les systèmes supports-BM présentent une diminution de l'intensité de fluorescence avec l'augmentation de BM adsorbé. Les capteurs se caractérisent par une durée de vie qui dépend de la quantité de BM adsorbé. Cela en fait des capteurs ratiométriques.

III.5. Essai de décoloration du BM : effet sur les propriétés de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate »

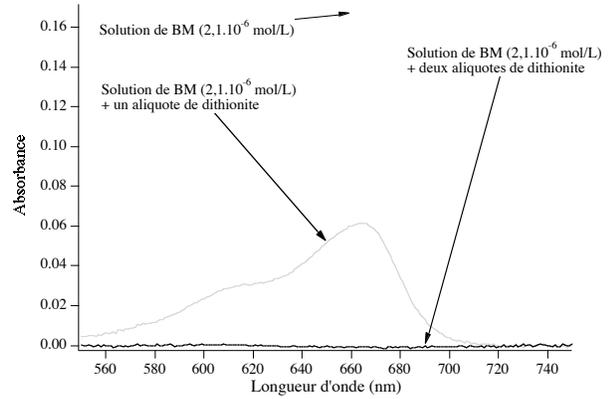
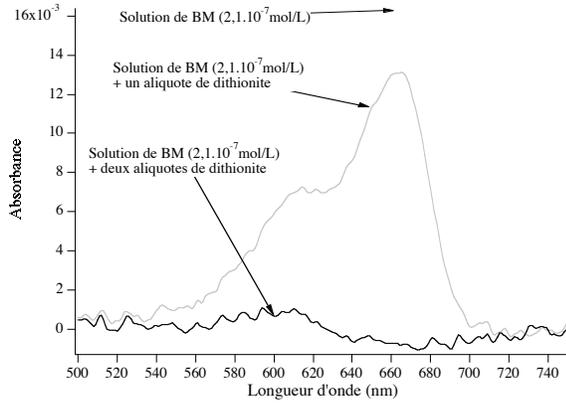
Nous souhaitons élaborer des capteurs à base de billes de latex, nous avons jusqu'à présent étudié l'adsorption et l'extinction de fluorescence par le BM. Or ce colorant possède des propriétés oxydo-réductrices. Sa forme bleue est en effet une forme oxydée, elle peut être réduite en forme incolore dite leuco. Ainsi en réduisant le BM adsorbé à la surface des latex, nous pouvons espérer une augmentation du signal de fluorescence. Si tel est le cas, nous avons un capteur de potentiel d'oxydoréduction.

Nous nous sommes concentrés sur les billes « Orange 40 carboxylate ». Nous avons tout d'abord caractérisé l'extinction de fluorescence en présence de BM, sans réducteur. Puis pour les deux concentrations de BM étudiées, nous avons ajouté des quantités croissantes de dithionite (aliquote de 0,5 mg).

Nous présenterons ici les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence. Puis nous étudierons la fluorescence résolue en temps.

III.5.1 Spectroscopie d'absorption : décoloration du Bleu de Méthylène.

Nous avons étudié deux solutions de BM : une de concentration $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et une à $2,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Afin de réduire le BM nous avons ajouté du dithionite solide (un aliquote = 0,5 mg). Nous présentons, figure III.37., les spectres d'absorption du BM en absence et en présence de dithionite.

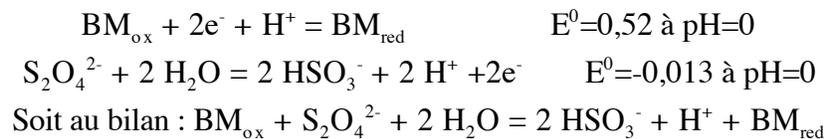


Figures III.37. Spectres d'absorption de solutions de BM en absence et en présence de dithionite

L'aliquote est de 0,5 mg de dithionite. Aussi le réducteur est-il introduit en grand excès.

Le dithionite décolore le BM. Plus la quantité de dithionite ajoutée est grande, plus la décoloration est importante. Cet effet est sans doute dû plus à un effet cinétique qu'à celui de l'ajout de dithionite : la réaction d'oxydoréduction est thermodynamiquement possible mais lente cinétiquement.

Le dithionite est sous forme $S_2O_4^{2-}$ dans l'eau : le pK_a du couple $HS_2O_4^- / S_2O_4^{2-}$ est de 2,5 dans l'eau à 25°C. Le pH des échantillons est d'environ 6,5. Le dithionite intervient dans deux couples oxydo-réducteurs S(III)/S(IV): $HSO_3^- / S_2O_4^{2-}$ et $SO_3^{2-} / S_2O_4^{2-}$, or le couple HSO_3^- / SO_3^{2-} a un pK_a de 7,26. Etant donné que nous travaillons à des pH plus proches de 6 que de 7, nous considérons que l'espèce majoritaire est l'ion sulfite acide (HSO_3^-). Soit BM_{ox} la forme oxydée du BM et BM_{red} la forme réduite, les demi-équations redox qui interviennent alors dans notre système sont les suivantes :



Nous avons vérifié que l'ajout de dithionite ne modifie le spectre d'absorption. Les solutions de latex en présence d'un large excès de dithionite ne sont pas stables, une agrégation des billes peut être observée au-delà de quelques dizaines de minutes.

Nous allons étudier les effets de la décoloration du BM sur les propriétés de fluorescence des latex.

III.5.2. Spectroscopie d'émission de fluorescence stationnaire.

Nous avons tout d'abord vérifié que l'ajout de dithionite ne modifie pas le spectre d'émission de fluorescence des billes. Puis nous avons étudié les échantillons suivants :

9 μL de billes soit $9,9 \cdot 10^{12}$ billes, puis nous avons ajouté du BM de façon à avoir une concentration de $2,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ et $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Puis nous avons ajouté du dithionite solide (aliquote de 0,5 mg). Nous présentons à la Figure III.38, les spectres d'émission de fluorescence de billes de latex « Orange 40 carboxylate » seules, mises en présence de BM avec ou sans dithionite.

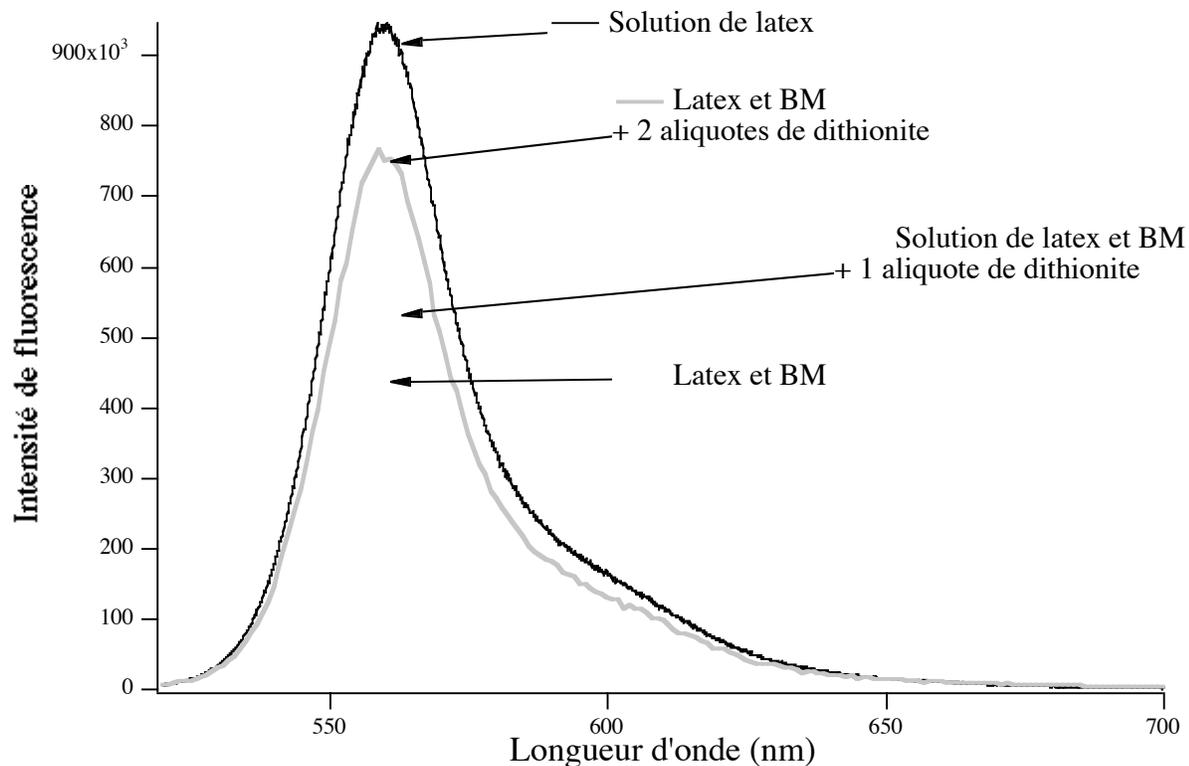


Figure III.38. Spectres d'émission de fluorescence des billes « Orange 40 carboxylate » - Excitation 497 nm - Effet de l'ajout de BM, puis de l'ajout de dithionite.

Comme nous l'avons vu précédemment, le BM induit une extinction de la fluorescence des billes. L'ajout de réducteur se corrèle avec une augmentation de l'intensité de fluorescence, lié à la décoloration mise en évidence par spectroscopie d'absorption au paragraphe précédent. Nous pouvons donc en déduire que le BM adsorbé en présence de dithionite se réduit, donc se décolore rendant le transfert d'énergie des billes vers le BM impossible, d'où une diminution de l'effet d'extinction.

Nous avons représenté sur la Figure III.39. le tracé de Stern-Volmer en considérant que le BM adsorbé est sous forme oxydée comme réduite. Nous avons fait l'hypothèse que le BM réduit reste adsorbé de par sa nature hydrophobe.

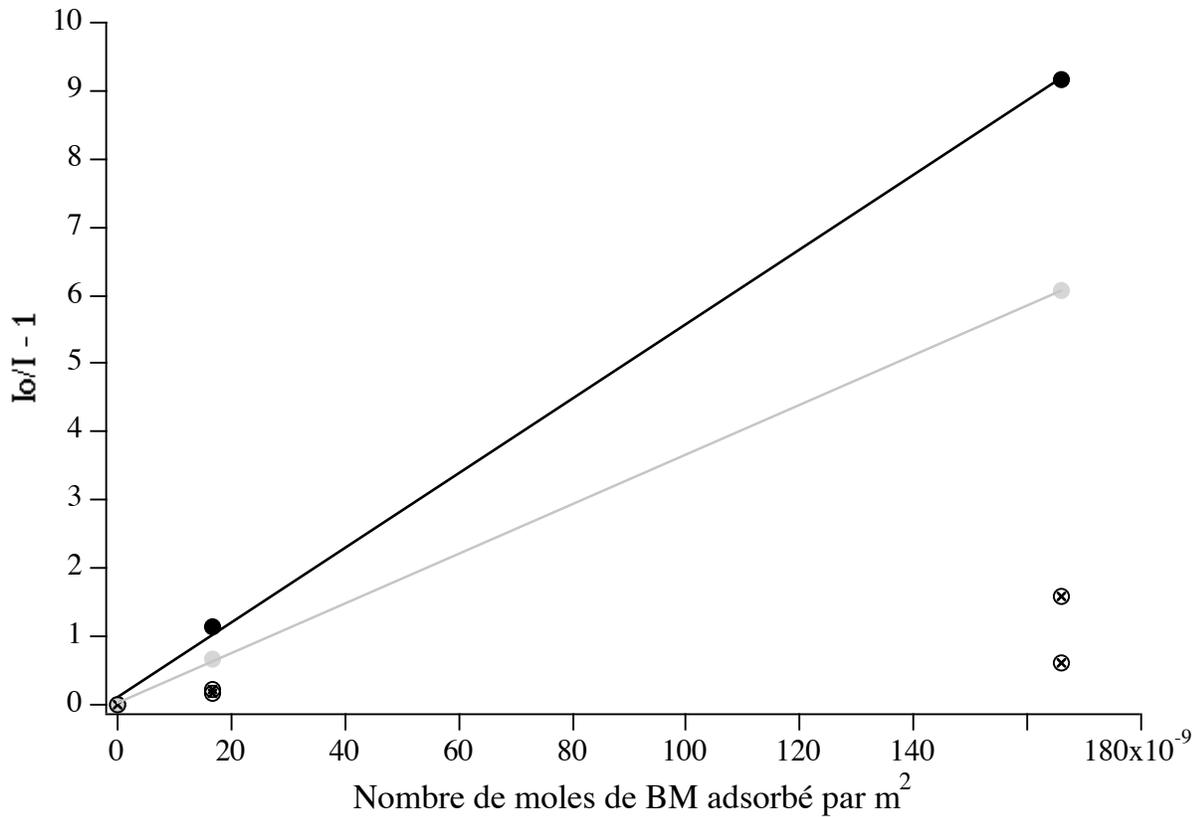


Figure III.39. *Tracé de Stern-Volmer, effet de la décoloration du BM.*

Ronds noirs : *Solution de latex et BM*

Ronds gris : *Solution de latex et BM, ajout d'un aliquote de dithionite(0,5 mg)*

Ronds hachurés : *Solution de latex et BM, ajout de deux aliquotes de dithionite (1 mg).*

Nous pouvons ajuster les données expérimentales par des droites.

Nous obtenons les constantes de Stern-Volmer suivantes en fonction de la quantité de dithionite.

Quantité de dithionite (moles)	0	$2,9 \cdot 10^{-6}$	$5,8 \cdot 10^{-6}$
K_{SV} ($m^2 \cdot mol^{-1}$)	$6 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^6$

Tableau III.5. *Ajustement linéaire des tracés de Stern-Volmer, effet de l'ajout du BM et du dithionite sur l'extinction de fluorescence des billes « Orange 40 carboxylate ».*

Il est intéressant de remarquer que plus la quantité de dithionite est grande, i.e plus la réduction du BM est importante, plus la constante de Stern-Volmer devient petite.

III.5.3. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps.

L'ajout de dithionite à une suspension aqueuse de latex ne modifie pas le déclin de fluorescence. Nous présentons à la Figure III.40. quelques déclins de fluorescence :

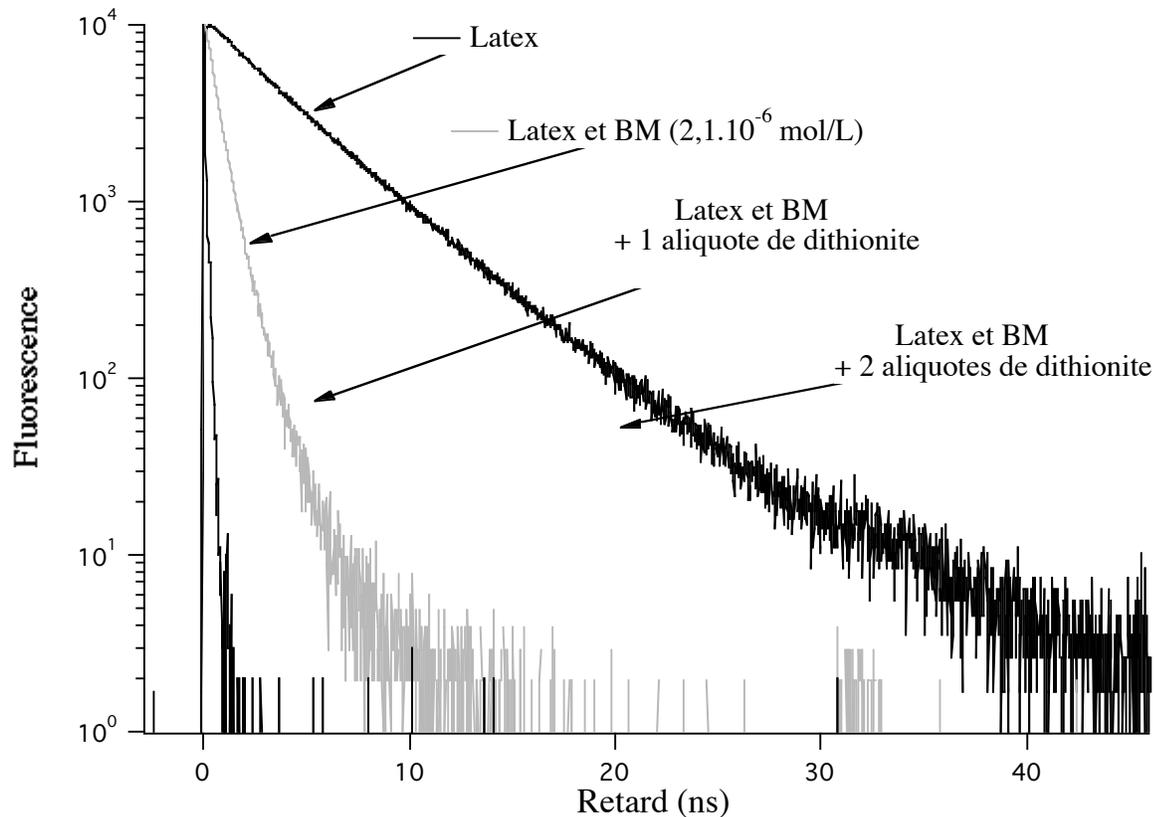


Figure III.40 Déclins de fluorescence des billes « Orange 40 carboxylate » en présence de BM, effet de l'ajout d'agent réducteur du BM - Excitation 497 nm ; Emission : 560 nm

L'ajout de BM induit un quenching de la fluorescence des billes. La réduction du colorant induit une diminution du quenching, et donc un déclin de fluorescence plus lent. Plus la quantité de colorant réduite est grande, plus le déclin devient lent, et se rapproche de l'allure du déclin des billes sans quencher.

III.5.4 Conclusions

Nous avons montré ici que les billes de latex Orange 40 carboxylate permettent de discriminer le BM dans sa forme oxydée et dans sa forme réduite. Nous avons donc un système bille-BM sensible au potentiel d'oxydoréduction. Cependant rien ne distingue une variation de l'adsorption du BM sur les billes d'une variation du taux de réduction du colorant.

III.6 Conclusion Générale

Nous avons dans ce chapitre montré que la mise en oeuvre d'un système capteur où la fonction de signalisation est séparée de la fonction de détection est possible. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux interactions d'une sonde « modèle » le Bleu de Méthylène (BM) avec des latex « Orange Fluospheres[®] » de tailles différentes et de groupes de surface différents.

Nous avons tout d'abord caractérisé l'adsorption de la sonde sur les billes de 100 nm de diamètre : un modèle de Langmuir décrit bien le phénomène. L'affinité du BM pour les billes « carboxylate » ou « sulfate » est élevée. Des interactions aussi bien électrostatiques qu'hydrophobes sont certainement mises en jeu. Face à des difficultés expérimentales, les isothermes d'adsorption du BM sur les billes de plus petite taille ont été extrapolées à partir des résultats précédents. Pour une meilleure compréhension et caractérisation des phénomènes d'adsorption sur les billes de 20 et 40 nm il nous faudra dans le futur utiliser les techniques d'ultracentrifugation.

Après avoir montré que la sonde BM s'adsorbe sur le support, nous nous sommes attachés à étudier les effets du BM sur les propriétés de luminescence des billes. Les expériences d'émission de fluorescence stationnaire comme celles de fluorescence résolue en temps ont montré que le BM inhibe la fluorescence des billes selon un transfert d'énergie des fluorophores vers le BM adsorbé. L'extinction de fluorescence est d'autant plus grande que la quantité de BM est élevée. Les billes « sulfate » se distinguent des billes « carboxylate » par l'existence de deux populations de fluorophores : une accessible au quenching par le BM, et une inaccessible. Les supports les plus sensibles *i.e* qui présentent la meilleure efficacité de transfert ainsi que le seuil de détection le plus bas sont les billes de plus petits diamètres « Orange 40 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate ». Les billes de 40 nm nous semblent plus intéressantes dans la mesure où leur densité surfacique de charge est plus grande et que l'extinction de la fluorescence peut être presque totale (95 %).

Enfin les billes « Orange 40 carboxylate » sont sensibles à l'état d'oxydation du BM, il est possible de distinguer le BM oxydé du BM réduit. Nous pouvons donc envisager d'utiliser ce système pour des mesures locales de potentiel d'oxydo-réduction.



IV. Etude de billes de 100 nm immobilisées dans des films de poly(vinyl alcool).

Introduction :

Nous souhaitons développer un système bille-sonde pour mesurer des concentrations locales d'ions ou de molécules. Pour faire de ces billes des nano-capteurs, il est indispensable d'étudier les caractéristiques non plus d'un ensemble de billes, mais de billes uniques, isolées. En effet, les

expériences en cuve nous ont donné des informations moyennées sur un grand nombre de particules. Cela ne permet pas de comprendre complètement les interactions entre les fluorophores et la sonde.

Des études de spectroscopie de fluorescence de billes uniques ont déjà été conduites grâce aux progrès récents de l'optique à champ proche et de la microscopie. En effet, la technique du SNOM (Scanning Near-field Optical Microscope) a été appliquée par l'équipe du Professeur Masuhara et celle du Professeur De Schryver pour l'étude de billes de polymère fluorescentes immobilisées dans des films de poly(vinyl alcool) ou PVA^{120,141}. Nous allons utiliser ici cette technique d'immobilisation des billes dans des films de PVA, pour une étude par microscopie confocale rendue possible grâce à une collaboration avec l'équipe du Professeur H. Masuhara.

Dans un premier temps nous allons étudier l'effet de l'ajout de PVA en solution aqueuse. Puis nous présenterons les analyses des déclin de fluorescence des billes avec ou sans quencher (Bleu de Méthylène) dans les films de PVA.

IV.1. Latex « Orange 100 sulfate »

Préambule :

Nous avons étudié trois types de films : le premier avec uniquement des billes « Orange 100 sulfate », le second et le troisième avec des concentrations croissantes de BM (Cf. Partie Expérimentale). Nous résumons dans le tableau suivant les caractéristiques des solutions à partir desquelles nous avons réalisé les films :

	A	B	C
Solution de PVA (% en poids par rapport à l'eau)	1 %	1 %	1 %
Concentration en billes / L	$9,9.10^{12}$	$9,9.10^{12}$	$9,9.10^{12}$
Concentration en BM (mol/L)	0	$6,06.10^{-6}$	$6,06.10^{-5}$

Tableau IV.1. *Caractéristiques des solutions utilisées pour élaborer les films.*

IV.1.1. Comparaison des propriétés spectroscopiques des billes dans l'eau et dans des solutions de PVA

IV.1.1.1. Spectroscopies d'absorption et d'émission de fluorescence stationnaire

Nous avons étudié des solutions de latex dans le PVA avant de les déposer sous forme de films. Les spectres d'absorption du BM dans l'eau et ceux dans une solution aqueuse de PVA sont identiques. Il en va de même pour les spectres d'absorption des billes. Nous présentons à la Figure IV.1. les spectres d'émission de fluorescence de billes « Orange 100 sulfate », avec et sans BM, dans l'eau et dans une solution aqueuse de PVA. Les spectres dans l'eau nous servent de référence.

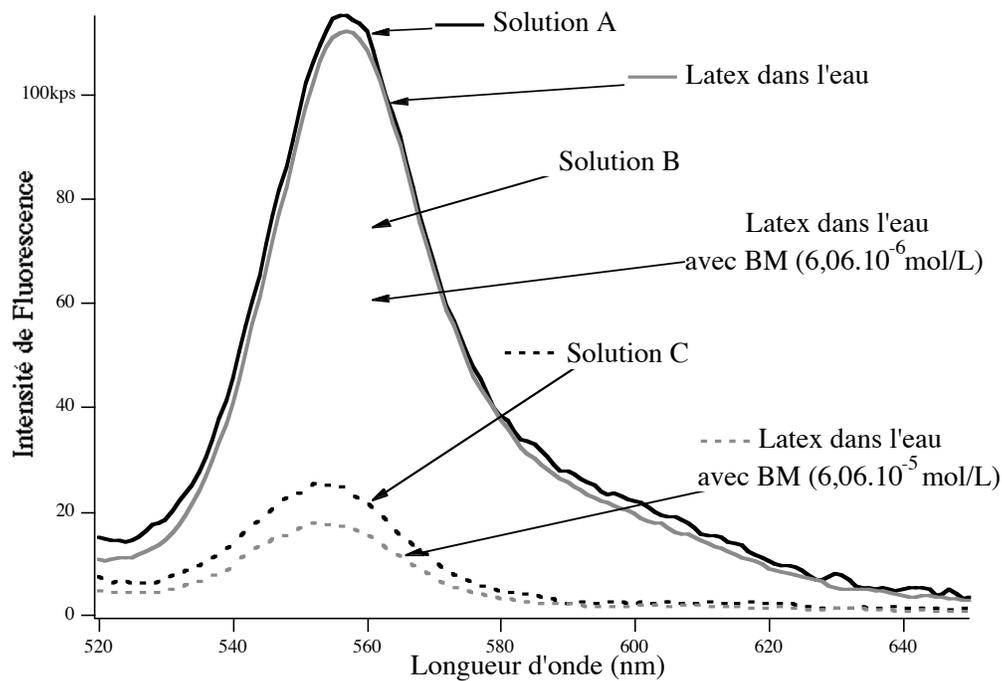


Figure IV.1. *Spectres de fluorescence stationnaire ($Exc^\circ : 497 \text{ nm}$)*
 Traits pleins : solutions de latex ($9,9.10^{12} \text{ billes.L}^{-1}$) sans BM, dans l'eau, dans une solution aqueuse de PVA (A).
 Pointillés : solutions de latex ($9,9.10^{12} \text{ billes.L}^{-1}$) avec BM ($6,06.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), dans l'eau, et dans une solution aqueuse de PVA (B).
 Tirets : solutions de latex ($9,9.10^{12} \text{ billes.L}^{-1}$) avec BM ($6,06.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), dans l'eau, dans une solution aqueuse de PVA (C).

La forme et la position de la bande de fluorescence des billes ne sont pas affectées par la présence de PVA. Cependant nous observons qu'en présence de PVA, l'extinction de la fluorescence des billes par le BM est moins efficace. Nous présentons dans la tableau V.2. les résultats d'un calcul de Stern-Volmer en fonction de la concentration totale de BM :

	A [BM]=0 mol.L ⁻¹	B [BM]=6,06.10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹	C [BM]=6,06.10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹
I ₀ /I dans l'eau	1	1,75	6,3
I ₀ /I dans eau-PVA(%)	1	1,5	4,4

Tableau IV.2. *Calculs de Stern-Volmer I₀/I - Comparaison de l'extinction de fluorescence par le BM dans l'eau et dans une solution de PVA.*

Nous remarquons que l'extinction de fluorescence est moindre en présence de PVA.

IV.1.1.2. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps

Les solutions précédentes ont été étudiées avec le montage décrit dans l'annexe B. La longueur d'onde d'excitation est de 497 nm, et celle de détection de 560 nm. Nous présentons à la Figure IV.2. quelques déclin de fluorescence.

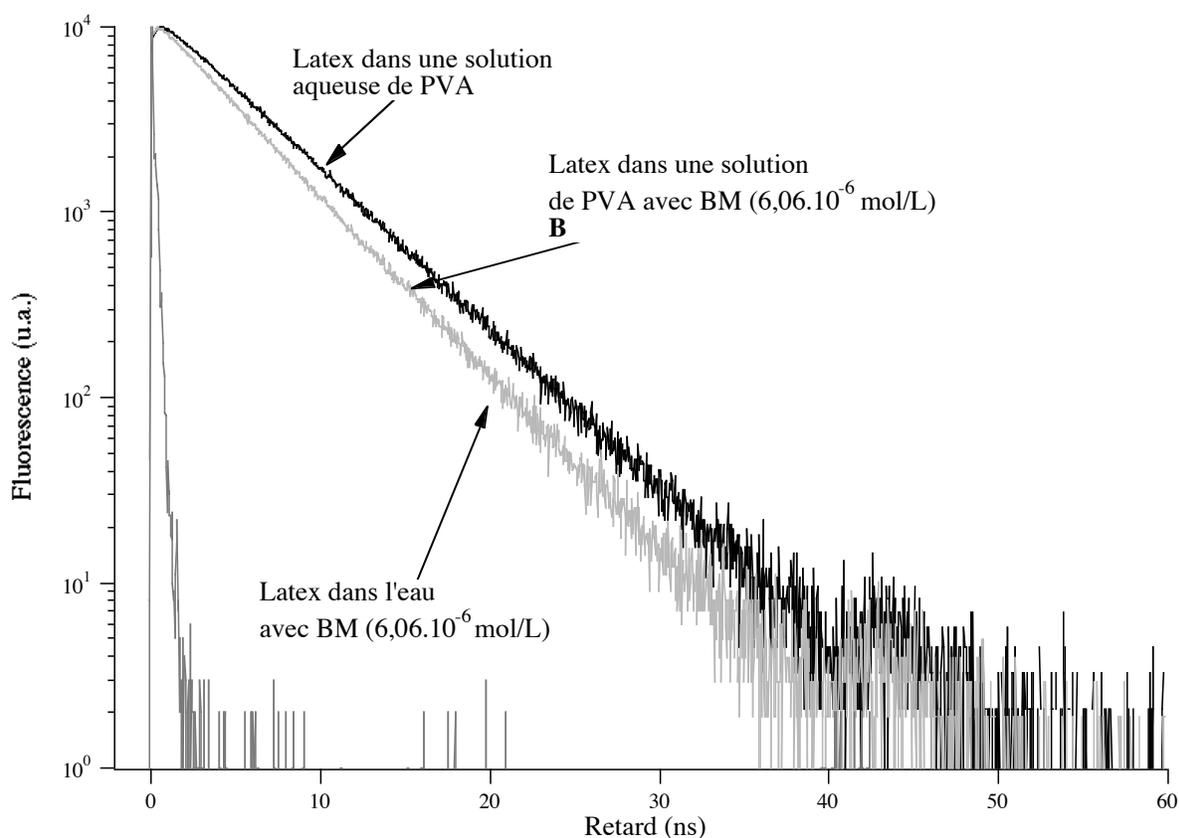


Figure IV.2. *Comparaison des déclin de fluorescence des latex avec BM (6,06.10⁻⁶ mol/L) dans l'eau, et dans une solution de PVA à 1 % en poids. Les déclin sont normalisés au maximum. Excitation : 497 nm - Emission : 560 nm.*

Les déclin de fluorescence des billes dans l'eau et dans une solution de PVA sont identiques. Ils sont ajustables par une fonction mono-exponentielle (durée de vie 5,2 ns). Lorsque l'on ajoute le BM, des différences apparaissent. Ainsi les expériences de fluorescence résolue en temps confirment les observations faites lors des expériences de fluorescence stationnaire. En présence de BM, le déclin en présence d'inhibiteur est plus rapide dans l'eau que dans le PVA. Ceci peut être relié à l'adsorption de PVA à la surface des billes. Le PVA est en effet un agent dispersant¹⁴². Il est utilisé pour mettre en suspension des particules colloïdales d'or ou de dioxyde de titane. Garvey et coll. ont montré aussi que le PVA s'adsorbe sur une surface de polystyrène^{143,144}.

Le PVA s'adsorbant sur les billes, il peut empêcher l'adsorption du BM à la surface des billes. La quantité de quencher à la surface des billes est donc moindre dans le PVA que dans l'eau, ce qui explique que l'intensité de fluorescence soit plus grande et le déclin de fluorescence plus lent dans une solution de PVA que dans l'eau.

En tenant compte du modèle de la « couronne » que nous avons proposé précédemment, nous présentons le rapport entre la durée de vie des latex sans BM (τ_0) et celle affectée par le quencher (τ) en fonction de la concentration totale en BM.

	A [BM]=0 mol.L ⁻¹	B [BM]=6,06.10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹	C [BM]=6,06.10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹
τ_0 / τ dans l'eau	1	1,47	1,56
τ_0 / τ dans eau-PVA(1%)	1	1,18	1,28

Tableau IV.3. *Comparaison de l'extinction de la fluorescence par le BM dans l'eau et dans une solution de PVA*

Si le PVA modifie l'équilibre d'association du BM avec la surface des billes, il n'empêche pas totalement l'adsorption de l'inhibiteur. Nous voyons toujours un effet net d'extinction de la fluorescence des billes par le BM.

Après avoir étudié les propriétés spectroscopiques des solutions de PVA et de latex, nous allons nous intéresser aux propriétés de billes uniques immobilisées dans des films de PVA.

IV.1.2. *Etude des billes immobilisées dans des films*

Les films de PVA et billes sont réalisés à partir des solutions étudiées précédemment. Ils sont déposés à la tournette sur des lamelles de microscope (Cf. Partie Expérimentale).

IV.1.2.1 Etude de la dispersion des billes dans les films

Avant de poursuivre plus loin l'étude, il nous faut connaître la répartition des billes dans les films. En effet, nous cherchons à étudier des billes uniques et il est nécessaire de vérifier l'absence d'agrégats.

Nous avons observé un film par microscopie à fond noir (Annexe D). La figure IV.3. donne une image typique avec un objectif de grossissement *50 : les billes forment peu d'agrégats, elles sont relativement bien dispersées.

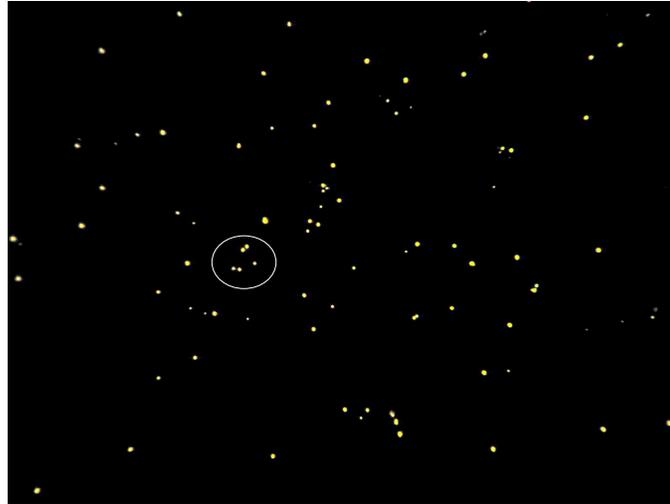


Figure IV.3. Image ($50 * 70 \mu\text{m}$) d'un film par microscopie optique à fond noir, objectif de grossissement *50. Billes de latex « Orange 100 sulfate ». Le cercle blanc indique la zone agrandie à la figure V.4.

Avec l'objectif de grossissement *100 la résolution est meilleure, les billes semblent homogènes en taille (Figure IV.4.).

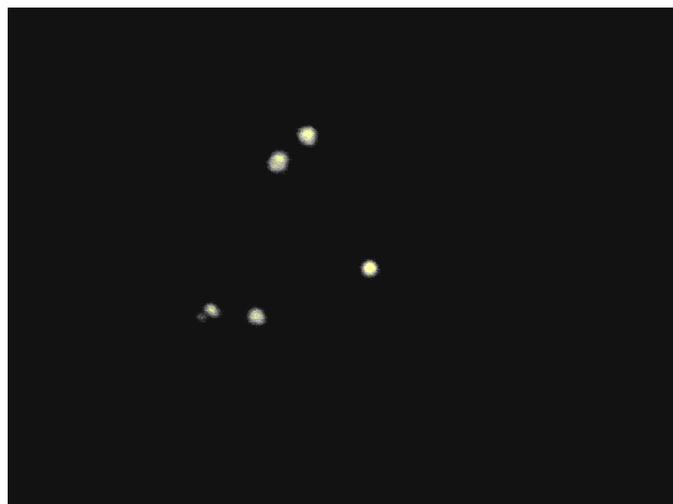


Figure IV.4. *Image (7 *10 μm) par microscopie à fond noir, objectif de grossissement 100. Billes de latex « Orange 100 sulfate »*

Certaines paraissent plus « grosses » que d'autres. Il est possible que cet effet provienne d'un enfouissement variable des billes.

La topographie de la surface des films a été étudiée plus précisément par microscope à force atomique (Annexe D).

Figure IV.5. *Images de la topographie de la surface des films de latex dans le PVA. L'image 1 (50 μm * 50 μm) est détaillée par des agrandissements successifs. L'image 2 (23 * 23 μm) est un grandissement de l'image 1. L'image 3 (10 * 10 μm) est un agrandissement de 2, et enfin 4 (5 * 5 μm) est un zoom de 3.*

Les images (Figure IV.5.) montrent que les billes sont relativement bien dispersées. On peut trouver cependant quelques agrégats (Images N° 2 et N° 5). Ces images montrent aussi que les billes sont séparées par plus de 1 μm (Images N°2, 3, 4). Une vue en coupe de l'image permet de dire que le diamètre apparent des objets observés est supérieur à 200 nm, ce qui signifie que les latex sont recouverts de PVA. L'épaisseur de la couche de PVA a été évaluée à 50 nm environ.

Figure IV.6. *L'image 5 (2,6 * 2,6 μm) est un agrandissement de l'image 1.*

L'image N°5 (figure IV.6.) nous permet de voir un agrégat de deux billes, une troisième (le point le plus petit) semble être plus profondément enfouie dans le film que les autres. Ceci nous amène à proposer une structure pour les films :

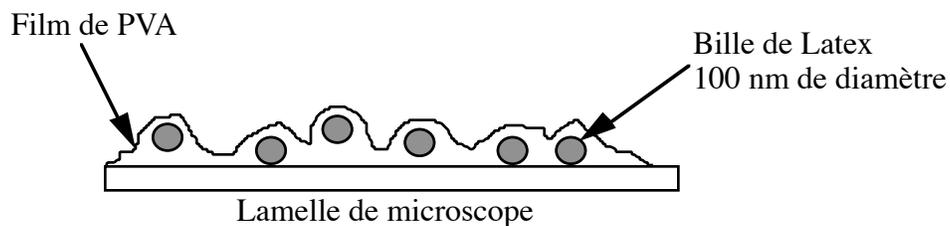


Figure IV.7. *Vue schématique d'un film de PVA (50 nm environ d'épaisseur) dans lequel sont immobilisées des billes de latex.*

La méthode employée pour réaliser les films permet donc d'avoir une répartition homogène des billes.

Les films ont également été caractérisés avec un microscope à épifluorescence. La figure IV.8. montre une image avec un objectif de grossissement *20.



Figure IV.8. Image ($500 * 300 \mu\text{m}$) d'un film de billes de latex de 100 nm de diamètre, microscope à épifluorescence, objectif de grossissement * 20.

Nous pouvons observer une vingtaine d'agrégats fluorescents, mais une majorité de points lumineux correspondent à des billes individuelles. Les billes individuelles semblent émettre de la fluorescence de façon équivalente. Une image avec un objectif de grossissement *100 à immersion nous permet d'isoler sur une même image trois billes (Figure IV.9.). Leurs tailles apparentes sont équivalentes, et l'intensité de fluorescence émise est à peu près identique quelle que soit la bille.

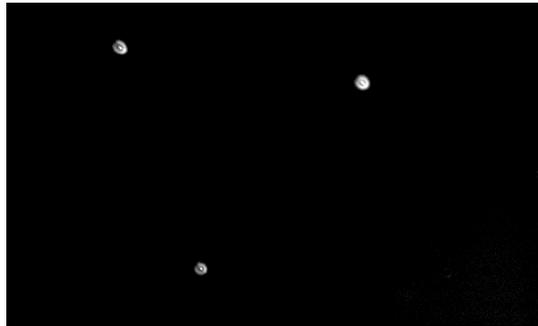


Figure IV.9. Image ($4 * 7 \mu\text{m}$) d'un film de billes de latex, microscope à épifluorescence, objectif de grossissement *100 à immersion.

Conclusions :

Les différentes techniques de microscopie utilisées ont permis de mieux caractériser les films de PVA dans lesquels nous avons immobilisé les billes. La couche de PVA (50 nm environ) recouvre les billes, celles-ci sont enfouies de manière variable dans la matrice. Ceci a déjà été observé par K. Jeuris¹²⁰. L'intensité de fluorescence semble identique de bille à bille. Il y a peu d'agrégats, la méthode de déposition choisie permet une bonne dispersion des billes dans la matrice.

IV.1.2.2. Etude de la fluorescence résolue en temps de billes par microscopie confocale ; excitation à 450 nm

Cette étude a été réalisée dans le laboratoire du Professeur H. Masuhara. Nous avons travaillé avec le montage de microscopie confocale décrit dans l'Annexe C. La longueur d'onde d'excitation est à 450 nm, celle de détection à 560 nm.

IV.1.2.2.A Microspectroscopie de fluorescence : analyse des déclins de billes « Orange 100 sulfate »

Afin d'avoir la certitude de focaliser le faisceau sur une bille et non sur une poussière ou toute autre impureté, nous avons cherché dans les films des taches de diffraction sous éclairage avec un laser He-Ne, auxquelles correspondaient également des points fluorescents. Nous avons mesuré des points isolés, sans voisin fluorescent proche. Le déclin de fluorescence de ces points lumineux individuels *i.e* de billes uniques ont été mesurés. Nous avons également cherché à observer la fluorescence à des endroits où il n'y avait pas diffraction de la lumière He-Ne : le signal est négligeable comparé à la fluorescence des points lumineux individuels caractérisés précédemment. Nous présentons figure IV.10. les déclins de quelques billes :

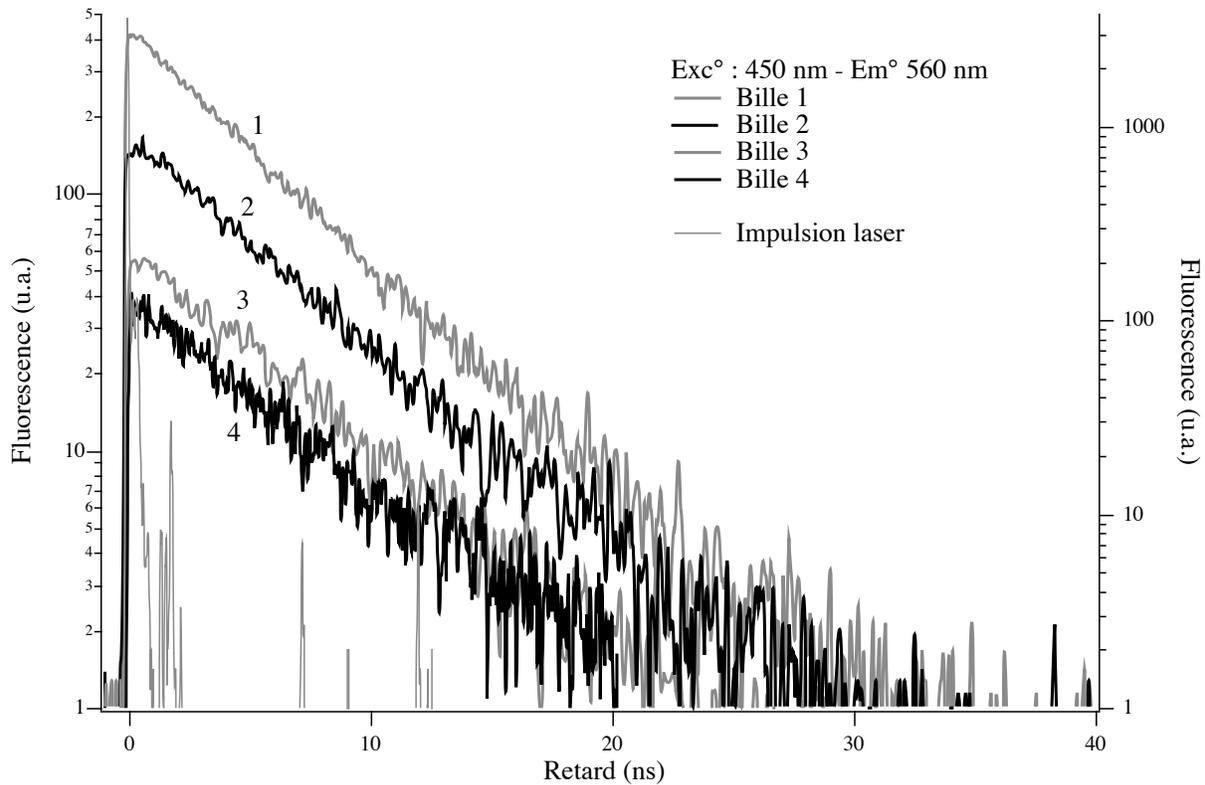


Figure IV.10. Déclins de fluorescence de quatre billes « Orange 100 sulfate » isolées, immobilisées dans un film de PVA. Excitation : 450 nm - Emission : 560 nm

Le déclin s'ajuste par une fonction mono-exponentielle. Chaque bille présente une durée de vie à peu près identique. La durée de vie moyenne est $5,3 \pm 0,3$ ns. La dispersion de durées de vie peut provenir de la faiblesse du signal recueilli, de fluctuations de l'intensité d'excitation ou d'incertitudes sur la position des billes par rapport au point focal. La durée de vie des billes dans les films est sensiblement identique à celle observée dans l'eau. Comme nous l'avons observé en solution (§ IV.1.), le film de PVA ne modifie pas de manière significative la fluorescence des billes de latex.

IV.1.2.2. Microspectroscopie de fluorescence : effet de l'ajout de Bleu de Méthylène

Nous avons, dans le chapitre précédent, montré que le BM s'adsorbe sur les billes « Orange 100 sulfate » avec une constante d'association élevée dans l'eau : $K_{\text{ads}} = 3,5 \cdot 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$. Nous avons montré dans le paragraphe IV.1. que même si le PVA peut modifier l'équilibre d'association du BM avec les billes, le colorant s'adsorbe toujours sur les billes et induit une extinction de la fluorescence. Lorsque le film est réalisé par dépôt d'une solution **B** ou **C**, nous nous attendons à ce que le BM reste adsorbé sur les billes. Nous présentons sur la figure IV.11. les déclinés de billes uniques en présence de BM (film réalisé à partir de la solution **C**) :

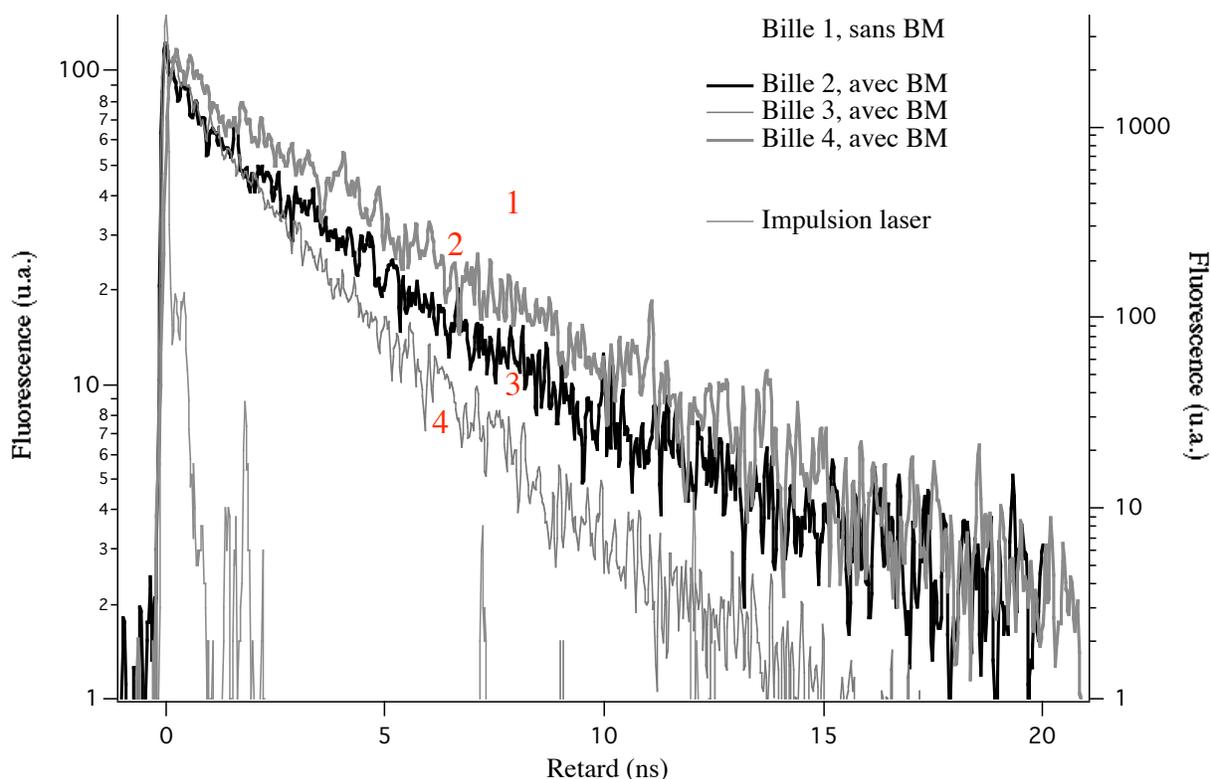


Figure IV.11. *Déclinés de fluorescence de billes « Orange 100 sulfate » uniques, immobilisées dans un film de PVA avec BM (film C) et sans quencher. Les déclinés sont normalisés au maximum. Excitation : 450 nm - Emission : 560 nm*
Traits pointillés (1) : une bille sans BM
Traits pleins (2, 3, 4) : plusieurs déclinés de billes uniques sous microscope, en présence de la même concentration de BM ($6,06 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$)

Les déclinés mesurés ne sont pas mono-exponentiels. Bien que le film ait été réalisé avec la même solution (C) les déclinés en présence de BM sont très différents entre eux. Afin d'étudier la dynamique de l'extinction par le BM dans les films, nous avons choisi comme paramètre le temps de déclin au bout duquel l'intensité de fluorescence est devenue 1/e de la fluorescence initiale. Cette

analyse se justifie ici, car le taux de comptage est typiquement inférieur à 100. Il est donc difficile d'analyser les déclin en utilisant des fonctions multiexponentielles⁵.

Nous avons représenté le temps de déclin de billes uniques sans BM, et avec BM sous forme d'un histogramme (Figure IV.12.).

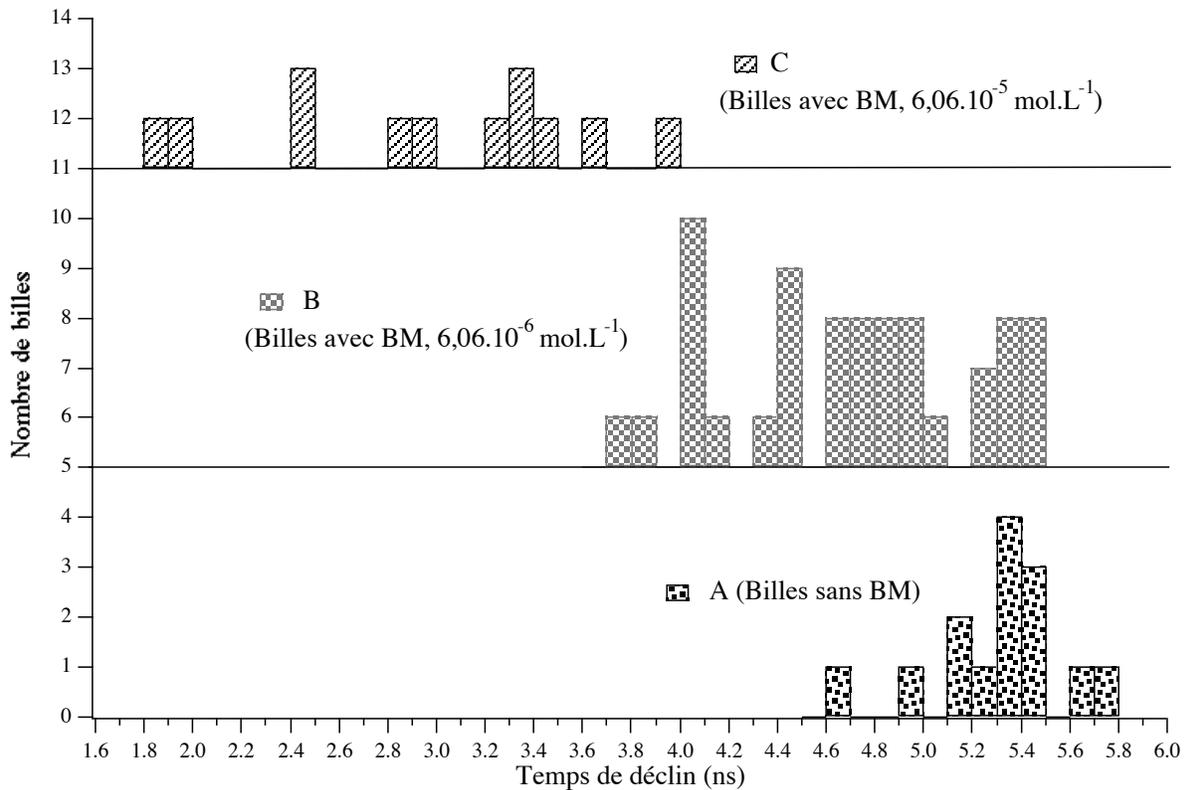


Figure IV.12. *Histogrammes du temps de déclin des billes « Orange 100 sulfate » immobilisées dans une matrice de PVA, sans BM (A) et avec BM (B $6,06.10^{-6}$ et C $6,06.10^{-5}$ mol.L⁻¹). Les déclin sans BM ont été analysés par une fonction mono-exponentielle. Les déclin avec BM sont caractérisés par le temps au bout duquel l'intensité de fluorescence a été multipliée par un facteur 1/e.*

La durée de vie moyenne augmente nettement avec la quantité de BM. Le tableau IV.4. présente les moyennes de temps de déclin en fonction de la concentration en BM.

	Moyenne du temps de déclin (ns)	Ecart-type (ns)	Nombre de déclin mesurés
A , [BM]=0 mol.L ⁻¹	5,3	0,3	14
B , [BM]= $6,06.10^{-6}$ mol.L ⁻¹	4,7	0,5	34

C, [BM]=6,06.10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	2,8	0,8	13
---	-----	-----	----

Tableau IV.4. *Moyenne de temps de déclin et écart type pour les films A, B, C de billes « Orange 100 sulfate » immobilisées.*

La distribution de temps de déclin augmente avec la quantité de BM introduite. Cette largeur de la distribution des temps de déclin en présence de BM peut avoir plusieurs causes :

- La concentration de BM n'est pas homogène dans les films de PVA, ainsi les billes n'ont pas le même environnement et ne « voient » pas la même concentration de BM ;
- Le nombre de sites d'adsorption est différent de bille à bille, ceci est plausible dans la mesure où il nous semble difficile de contrôler le nombre et la taille des « brins » de polymères qui permettent la fonctionnalisation des billes par des groupes carboxylates ;
- L'efficacité d'extinction de la fluorescence diffère de bille à bille ; ceci pourrait être une conséquence d'une distribution non uniforme du fluorophore entre les billes.

Conclusions :

Lors de nos études en solution aqueuse, nous pouvions analyser les déclins en présence de quencher par une fonction bi-exponentielle dont une des durées de vie est fixée constante, égale à la durée de vie sans quencher. Nous avons alors avancé un modèle de « couronne ». Les hypothèses sous-jacentes à ce modèle sont que les billes sont toutes identiques et que le nombre moyen de BM adsorbé par bille est le même quelle que soit la bille. Nous avons montré, ici, qu'en effet, en l'absence de quencher, les billes sont identiques. Cependant les déclins en présence de BM ne semblent pas bi-exponentiels. Il est possible que le modèle de la « couronne » ne soit pas aussi simplement applicable pour expliquer la dynamique de quenching lorsque les billes sont immobilisées dans le PVA.

IV.1.2.3. Etude de la fluorescence résolue en temps par microscopie confocale des billes immobilisées dans des films de PVA; excitation à 495 nm

IV.1.2.3.A Microspectroscopie de fluorescence : analyse des déclins de billes « Orange 100 sulfate »

Nous avons travaillé avec le montage de microscopie confocale décrit dans l'Annexe B et le système de micropositionnement développé par Nathalie Coste¹⁰⁵. La précision et la qualité de nos mesures sont conditionnées par une profondeur de champ de l'ordre de 0,45 μm . Nous avons ainsi une excellente confocalité. La longueur d'onde d'excitation est à 497 nm, celle de détection à 560 nm.

Nous avons travaillé avec une fibre de 100 μm de diamètre, un monochromateur, et un filtre « jaune » à 525 nm afin de s'affranchir totalement de la contribution de l'impulsion. Les points fluorescents observés sont très lumineux. La longueur d'onde d'excitation est, en effet, mieux adaptée que celle utilisée précédemment. Si l'on ne réduit pas la puissance du faisceau d'excitation une diminution du signal de fluorescence est observée suite à la destruction progressive du fluorophore. Nous avons pris soin de sélectionner des points suffisamment isolés de leurs voisins afin de n'observer que la fluorescence d'une bille. Les déclin sont comptés pendant 10 minutes environ et atteignent plusieurs centaines de coups au maximum du déclin. La fluorescence d'un film de PVA sans bille ni quencher a été mesurée : le signal est négligeable par rapport au signal des billes.

Nous présentons dans le Figure IV.13. le déclin des billes en solution aqueuse, ainsi qu'un déclin caractéristique d'une bille sous microscope.

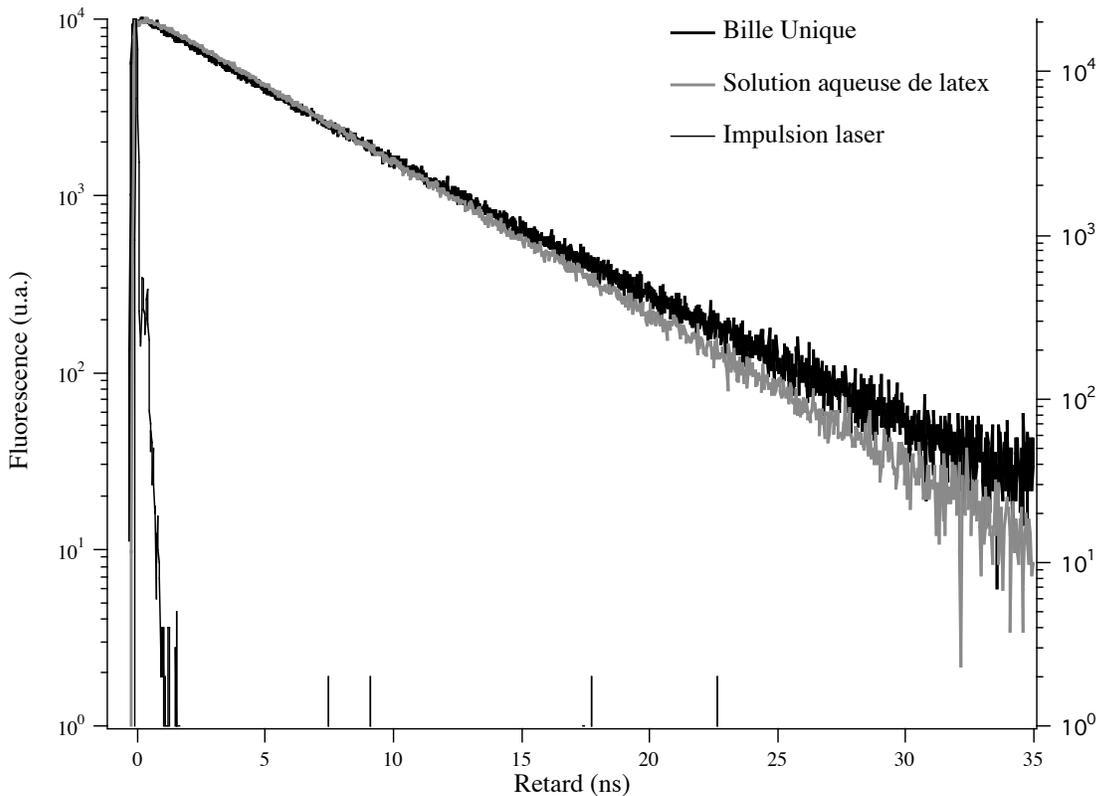


Figure IV.13. *Déclin de fluorescence de billes « Orange 100 sulfate » dans l'eau (courbe grise) ; déclin de fluorescence d'une bille « Orange 100 sulfate » dans un film de PVA sous microscope. Excitation : 497 nm - Emission : 560 nm*

Comme nous l'avons observé précédemment, le déclin d'une bille immobilisée dans une matrice de PVA est semblable au déclin d'un ensemble de billes dans l'eau. Le déclin est mono-exponentiel et

semble cependant légèrement plus long que dans l'eau. Toutes les billes que nous avons étudiées ont donné un déclin d'une durée de vie de l'ordre de $5,3 \pm 0,3$ ns. Nous confirmons ici que les billes sont identiques quant à leur comportement sous excitation laser.

IV.1.2.3.B Microspectroscopie de fluorescence : effet de l'ajout de Bleu de Méthylène

Nous avons étudié ici un seul échantillon, dont la solution mère présente une concentration en BM de $6,06 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ (solution C). Nous présentons dans la figure IV.14. quelques déclin de fluorescence (films A et C).

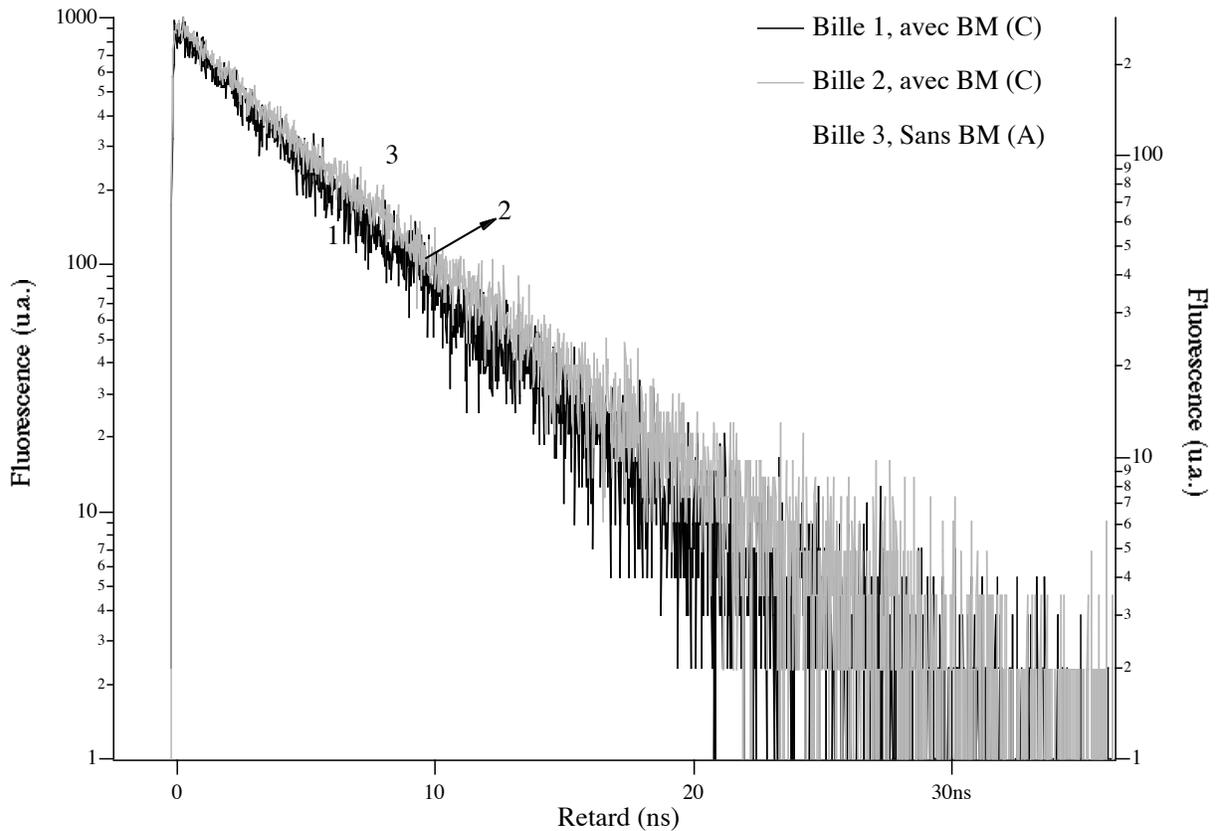


Figure IV.14. *Déclins de fluorescence, sous microscope, de billes uniques « Orange 100 sulfate », immobilisées dans des films de PVA, sans BM (A) et avec (film C $6,06 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) - Excitation : 497 nm - Emission : 560 nm*

La fluorescence des billes est plus rapide en présence de BM que sans. Les déclinés avec BM semblent présenter moins de différences que lors des mesures précédentes. Par homogénéité avec le traitement précédent (IV.1.2.2.), nous avons évalué le temps de déclin au bout duquel l'intensité de fluorescence est devenue 1/e de la fluorescence initiale. Nous avons représenté sous forme d'histogramme les temps de déclin mesurés (Figure IV.15.).

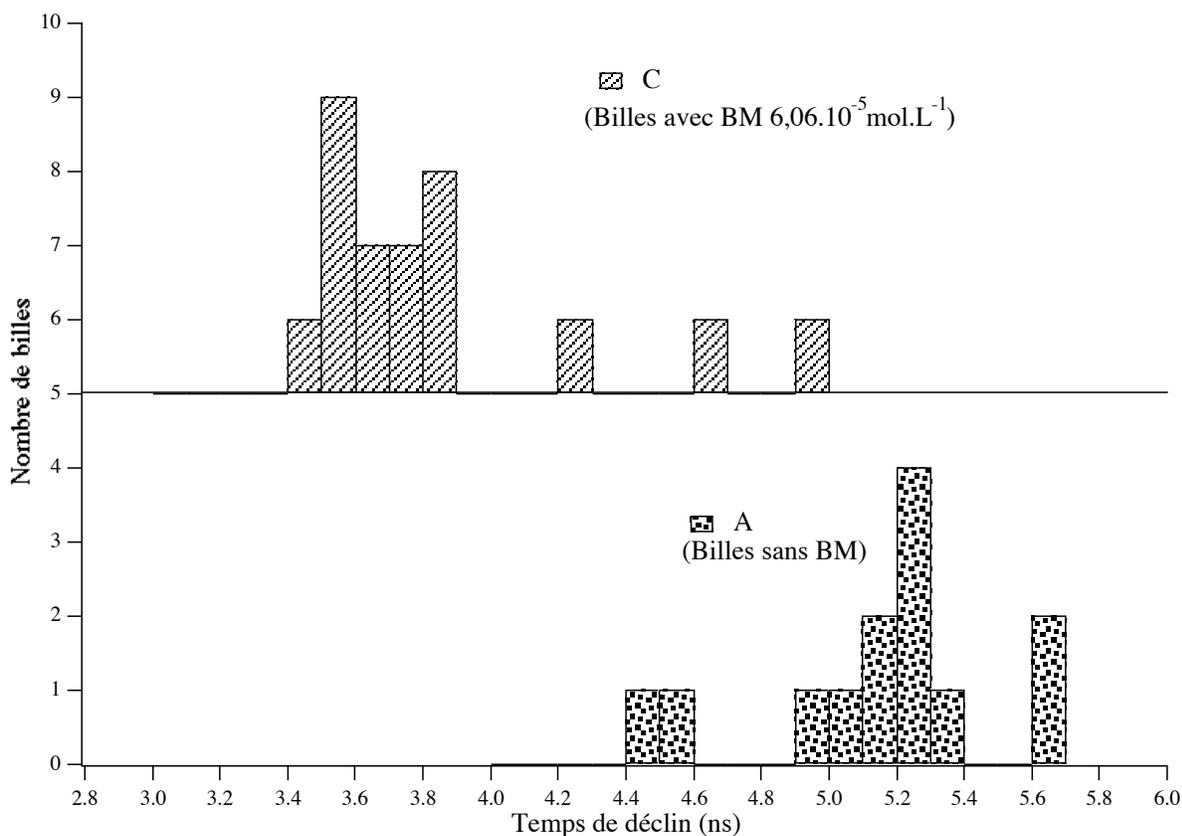


Figure IV.15. *Histogrammes du temps de déclin des billes « Orange 100 sulfate » immobilisées dans une matrice de PVA, sans BM (A) et avec BM (C $6,06 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). Les déclinés sans BM ont été analysés par une fonction monoexponentielle. Les déclinés avec BM sont caractérisés par le temps au bout duquel l'intensité de fluorescence a été multipliée par un facteur 1/e.*

Nous observons nettement l'existence de deux populations correspondant à deux situations : sans BM et avec BM. Le temps de déclin avec quencher est centré autour de 3,85 avec une distribution de durées de vie de +/- 0,4 ns.

Conclusions :

Dans la mesure où le temps de déclin n'est pas sensible à la longueur d'onde d'excitation, nous rassemblons dans la Figure IV.16., l'ensemble des résultats obtenus en microscopie confocale.

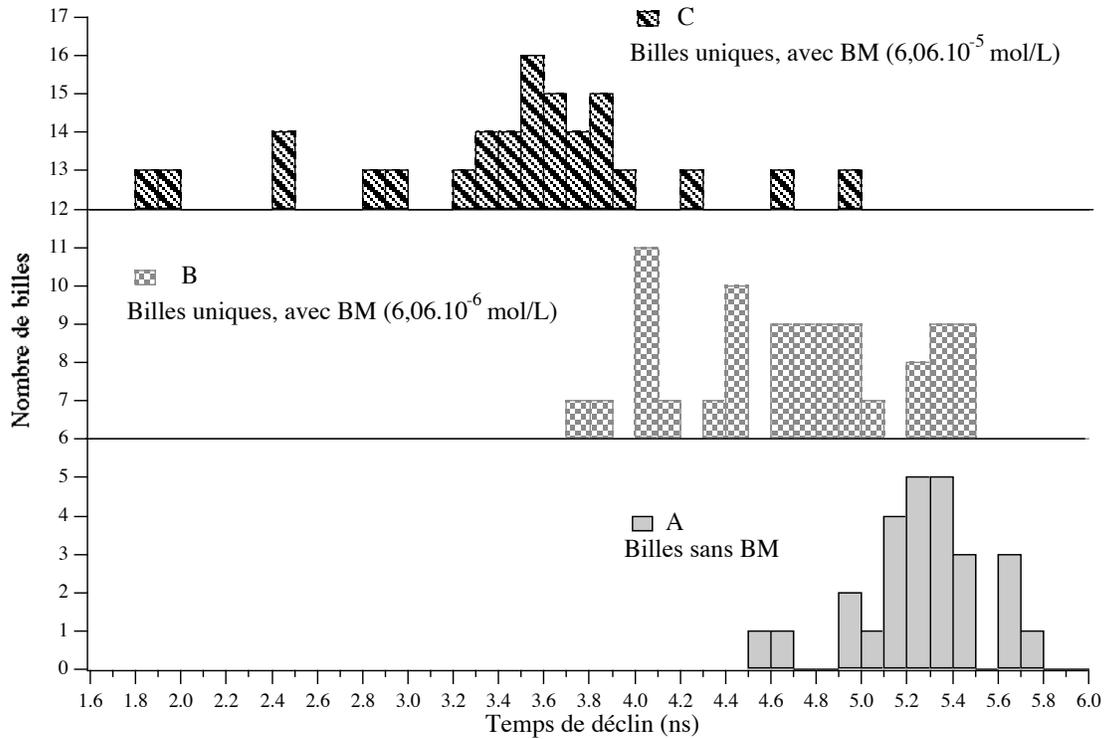


Figure IV.16. Synthèse des études du temps de déclin des billes « Orange 100 sulfate » immobilisées dans une matrice de PVA, sans BM (A) et avec BM (B $6,06 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ et C $6,06 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹). Les déclins sans BM ont été analysés par une fonction mono-exponentielle. Les déclins avec BM sont caractérisés par le temps au bout duquel l'intensité de fluorescence a été multipliée par un facteur 1/e.

Nous présentons au tableau IV.5. les moyennes et écarts-types calculés sur tous les déclins mesurés (quelle que soit la longueur d'onde d'excitation) :

	Moyenne du temps de déclin (ns)	Ecart-type (ns)	Nombre de déclins mesurés
A, [BM]=0 mol.L ⁻¹	5,3	0,3	27
B, [BM]= $6,06 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹	4,7	0,5	34
C, [BM]= $6,06 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹	3,4	0,8	28

Tableau IV.5. Synthèse des moyennes de temps de déclin et écarts-types pour les films A, B, C de billes « Orange 100 sulfate » immobilisées.

Il existe effectivement trois « populations » de billes qui sont caractérisées par des temps de déclin différents, corrélés à la quantité de BM introduite. La durée de vie moyenne sans BM correspond à la durée de vie dans l'eau.

IV.1.2.4. Observations de billes individuelles avec un détecteur-imageur résolu en temps.

L'observation bille par bille limite le nombre de billes que l'on peut étudier en un temps raisonnable. Nous avons repris l'étude précédente en utilisant un détecteur imageur résolu dans le temps (Annexe D). La taille des images est de $100 * 100 \mu\text{m}$. Nous présentons tout d'abord l'image d'un échantillon non fluorescent (film de PVA sans billes ni BM) uniformément éclairé. (Figure III.17.)

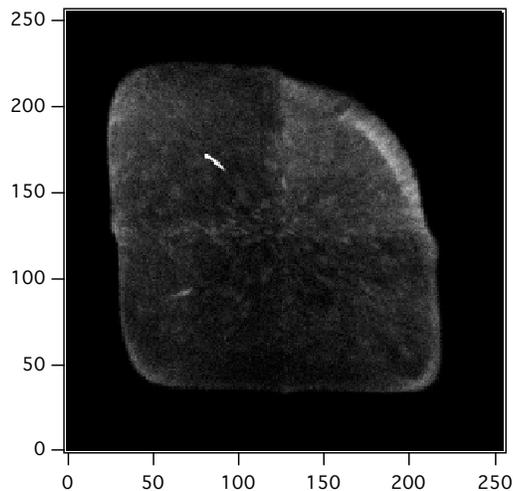


Figure IV.17. Image d'un film de PVA sans bille ni BM, uniformément éclairé.
Le niveau de blanc est proportionnel au nombre de photons collectés.

Dans le système que nous avons utilisé, le domaine de détection du quart supérieur droit de l'anode est rogné. Au milieu du quart supérieur gauche nous pouvons distinguer un « point chaud » du détecteur qui délivre un grand nombre d'avalanches de basse intensité. Les photons qui sont tombés loin du centre sont difficiles à positionner car au moins une des anodes mesure une charge presque nulle. La surbrillance à la périphérie est due à l'accumulation de ces photons que l'algorithme de reconstruction de l'image regroupe loin du centre. Nous pouvons enfin deviner une croix qui coupe l'image et qui rappelle la présence des quatre anodes qui servent à construire l'image.

- La figure IV.18. présente l'image recueillie par le détecteur d'une dispersion de billes dans un film C.

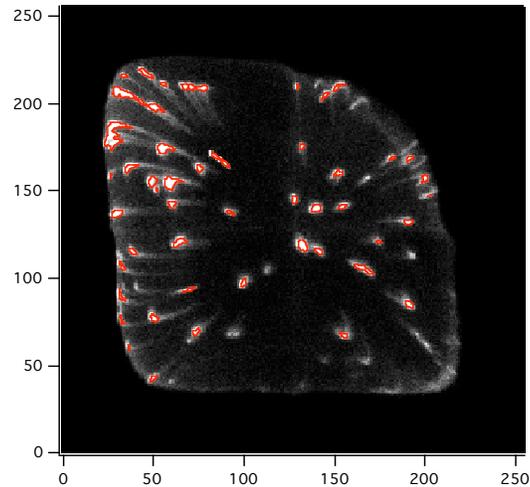


Figure IV.18. *Image d'un film C (billes et BM) uniformément éclairé.*

Les billes reconnues par le programme sont délimitées en rouge. On note que les billes de la périphérie présentent une queue de comète. Ce sont les avalanches de faible amplitude qui sont mal prises en compte par notre algorithme. Celui fourni par le fabricant est plus efficace, mais nous avons préféré construire nos analyses à partir des données brutes.

Nous pouvons voir sur les figures IV.19. et IV.20. des points colorés qui sont autant de billes de latex. Le déclin de fluorescence est mesuré en chaque pixel.

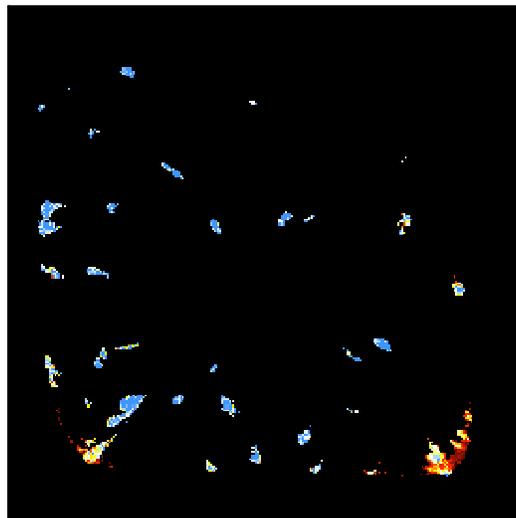


Figure IV.19. *Image d'un film de billes immobilisées sans BM (film A)*

Le code de couleurs reflète la durée de vie moyenne sur chaque pixel de l'image. Le bleu est associé à une durée de vie de 5 ns, le rouge à un déclin multiexponentiel de moins de 1 ns. Le domaine noir

contient peu de photons par pixel. L'image IV.19. est obtenue pour des latex dans le PVA sans BM. Les latex sont uniformément bleus. Les latex présentent tous la même durée de vie. Néanmoins des domaines de durée de vie brève apparaissent sur la périphérie de l'image. Dans ce domaine les photons provenant des latex sont mélangés à ceux du fond de diffusion. C'est peut être l'origine de la composante rouge qui apparaît. L'image IV.20. obtenue pour des latex dans le PVA avec BM.

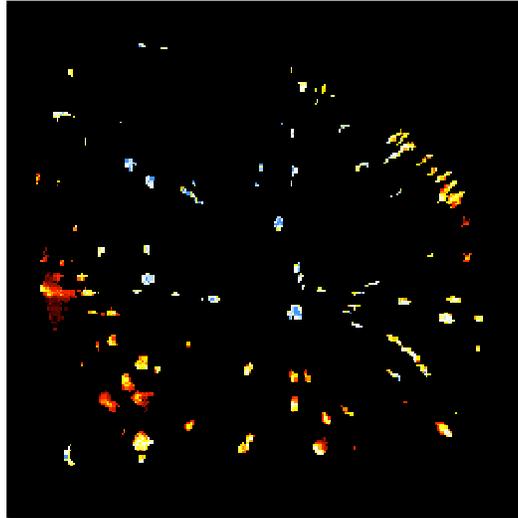


Figure IV.20. *Image d'un film de billes « sulfate » immobilisées en présence de BM (film C)*

Les billes apparaissent différentes pour ce qui est de leur durée de vie de fluorescence. On retrouve le quenching de fluorescence déjà observé en microscopie confocale. Mieux que l'approche confocale, nous pouvons observer maintenant 120 objets simultanément. Mais on peut craindre que la réduction de l'intensité de fluorescence due au BM rende la fluorescence des billes plus facilement contaminée par le fond. On a vu sur l'image précédente que cette contamination se traduisait par une réduction apparente de la durée de vie. Les domaines de durée de vie courte ne sont pas limités cette fois-ci à la périphérie de l'image. Les plus petites taches lumineuses ne sont pas systématiquement celles dont le déclin est le plus rapide. De plus, nous n'avons jamais observé une telle dispersion des durées de vie sur les échantillons sans BM. Cette dispersion n'est donc pas due à des artefacts expérimentaux.

Si le BM révélait une hétérogénéité cachée des latex, les billes de durée de vie courte se répartiraient aléatoirement dans l'image. L'image que l'on voit suggère plutôt une ségrégation du BM dans la matrice de PVA.

Le déclin de chaque bille présente dans la Figure IV.20 peut être recueilli et analysé. Une analyse de chimométrie en composantes principales (Annexe E) a été menée sur cet ensemble de déclins. La

contribution à la variance (χ^2) de chacun des composantes proposées par l'algorithme est présentée sur la figure IV.21.

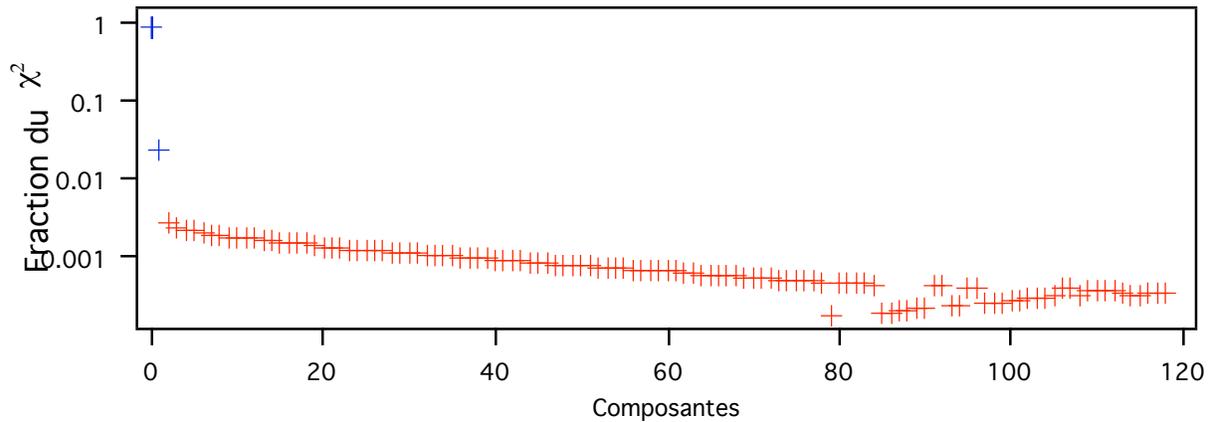


Figure IV.21. Analyse par décomposition en composantes principales des déclins, contribution à la variance de chacune des composantes. Les composantes majoritaires sont en bleu.

Nous avons conservé les deux principales composantes qui sont représentées sur la figure IV.22. On reconnaît le déclin d'un latex sans Bleu de Méthylène en 5 ns pour la composante lente. La composante plus rapide correspond au quenching par le BM.

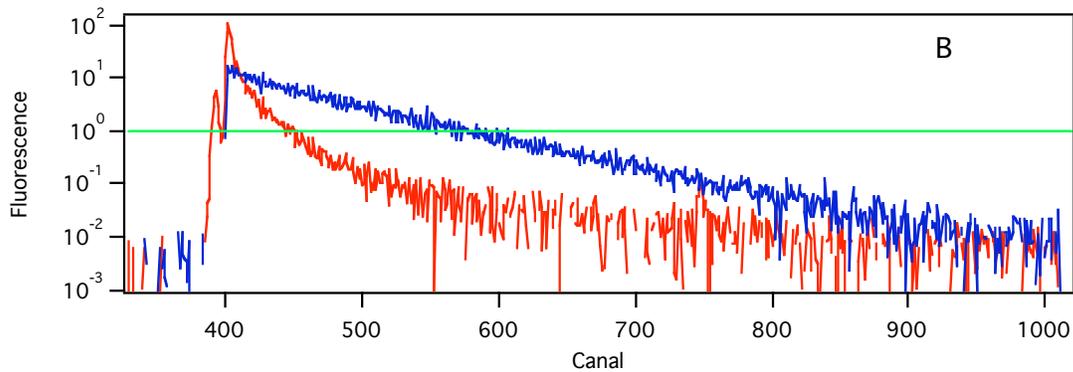


Figure IV.22. Composantes retenues pour l'analyse des déclins

Sur la figure IV.23, nous avons représenté la matrice des résidus correspondant à ce calcul. A gauche est représenté le χ^2 pour chacun des déclins. Il reste compris entre 1 et 3, ce qui est satisfaisant. A droite est représenté l'écart entre la courbe expérimentale et sa description. La couleur de chaque point dépend du signe du résidu.

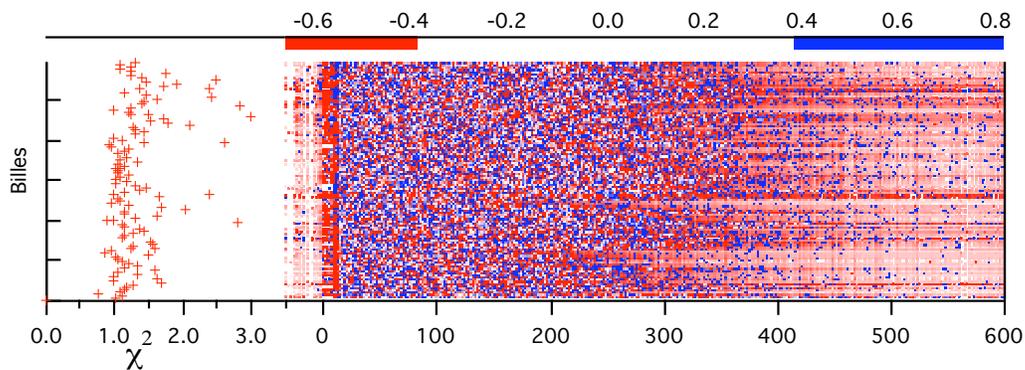


Figure IV.23. *Matrice des résidus.*

La distribution uniforme des couleurs indique que la description est bonne dans tout l'espace des données.

Cette analyse nous a donc permis d'identifier deux composantes qui décrivent **91% des déclin**s. Ceci confirme que les différences de durée de vie ne sont pas liées à l'hétérogénéité des billes, mais plutôt à des différences de concentration locale de BM.

Conclusions :

Nous avons étudié les déclin

s de fluorescence de billes uniques sans Bleu de Méthylène, sous microscope, ces billes sont immobilisées dans des films de PVA. La moyenne du temps de déclin est sensiblement identique à celle dans l'eau. Les durées de vie de bille à bille sont pratiquement identiques. Nous pourrions donc utiliser ces billes comme outils de calibration.

Nous avons également étudié l'extinction de la fluorescence de ces billes par le Bleu de Méthylène : pour une concentration donnée de BM, les déclin

s de fluorescence présentent des durées de vie différentes. Ceci pourrait être dû à une distribution inhomogène du BM adsorbé sur les billes.

IV.2. Latex « Orange 100 carboxylate »

Comme pour les billes « Orange 100 sulfate », nous avons immobilisé les billes « Orange 100 carboxylate » dans des films de PVA. Ces résultats restent préliminaires et nous ne présenterons pas une étude aussi étendue que précédemment.

IV.2.1. Comparaison des propriétés spectroscopiques des billes dans l'eau et dans des solutions de PVA.

IV.2.1.1. Spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire

Nous avons étudié des solutions de latex dans l'eau et dans le PVA, avant de procéder à l'élaboration du film. La concentration des billes est de 2.10^{13} billes.L⁻¹. Les spectres d'absorption des billes dans l'eau ou dans une solution aqueuse de PVA sont identiques. Nous présentons à la Figure IV.24. quelques spectres d'émission de fluorescence de latex « Orange 100 carboxylate » dans l'eau et dans une solution aqueuse de PVA à 1% en poids, avec et sans BM.

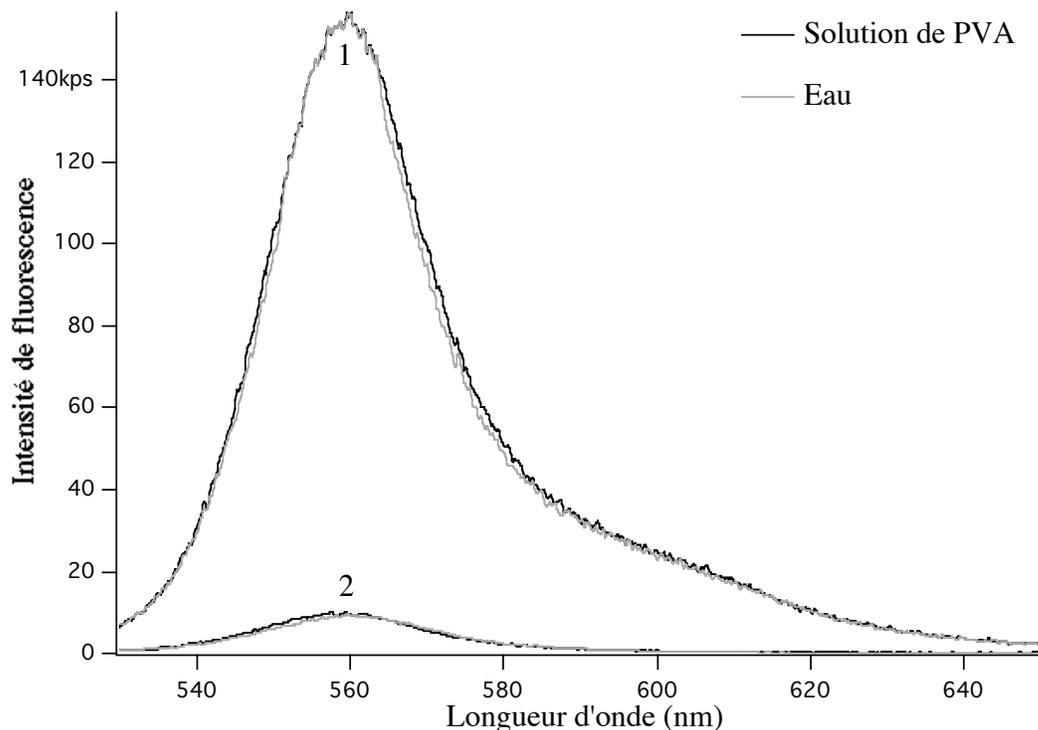


Figure IV.24. Spectres d'émission de fluorescence stationnaire (Excitation : 497 nm)
1 en absence de BM - 2 en présence de BM $4,7.10^{-5}$ mol.L⁻¹
Traité noir : latex dans l'eau
Traité gris : latex dans une solution de PVA

L'allure des spectres d'émission de fluorescence n'est pas sensiblement affectée par la présence de PVA. Nous pouvons cependant constater que l'intensité de fluorescence est légèrement plus faible en présence de PVA. Si nous calculons l'expression de Stern-Volmer ($\frac{I_0}{I} - 1$) en fonction de la concentration totale de BM, nous obtenons :

	$\frac{I_0}{I} - 1$ Eau	$\frac{I_0}{I} - 1$ Eau-PVA(1%)
[BM]=0 mol.L ⁻¹	0	0
[BM]=4,7.10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	14,3	13,9

Tableau IV.6. Comparaison des effets d'une solution aqueuse de PVA par rapport à l'eau - Calculs de Stern-Volmer pour des latex « Orange 100 carboxylate » en présence de BM.

La diminution de l'intensité de fluorescence dans une solution aqueuse de PVA est moins importante que dans l'eau. Ceci peut être mis en relation avec les propriétés d'agent dispersant du PVA évoquées précédemment. L'effet du PVA semble cependant moindre pour les billes « Orange 100 carboxylate » que pour les billes « Orange 100 sulfate ».

IV.2.1.2. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps

La fluorescence résolue en temps des solutions précédentes a été étudiée avec le montage décrit dans l'annexe B. La longueur d'onde d'excitation est à 497 nm, et celle d'émission à 560 nm. Nous présentons à la Figure IV.25. quelques déclin de fluorescence des billes, avec et sans BM :

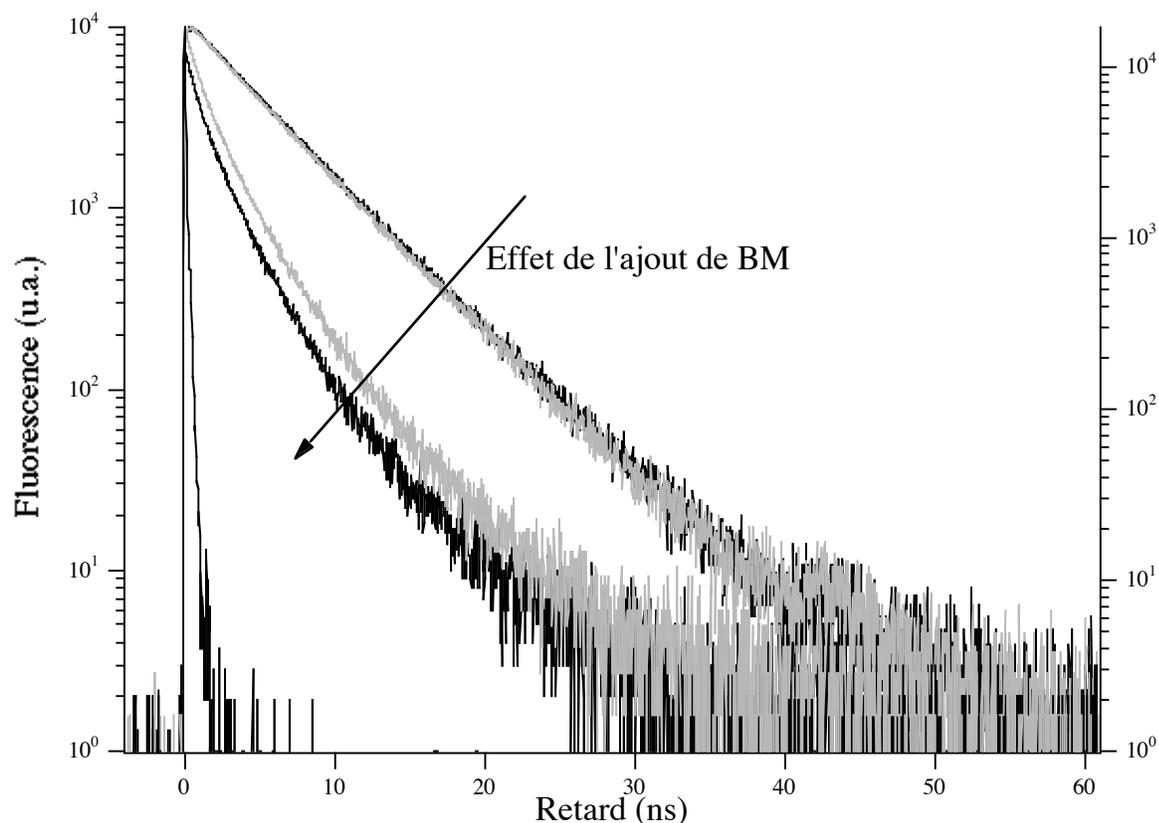


Figure IV.25. *Comparaison des déclinés de fluorescence de billes « Orange 100 carboxylate », avec et sans BM, dans l'eau et dans une solution aqueuse de PVA à 1% en poids. Les déclinés sont normalisés -Excitation 497nm -Emission 560nm Les déclinés les plus longs sont les déclinés des billes sans BM ; les déclinés les plus courts sont en présence de BM (4,7.10⁻⁵ mol.L⁻¹)*
 Trait gris : latex dans une solution aqueuse de PVA
 Trait noir : latex dans l'eau

Les déclinés de fluorescence dans l'eau et dans une solution aqueuse de PVA sont identiques. Les déclinés en présence de BM semblent plus rapides dans l'eau que dans le PVA. Ceci est sans doute dû à l'adsorption moindre du BM en présence de PVA. Comme les déclinés sont complexes, nous avons choisi d'étudier l'effet du PVA par rapport à l'eau en étudiant la durée de vie moyenne définie comme suit :

$$\bar{\tau} = \frac{\int_0^{\infty} t * I(t) * dt}{\int_0^{\infty} I(t) * dt} \quad (\text{IV.1})$$

Nous avons résumé dans le tableau IV.7. les calculs équivalents aux calculs de Stern-Volmer *i.e* $\frac{\bar{\tau}_0}{\bar{\tau}}$ en fonction de la concentration totale de BM. $\bar{\tau}_0$ est la durée de vie moyenne en absence de BM, et $\bar{\tau}$ la durée de vie moyenne en présence de BM.

	$\frac{\bar{\tau}_0}{\bar{\tau}}$ Eau	$\frac{\bar{\tau}_0}{\bar{\tau}}$ Eau-PVA(1%)
[BM]=0 mol.L ⁻¹	1	1
[BM]=4,7.10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	2	1,85

Tableau IV.7« *Calculs de Stern-Volmer* » soit $\frac{\bar{\tau}_0}{\bar{\tau}}$ en fonction de la concentration totale en BM,
Comparaison entre l'eau et une solution aqueuse de PVA

Ces calculs confirment que l'effet du BM en présence de PVA est moindre que dans l'eau. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en fluorescence stationnaire.

- En fluorescence stationnaire comme en fluorescence résolue en temps, l'effet du PVA est moins important sur les billes fonctionnalisées par des groupes carboxylates que sur celles fonctionnalisées par des groupes sulfates. Or le PVA aura sans doute moins d'affinité pour les sites hydrophobes des billes de latex que le BM. Ainsi plus il y a de sites hydrophobes sur une bille, moins le PVA est susceptible de perturber l'adsorption du BM à la surface. Comme le nombre de sites hydrophobes est plus grand sur les billes « Orange 100 carboxylate » que sur

les billes « Orange 100 sulfate » (Cf. Chapitre III) il semble logique que le PVA ait plus d'effet sur les billes fonctionnalisées par des groupes sulfates.

- Le PVA modifie légèrement l'adsorption du BM sur les billes, sans pour autant empêcher l'adsorption. Le BM adsorbé en présence de PVA éteint efficacement la fluorescence des billes. Nous allons maintenant étudier des films de PVA dans lesquels nous avons immobilisé des billes de latex.

IV.2.2. Etude par microscopie confocale des billes immobilisées dans des films de PVA ; excitation à 495 nm

Nous avons étudié deux types de films : le premier avec uniquement des billes, le second avec du BM (Cf. Partie Expérimentale). Nous résumons dans le tableau suivant les caractéristiques des solutions à partir desquelles nous avons réalisé les films :

Nous avons examiné des films issus des solutions **A** et **C** (Cf. Tableau IV.8). Nous avons travaillé avec le montage de microscopie confocale décrit dans l'Annexe B. La longueur d'onde d'excitation est à 497 nm, celle d'émission à 560 nm.

	A	C
Solution de PVA (% en poids par rapport à l'eau)	1 %	1 %
Concentration en billes / L	$2 \cdot 10^{13}$	$2 \cdot 10^{13}$
Concentration en BM (mol/L)	0	$6,06 \cdot 10^{-5}$

Tableau IV.8. *Caractéristiques des solutions utilisées pour élaborer les films.*

IV.2.2.1. Microspectroscopie de fluorescence : analyse des déclin de billes « Orange 100 carboxylate »

Nous avons travaillé dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe IV.1.2.3.A. Nous présentons dans la figure IV.26. le déclin typique d'une bille immobilisée en film et celui des billes dans l'eau.

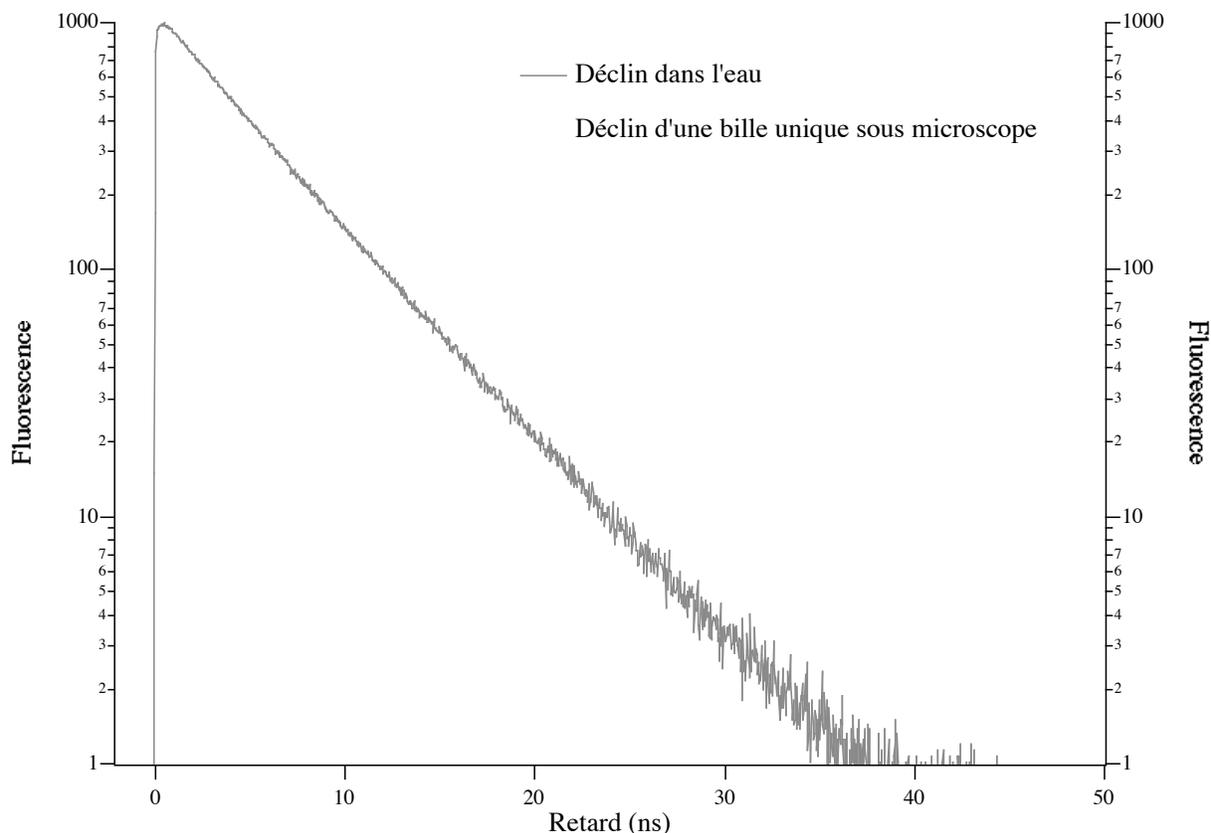


Figure IV.26. *Comparaison des déclin de fluorescence des billes « Orange 100 carboxylate » - Excitation 497 nm - Emission 560 nm- Traits pleins : latex en solution aqueuse (montage en cuve) Traits pointillés : une bille immobilisée dans un film de PVA (montage de microscopie confocale)*

Les déclin des billes « Orange 100 carboxylate » sont quasiment identiques quelle que soit la bille. Ce déclin est semblable à celui observé en solution aqueuse. Il peut être ajusté par une fonction bi-exponentielle, les durées de vie calculées sont 6 ns (58 %) et 4,4 ns (42 %). La première est la même que celle trouvée en solution, la seconde est légèrement plus longue. Nous avons, comme dans le chapitre II, attribué les deux durées de vie à deux populations : une au coeur de la matrice (caractérisée par la durée de vie de 6 ns) et une population en surface, éventuellement dans la « chevelure » (caractérisée par la durée de vie de 4,3 ns dans l'eau).

IV.2.2.2. *Microspectroscopie de fluorescence : effet de l'ajout de Bleu de Méthylène*

Nous avons travaillé avec une concentration de $6,05 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ en BM. Nous présentons dans la Figure IV.27. les déclin de billes uniques immobilisées dans un film de PVA :

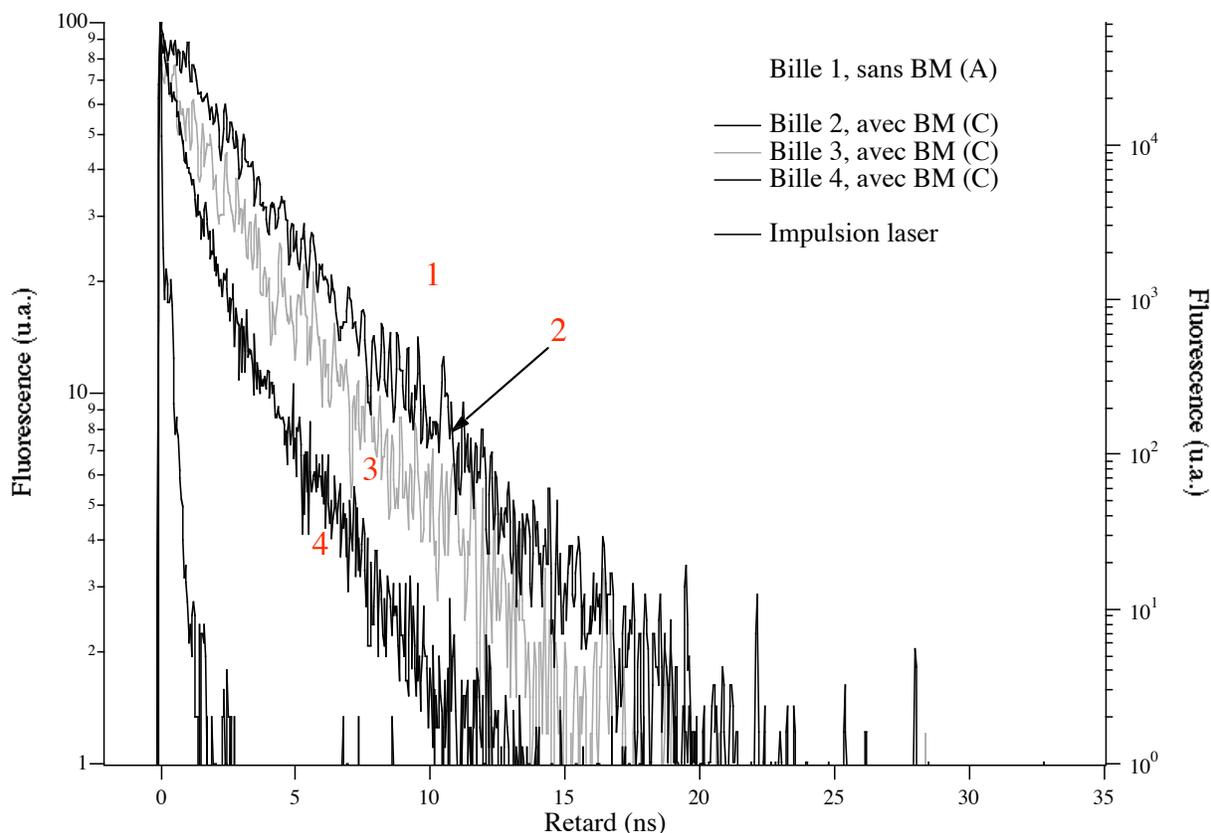


Figure IV.27. *Comparaison des déclins de fluorescence des billes « Orange 100 carboxylate » immobilisées dans un film de PVA (montage de microscopie confocale) - Excitation 497 nm - Emission 560 nm- Traits pleins : déclins de billes uniques en présence de BM C $6,06 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) Traits pointillés: une bille immobilisée dans un film de PVA (A)*

Nous observons que les déclins en présence de BM sont plus courts qu'en l'absence de quencher. Le BM en matrice PVA s'adsorbe sur les billes « carboxylate », et induit un effet d'extinction de la fluorescence des latex. Cependant, comme pour les billes « Orange 100 sulfate », les déclins en présence de BM sont différents de bille à bille. Nous interprétons ce fait par des inhomogénéités d'adsorption du BM à la surface des billes. Nous avons réalisé une analyse du temps au bout duquel l'intensité de fluorescence est multipliée par $1/e$ (le rapport signal sur bruit est là trop faible pour prétendre à de bons ajustements par une fonction multi-exponentielle).

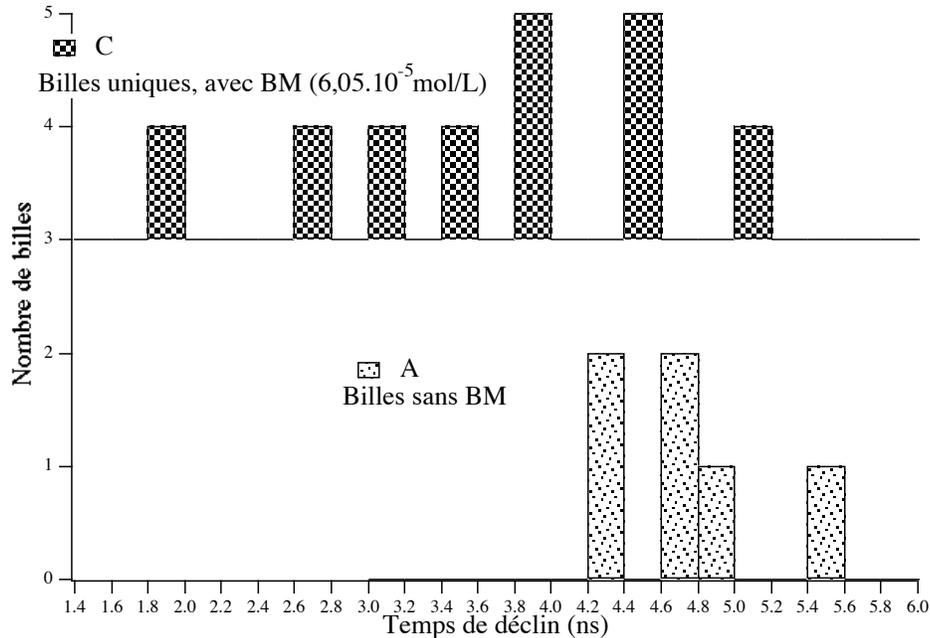


Figure IV.28. *Histogrammes du temps de déclin des billes « Orange 100 carboxylate » immobilisées dans une matrice de PVA, sans BM (A) et avec BM ($6,05 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). Les déclin sont tous caractérisés par le temps au bout duquel l'intensité de fluorescence a été multipliée par un facteur $1/e$.*

Le nombre de billes étudiées est trop faible pour en tirer de bonnes statistiques (figure IV.28.). Nous pouvons cependant dire qu'en présence de BM la distribution des temps de déclin ($3,4 \pm 1,3$ ns) est plus large qu'en l'absence de BM ($4,9 \pm 0,8$ ns).

Ces études sont préliminaires et demandent à être poursuivies plus avant.

IV.3. Conclusions

Nous avons étudié par microscopie confocale des billes de latex « Orange » de 100 nm de diamètre, isolées, immobilisées dans des films de PVA. Ces billes sont fonctionnalisées par des groupements sulfates, ou par des groupements carboxylates.

L'étude de l'ajout de PVA à une solution aqueuse de billes a montré que l'effet de celui-ci est nul en absence d'inhibiteur. En présence de BM, l'extinction de fluorescence est plus faible dans une solution de PVA que dans l'eau (le PVA gêne vraisemblablement l'adsorption du BM.). Néanmoins l'extinction de la fluorescence des billes par le BM existe toujours comme l'attestent les expériences de fluorescence stationnaire et résolue en temps.

Quel que soit le type de bille, en l'absence de BM, la réponse à une excitation lumineuse est identique de bille à bille. Les expériences avec le détecteur-imageur comme celles en microscopie confocale ont montré que les billes présentent peu d'hétérogénéités quant à leur fluorescence. De plus la réponse d'une bille individuelle n'est pas influencée par la matrice de PVA, le déclin est le même qu'en solution aqueuse. Ainsi une bille individuelle peut servir d'outil de calibration pour un microscope, puisque la mesure ne dépend pas de la bille choisie.

En présence de BM les déclins présentent une plus large distribution de temps de vie. Il semblerait que la quantité de BM adsorbé sur chaque bille ne soit pas la même. Des inhomogénéités de concentration en BM peuvent apparaître lors de la déposition du film. Lorsque l'eau est évacuée par « spin-coating » pour ne laisser que le PVA, le BM change de solvant et l'équilibre d'adsorption est sans doute modifié.

La réponse d'une bille est directement modulée par le nombre de molécules de quencher sur sa surface. En ce sens les billes sont des nano-capteurs et mettent en évidence des hétérogénéités de concentration en BM au sein des films de PVA. Nous pouvons espérer à l'avenir mesurer localement la concentration de BM autour d'une seule bille dans un film. Il faudrait pour cela obtenir un taux de comptage élevé pour analyser les déclins de la même façon qu'en solution.



V. Elaboration et études préliminaires de quelques nano-capteurs.

Nous avons montré au chapitre III qu'il est possible de construire un capteur à partir d'un support fluorescent (des billes de latex) et d'une molécule sonde (le Bleu de Méthylène). Nous avons montré qu'il est possible de détecter de manière ratiométrique la forme colorée i.e oxydée du Bleu de Méthylène.

Nous allons présenter dans ce chapitre des études portant sur le développement de capteurs reposant sur le même principe : l'interaction de billes de latex avec divers indicateurs ou molécules sondes. Dans un premier temps, pour réaliser un capteur de potentiel d'oxydo-réduction, nous absorberons du Cytochrome C sur les nanosphères. Nous en étudierons les effets sur les propriétés de fluorescence des billes.

Ensuite, nous développerons l'étude d'une porphyrine soluble dans l'eau : la 5,10,15,20-tétra(4-N-méthylpyridyl) porphyrine encore appelée tétra[4-(méthyl)(pyridinium)] porphyrine, synthétisée au laboratoire, en collaboration avec l'équipe de Claude Bied-Charreton. Cette tétraméthylpyridinium

porphyrine ou TMPyP peut être complexée par des ions métalliques tels le mercure(II), le zinc(II), le cadmium(II), le plomb(II) ou le cobalt(II).

Nous avons tout d'abord caractérisé les propriétés spectroscopiques de la TMPyP en interaction avec des ions métalliques dans l'eau, puis des études en matrice sol-gel et enfin adsorbée sur des latex. Nous ne présenterons ici que le travail en solution aqueuse et les études de TMPyP supportée sur les billes.

Toutes les études de ce chapitre portent sur les latex « Orange 40 carboxylate » car elles semblent présenter le meilleur effet d'antenne (Cf. §II.3). Elles ont donc potentiellement la meilleure amplification. De plus, le transfert d'énergie au BM est de loin le plus efficace, 95% aux forts de couverture (Cf. §III.4). La densité surfacique de charge est la plus élevée, et nous allons envisager par la suite des interactions électrostatiques entre surface et molécules sondes.

Les résultats présentés ici sont préliminaires. Nous tenons cependant à les évoquer car ils mettent en lumière certaines caractéristiques et propriétés des billes qui n'ont pas été obtenues jusqu'à présent. Les études réalisées ici permettent aussi d'explorer la modularité de l'approche proposée.

V.1. Essais d'élaboration de « Capteur Redox » : Interaction du Cytochrome C et des latex « Orange 40 carboxylate »

V.1.1. Présentation succincte du Cytochrome C

Les cytochromes sont des protéines essentielles de la respiration cellulaire. Le Cytochrome soluble le plus abondant de la mitochondrie est le Cytochrome C, où il sert de « navette » d'électron. C'est une protéine d'environ 14000 g.mol⁻¹ de poids moléculaire, associé à un hème C métallé par du fer¹⁴.

Nous présentons sur la figure V.1. la structure schématique de la protéine :

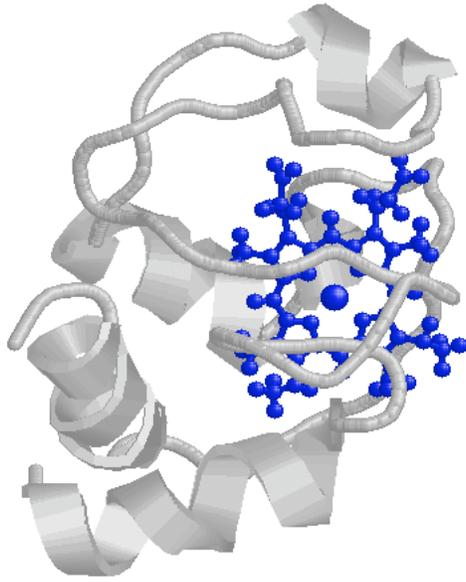


Figure V.1. *Vue schématique du Cytochrome C. En gris la chaîne polypeptidique, en noir l'hème C. (Structure PDB 1AKK) Il faut remarquer que l'hème est très exposé au solvant.*

Nous avons toujours travaillé en milieu tamponné, Tampon Hepes (pH=7,35 à 20°C). Le point isoélectrique du Cytochrome C est à pH=10,6¹⁴⁵. Ainsi à pH=7,35 il est sous forme cationique et susceptible de s'adsorber sur les billes que nous utilisons.

L'ion fer du Cytochrome peut passer rapidement et réversiblement de l'état oxydé à l'état réduit (c'est à dire du degré +III au degré +II). Le potentiel normal du Cytochrome C est de 0,25 V par rapport à l'E.N.H. à 20 °C¹⁴⁶. Nous présentons à la figure V.2. le spectre d'absorption du Cytochrome C dans sa forme dite oxydée, ainsi que celui du Cytochrome C dans sa forme réduite (nous avons utilisé le dithionite comme réducteur).

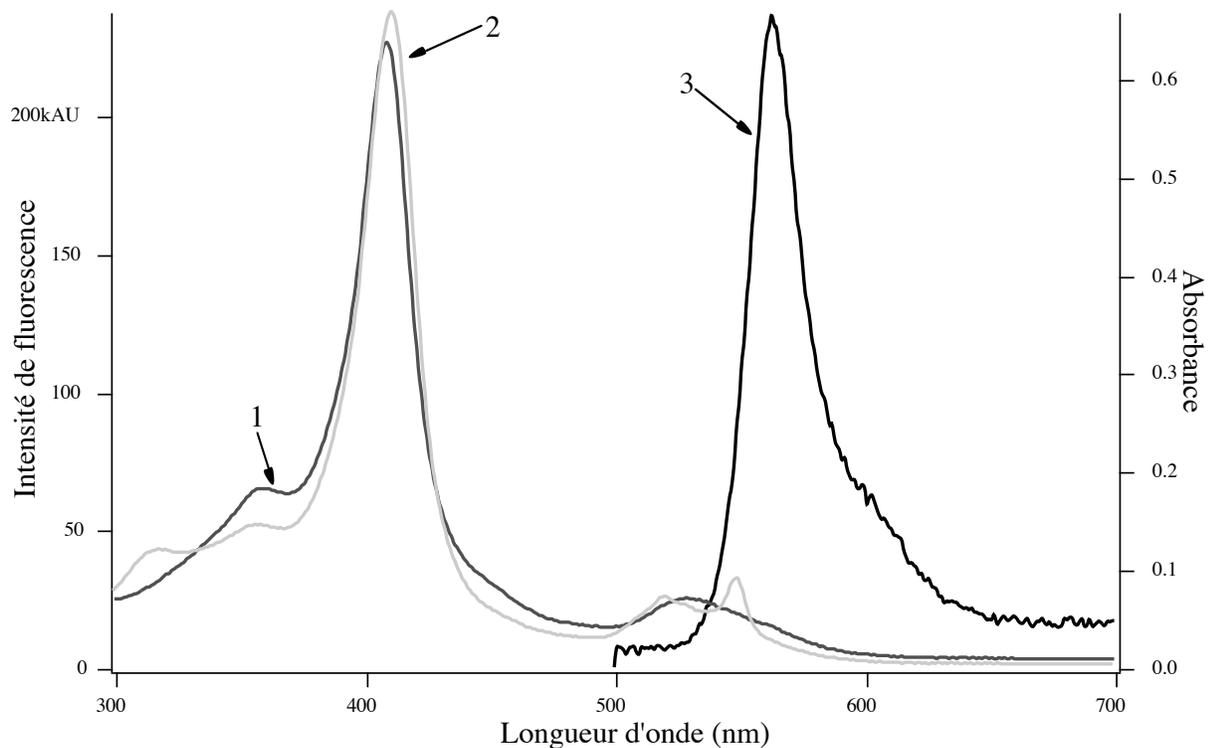


Figure V.2. **1)** Spectre d'absorption du Cytochrome C dans sa forme oxydée
2) Spectre d'absorption du Cytochrome C dans sa forme réduite
3) Spectre d'émission de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate »
 (Excitation 495 nm)

Le spectre d'absorption du Cytochrome C est sensible au degré d'oxydation du métal central. La réduction du fer amène en particulier l'apparition d'une bande à 549 nm. Le recouvrement avec le spectre d'émission de fluorescence change donc selon le degré d'oxydation. Il est légèrement plus grand avec le Cytochrome C réduit qu'avec le Cytochrome C oxydé. La distance de Förster entre les fluorophores des billes et le Cytochrome C oxydé a été évaluée à 3,80 nm, celle entre les chromophores des billes et le Cytochrome C réduit à 3,82 nm. Nous pouvons donc espérer obtenir un léger effet sur la fluorescence des billes selon le degré d'oxydation du Cytochrome C. Ce type d'effet a déjà été mis en oeuvre pour l'élaboration d'un capteur à monoxyde d'azote^{13,147}.

V.1.2. *Effet de l'adsorption du Cytochrome C sur l'émission de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate »*

Nous présentons sur la figure V.3. l'évolution du spectre d'émission de fluorescence d'une solution de latex ($1,8.10^{13}$ billes.L⁻¹) en présence de Cytochrome C :

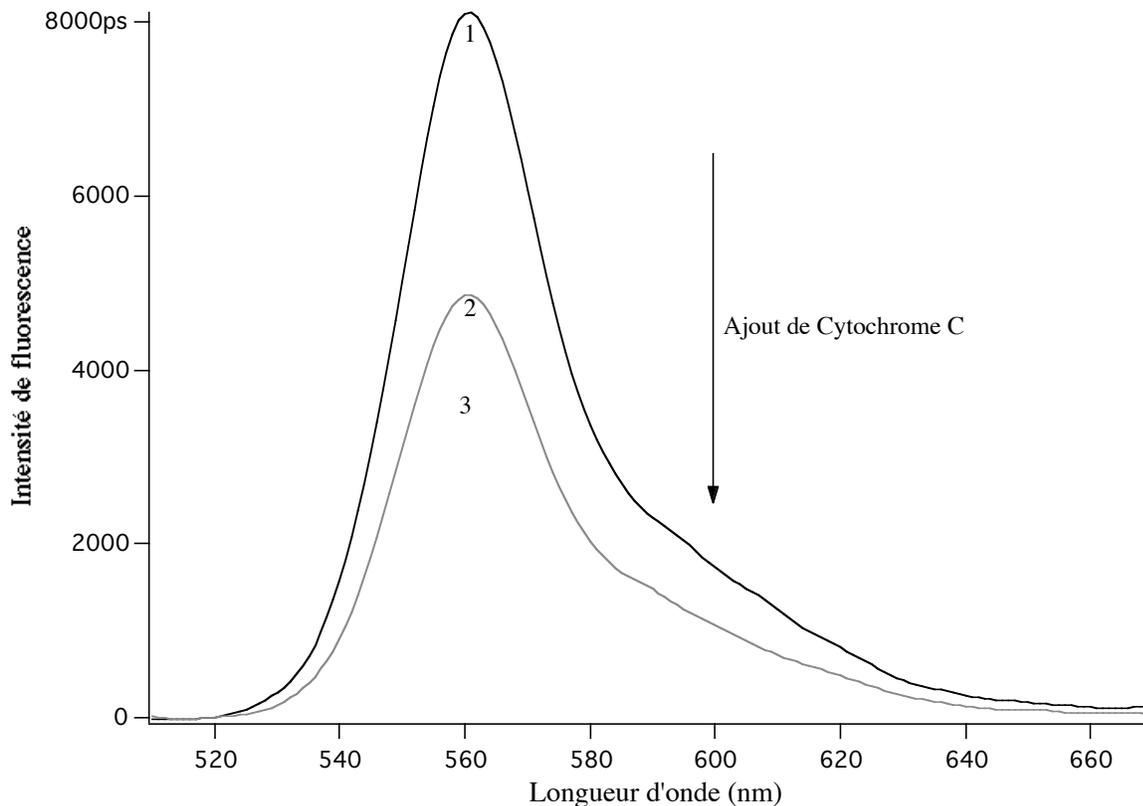


Figure V.3. *Spectres d'émission de fluorescence (Excitation : 495 nm)*
1) *Solution de latex « Orange 40 carboxylate » ($1,8.10^{13}$ billes.L⁻¹)*
2) *Latex « Orange 40 carboxylate » ($1,8.10^{13}$ billes.L⁻¹) et Cytochrome C ($1,5.10^7$ moles.m⁻²) soit 530 molécules pour une bille*
3) *Latex ($1,8.10^{13}$ billes.L⁻¹) et Cytochrome C ($2,9.10^7$ moles.m⁻²) soit 1060 molécules pour une bille*

Il y a extinction de la fluorescence des billes par le Cytochrome C. Nous ne connaissons pas la quantité de Cytochrome C adsorbé, aussi raisonnerons-nous sur le nombre total de moles par unité de surface. Nous présentons ci-dessous le tracé de Stern-Volmer :

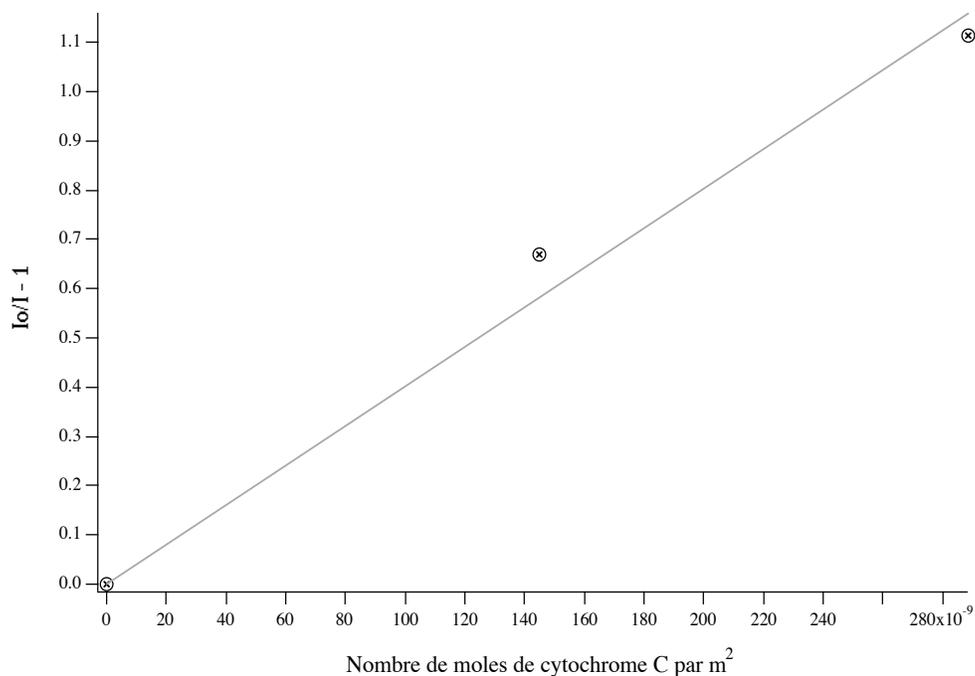


Figure V.4. *Tracé de Stern-Volmer lorsque les latex « Orange 40 carboxylate » sont mis en présence de Cytochrome C.*

L'ajustement par une droite du tracé de Stern-Volmer nous donne la constante : $4 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. Une telle corrélation linéaire montre que tous les fluorophores sont sensibles à l'effet d'extinction par le Cytochrome C.

Afin de mieux caractériser le système nous avons étudié des échantillons de viscosité croissante (Figure V.5). Nous avons utilisé pour cela des solutions aqueuses de saccharose. Les concentrations en Cytochrome C sont identiques à celles présentées plus haut. Nous notons η la viscosité intrinsèque de l'eau, et η_r la viscosité relative à celle de l'eau pour les solutions de saccharose.

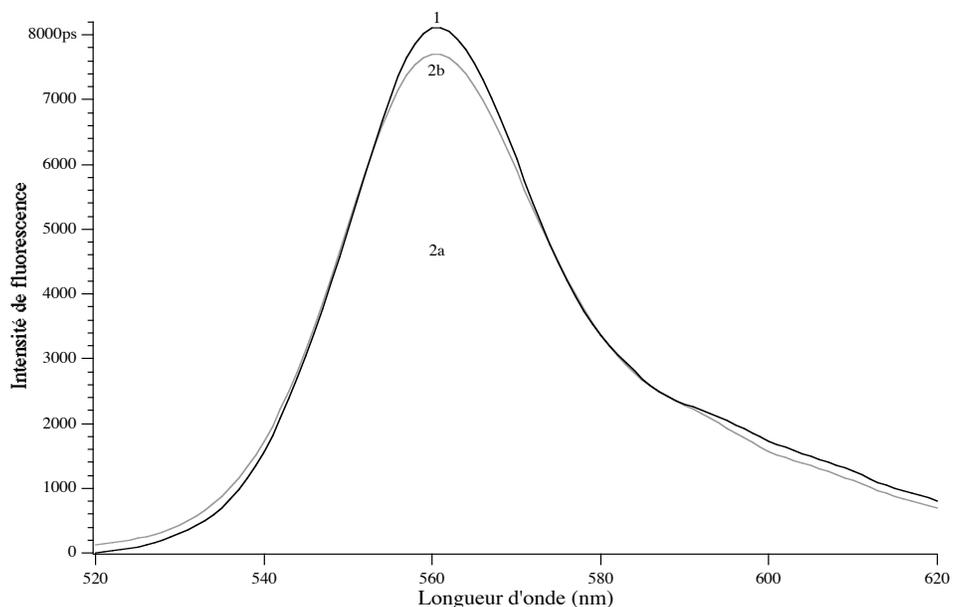


Figure V.5. Spectres d'émission de fluorescence (Excitation : 495 nm)
1) Solution de latex « Orange 40 carboxylate » ($1,8.10^{13}$ billes. L^{-1})
2a) Latex ($1,8.10^{13}$ billes. L^{-1}) Cytochrome C ($1,5.10^{-7}$ moles. m^{-2}) dans l'eau ($\eta=0,891$ cP)
2b) Latex ($1,8.10^{13}$ billes. L^{-1}) et Cytochrome C ($1,5.10^{-7}$ moles. m^{-2}) dans une solution de saccharose ($\eta_r=6$)

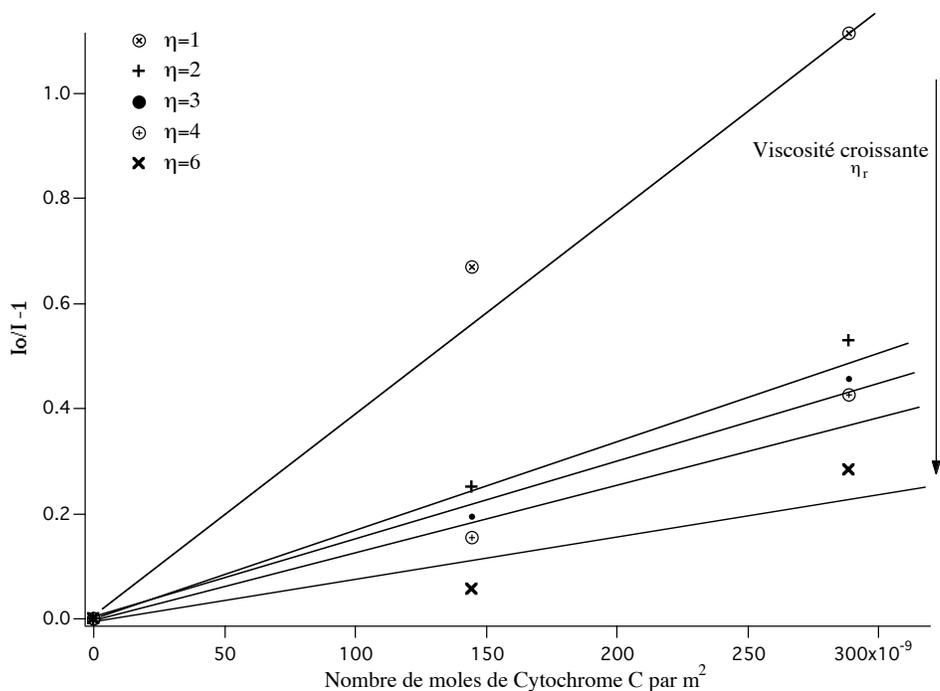


Figure V.6. Tracé de Stern-Volmer pour différentes viscosités, lorsque les latex sont en présence de Cytochrome C. De haut en bas : Eau - Solutions de saccharose $\eta_r=2$ - $\eta_r=3$ - $\eta_r=4$ - $\eta_r=6$

A la différence du BM, l'extinction dépend de la viscosité. Nous pouvons remarquer une restauration de la fluorescence du latex avec l'augmentation de la viscosité. Ce phénomène est mis en exergue par le tracé de Stern-Volmer, figure V.6.

Les tracés de Stern-Volmer peuvent être ajustés par des droites de pente K_{SV} , les résultats à +/- 10 % suivants sont obtenus :

Viscosité relative η_r	1	2	3	4	6
K_{SV} ($m^2 \cdot mol^{-1}$)	$4 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	$8,7 \cdot 10^5$

Tableau V.1. Synthèse des ajustements de Stern-Volmer pour différentes viscosités.

L'effet de l'ajout de saccharose ne peut pas être un effet de constante diélectrique sur l'équilibre d'adsorption. En effet un abaissement de la constante diélectrique augmente les forces électrostatiques, ce qui devrait provoquer une condensation du Cytochrome C sur les latex, et une augmentation de l'extinction de fluorescence des billes. Or nous observons l'inverse.

Nous pouvons essayer d'estimer l'influence de la diffusion du Cytochrome C de la solution vers la surface. La vitesse d'extinction de la fluorescence v_q s'exprime comme :

$$v_q = k * [CytoC] * [BDY^*] \quad (\text{V.1})$$

où k est la constante de vitesse d'extinction, $[CytoC]$ la concentration en cytochrome C, et $[BDY^*]$ la concentration en fluorophores à l'état excité. La protéine est en large excès par rapport au nombre de fluorophores excités, il y a donc dégénérescence de l'ordre, et nous pouvons écrire :

$$v_q = k' * [BDY^*] \quad \text{avec } k' = k * [CytoC] \quad (\text{V.2})$$

k' est la constante de vitesse apparente.

Or nous avons montré (figure V.6) que :

$$\frac{I_0}{I} - 1 = \bar{\tau} * k' * [CytoC] \quad (\text{V.3})$$

$$\text{Donc } \left(\frac{I_0}{I} - 1\right) * \frac{1}{\bar{\tau}} = k' \quad (\text{V.4})$$

où $\bar{\tau}$ est la durée de vie moyenne sans quencher (définie au chapitre II, tableau II.13 $\bar{\tau} = 5,59$ ns).

Si nous faisons l'hypothèse que l'extinction est contrôlée par la diffusion du Cytochrome C de la solution vers la surface, et si nous supposons que tout choc de la protéine avec la surface se fait avec un fluorophore à l'état excité et que ce choc est efficace, nous pouvons écrire que :

$$k = k_{\text{dif}} \quad (\text{V.5})$$

où k est la constante de vitesse d'extinction, et k' la constante de vitesse de diffusion du Cytochrome vers la surface. Or la constante de vitesse de diffusion peut s'exprimer comme¹⁴⁰ :

$$k_{\text{dif}} = \frac{2}{3} * R * T * \frac{R_{\text{bille}}}{R_{\text{CytoC}}} * \frac{1}{\eta} \quad (\text{V.6})$$

où R est la constante des gaz parfaits, T est la température, R_{CytoC} le rayon du Cytochrome (pris égal à 1,3 nm), R_{bille} est la rayon de la surface réactive du latex (nous l'avons pris égal au rayon de la bille), η est la viscosité.

D'après les expressions (V.4), (V.5) et (V.6) nous pouvons écrire que :

$$\left(\frac{I_0}{I} - 1\right) * \frac{1}{\tau} = \frac{2}{3} * R * T * \frac{R_{\text{bille}}}{R_{\text{CytoC}}} * [\text{CytoC}] * \frac{1}{\eta} \quad (\text{V.7})$$

Nous pouvons à partir des résultats expérimentaux tracer $\left(\frac{I_0}{I} - 1\right) * \frac{1}{\tau}$ i.e la constante de vitesse apparente en fonction de $1/\eta$ (figure V.7) :

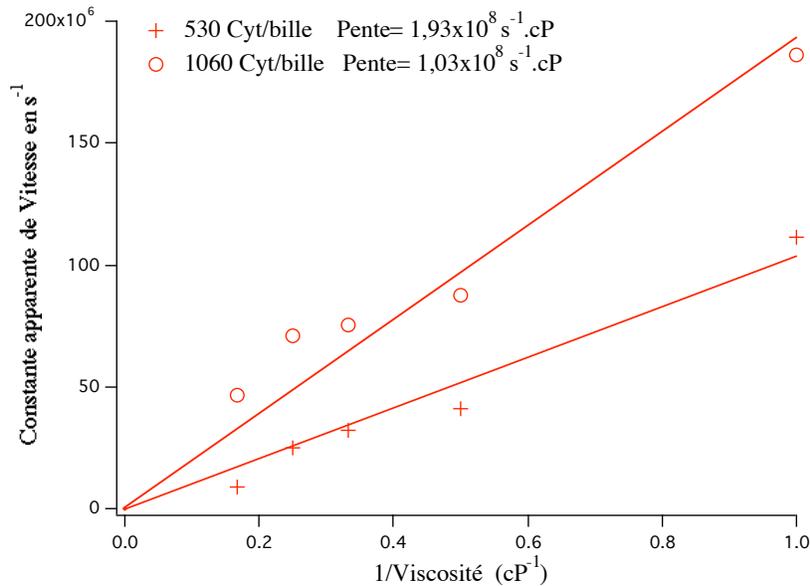


Figure V.7. Evolution de la constante de vitesse apparente d'extinction en fonction de l'inverse de la viscosité.

La corrélation entre la constante de vitesse apparente et l'inverse de la viscosité est bien linéaire. Nous avons pu évaluer les pentes en fonction de la quantité de cytochrome qui sont proportionnelles à la quantité de protéine. Ceci est en accord avec l'expression (V.7).

Si nous calculons par ailleurs $\frac{2}{3} * R * T * \frac{R_{\text{bille}}}{R_{\text{CytoC}}} * [\text{CytoC}]$ i.e la pente pour une concentration de cytochrome à $1,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ (concentration équivalente à 530 protéines par bille) nous trouvons

0.44 s⁻¹.cP. Cette valeur n'est pas en accord avec la pente issue de l'ajustement linéaire. Il y a plusieurs ordres de grandeur de différence. Manifestement la vitesse d'extinction dépend de la viscosité mais il ne peut s'agir de la diffusion du Cytochrome C vers la surface.

Si maintenant nous envisageons la rotation du Cytochrome sur lui-même pour présenter sa face réactive vers le latex, la constante de vitesse est proportionnelle au temps de corrélation rotationnel et à la fraction de surface couverte :

$$k' \propto \frac{k^* T}{\eta^* V} * \theta \text{ (V.8)}$$

L'évaluation de $\frac{k^* T}{V}$ donne 4.10⁸ s⁻¹.cP, comme le taux de couverture varie entre 0,1 et 1, l'expression (V.8) de la constante de vitesse apparente est en accord avec les valeurs des pentes de l'ajustement de la figure V.7. Il semblerait donc que la sensibilité de l'extinction à la viscosité provienne de la mobilité du Cytochrome C sur la surface du latex. La rotation de la protéine sur elle-même est envisageable.

V.1.3. *Effet de l'adsorption du Cytochrome C sur le déclin de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate »*

Nous présentons maintenant les déclins de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate » en présence de Cytochrome C, ces déclins ont été obtenus avec le montage décrit dans l'annexe B.

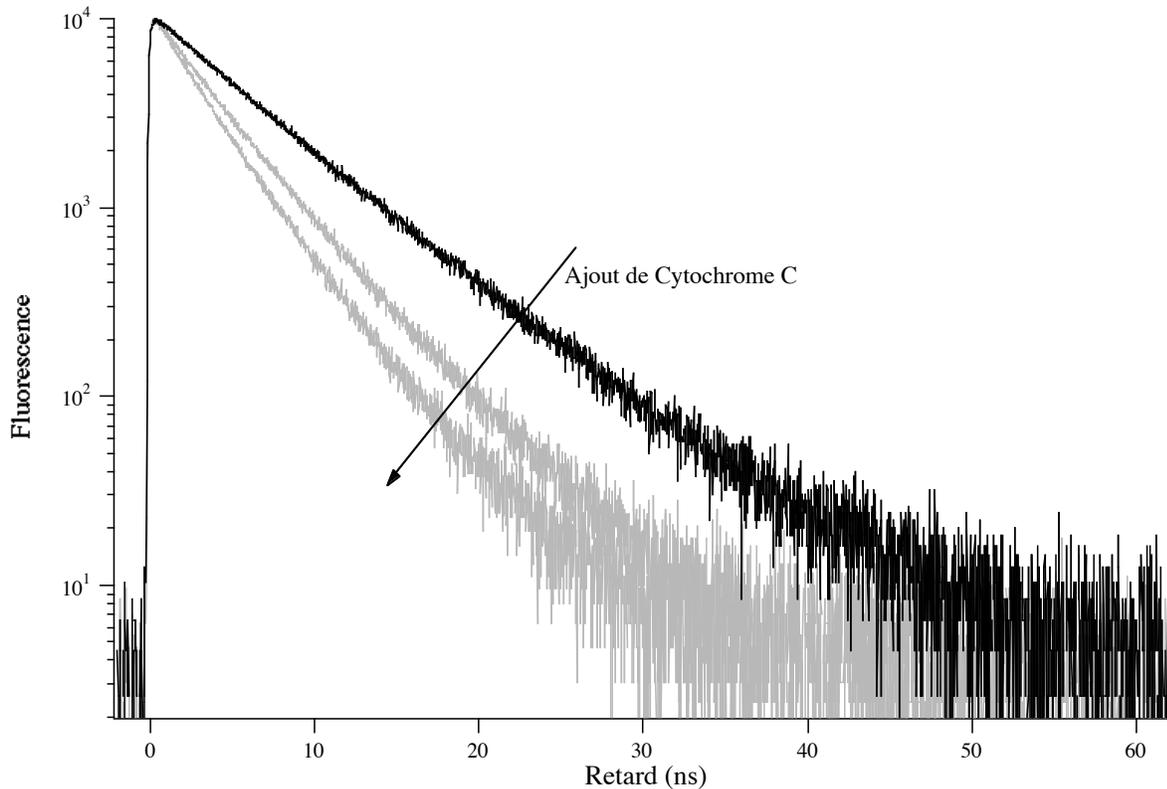


Figure V.8. *Evolution du déclin de fluorescence d'une solution de latex « Orange 40 carboxylate » avec l'ajout de quantités croissantes de Cytochrome C. Selon le sens de la flèche, sont représentés les déclins sans protéine, puis avec Cytochrome C : $9.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$ - $1,7.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$ - $2,4.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$ - $3.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$ - $3,6.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$ - $5,8.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$*

Nous observons un déclin d'autant plus rapide que la quantité totale de Cytochrome C est élevée. Nous avons exploré de 30 à 215 molécules pour une bille. Les déclins sont plus simples que dans le cas du Bleu de Méthylène : un ajustement par une fonction bi-exponentielle est satisfaisant. Les deux composantes sont affectées par l'extinction par le Cytochrome C. Cependant pour des raisons de cohérence, nous présentons ici l'évolution de la constante de vitesse moyenne (Cf. § III.4) en fonction du nombre total de protéine par unité de surface. En effet nous ne disposons pas de la quantité de Cytochrome effectivement adsorbé.

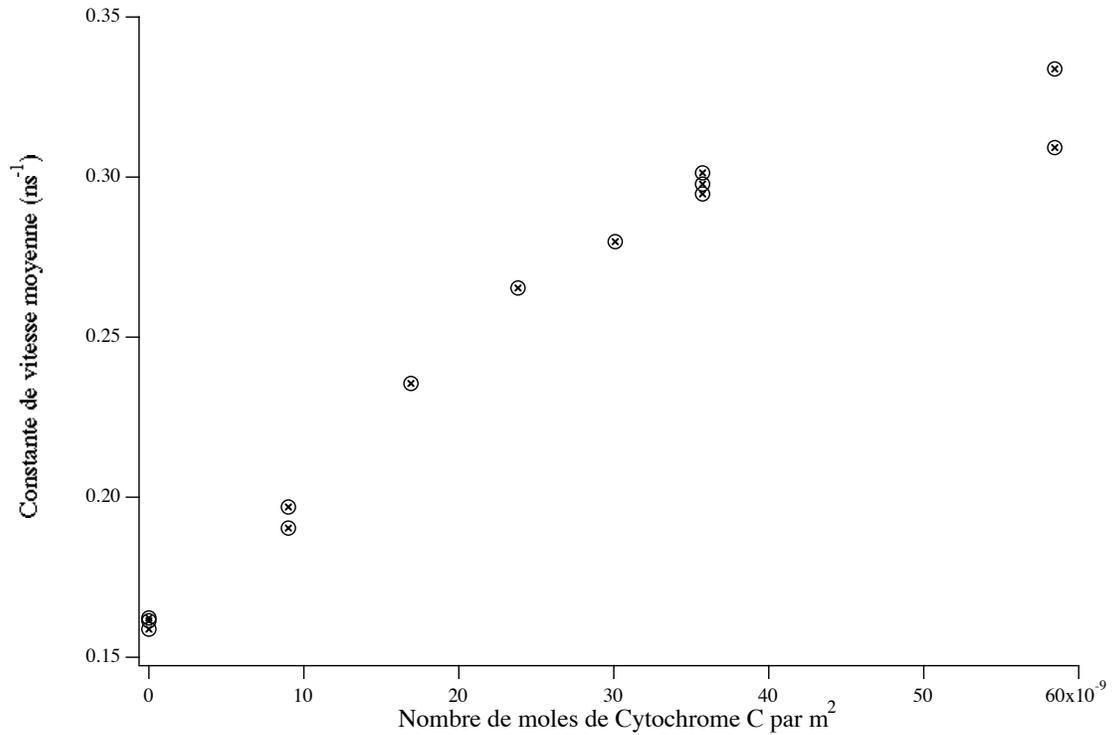


Figure V.9. *Evolution de la constante de vitesse moyenne avec le nombre de protéine par mètre carré.*

L'évolution de cette constante de vitesse est tout d'abord linéaire avec la quantité de Cytochrome C. La pente a été évaluée à $4.10^6 \pm 10^5 \text{ ns.m}^2.\text{mol}^{-1}$. Si le rayon du Cytochrome C est estimé autour de 1,3 nm, le taux de couverture géométrique maximum devrait se situer autour de 1050 protéines par bille. La constante de vitesse moyenne semble cependant atteindre un plateau dès 200 molécules par bille.

L'efficacité du transfert (Cf. § III.4) a été évaluée :

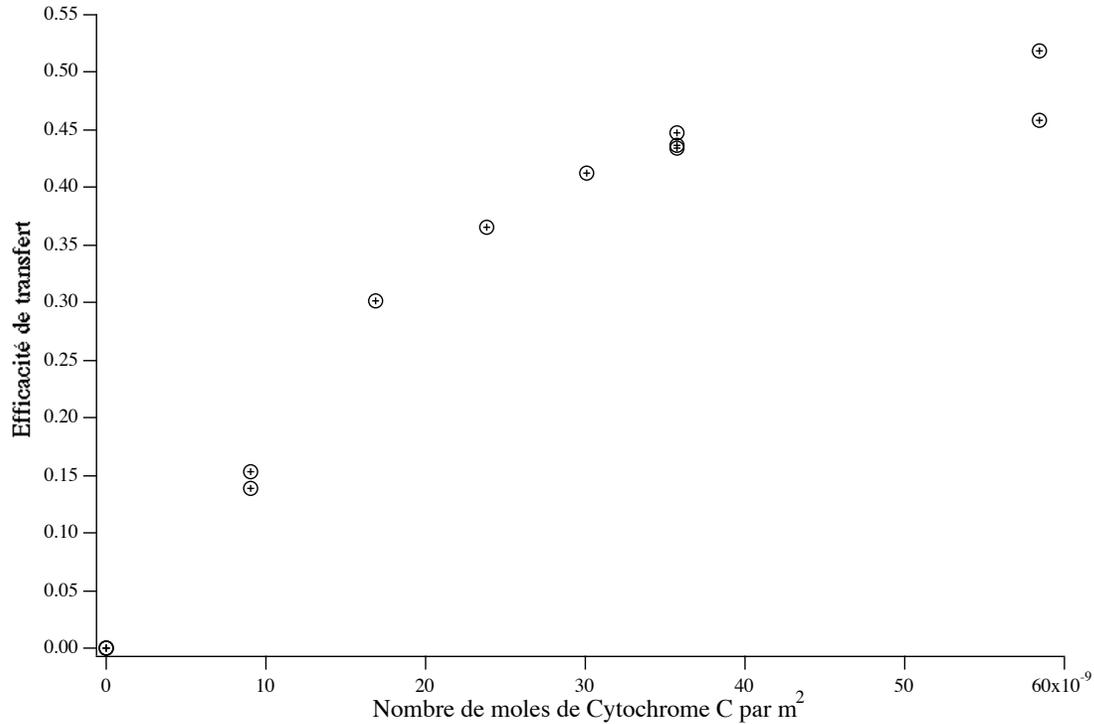


Figure V.10. *Evolution de l'efficacité de transfert avec la quantité de Cytochrome C.*

L'efficacité est relativement satisfaisante puisque dès que le rapport du nombre de molécules sur le nombre de billes est de l'ordre de 20 l'efficacité de transfert atteint 10 %. Il semblerait qu'il existe aussi un plateau à 50 % lorsqu'il y a quelques centaines de molécules de Cytochrome C pour une bille. Ce seuil d'efficacité de transfert est identique à celui observé pour la constante de vitesse moyenne. Ce plateau pourrait correspondre à la saturation effective en Cytochrome de la surface. D'éventuelles interactions électrostatiques entre protéines pourraient empêcher d'atteindre le taux de couverture surfacique maximal (1050 molécules par bille).

Nous avons examiné là encore l'effet de la viscosité (figure V.11.). Lorsque la viscosité augmente le déclin est plus lent. Ceci est en accord avec les observations faites lors des expériences d'émission de fluorescence stationnaire.

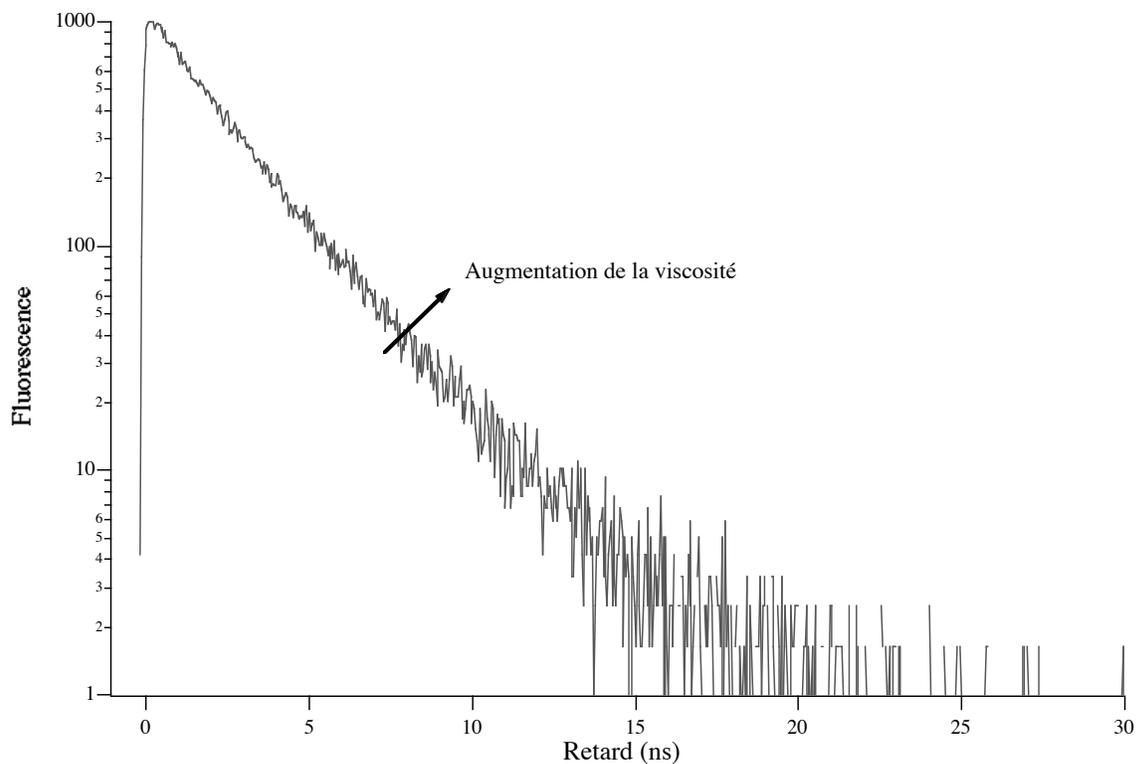


Figure V.11. *Effet de la viscosité sur le déclin de fluorescence de latex «Orange 40 carboxylate » en présence de Cytochrome C ($1,5 \cdot 10^{-7}$ moles. m^{-2})*

Nous avons de façon préliminaire fait des essais de réduction du fer du cytochrome C. Les déclin correspondants sont donnés sur la figure V.12. Nous observons une différence de comportement entre la forme réduite et la forme oxydée. Le déclin est en effet plus rapide lorsque les billes sont en présence de Cytochrome C ferreux.

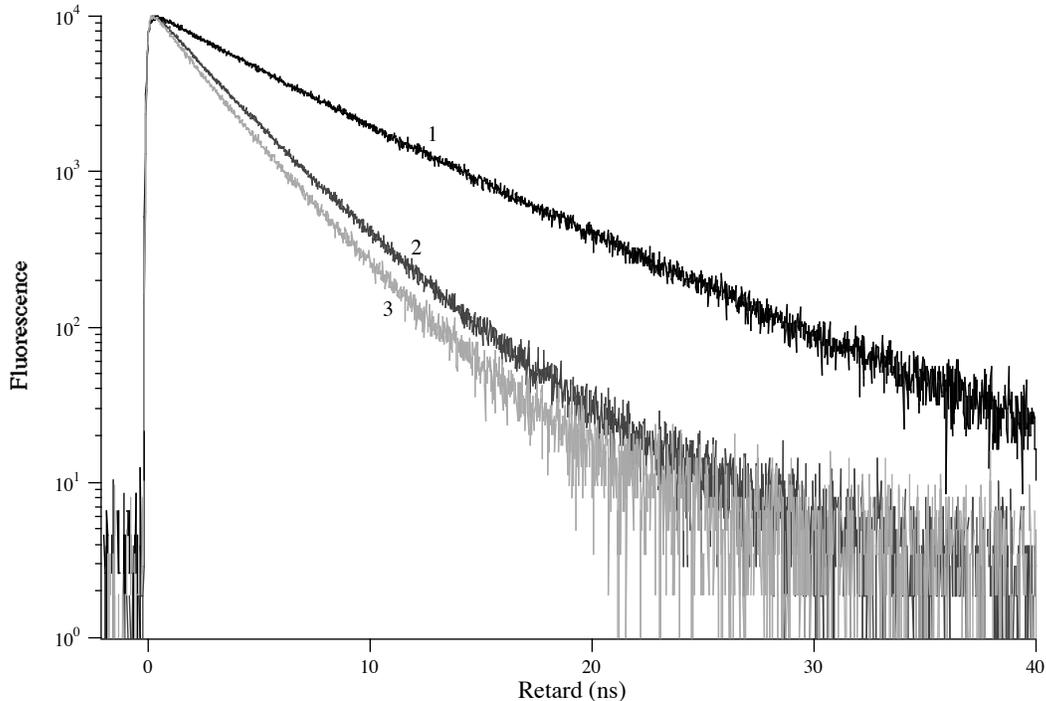


Figure V.12. *Déclins de fluorescence d'un échantillon de latex « Orange 40 carboxylate » -
Excitation : 495 nm
1) Latex seuls ($1,8 \cdot 10^{13}$ billes.L⁻¹)
2) Latex et Cytochrome C ($5,8 \cdot 10^{-8}$ mol.m⁻²)
3) Latex et Cytochrome C ($5,8 \cdot 10^{-8}$ mol.m⁻²) et dithionite en excès*

Conclusions :

La protéine est sans doute trop volumineuse et hydrophile pour pénétrer dans la chevelure, contrairement au BM. Elle reste adsorbée en surface où la viscosité peut modifier ses mouvements. Dans le cas du BM, aucun effet de la viscosité n'a été observé car la molécule est certainement « enfouie » dans les brins de chevelure (Cf. Chapitre III).

La fluorescence du capteur dépend de la quantité et de l'état d'oxydation du Cytochrome C. Sachant que le potentiel d'oxydo-réduction du couple est de 0,25 V par rapport à l'E.N.H. nous obtenons un système sensible aux modifications de potentiels redox dans la gamme accessible aux milieux biologiques.

V.2. *Capteurs de métaux lourds : interaction de la TMPyP avec les latex « Orange 40 carboxylate ».*

V.2.1. *Problématique et présentation d'une porphyrine hydrosoluble pour la détection de métaux lourds.*

La pollution par les métaux lourds (zinc, cadmium, mercure, plomb) est un problème crucial pour la chimie de l'environnement. Le mercure dégage des vapeurs très toxiques menant à des empoisonnements. Certains sels de mercure sont des toxiques violents (HgCl_2 , oxydes de mercure ...). L'ion méthylmercure a causé la catastrophe de Minamata au Japon¹⁴⁸. Le plomb, longtemps utilisé dans les pigments de peinture, les canalisations, est à l'origine d'une maladie connue sous le nom de « saturnisme », le plomb et tous ses dérivés sont vénéneux : ils se fixent dans les os, provoquent des anémies, des troubles de la vue et attaquent les centres nerveux¹⁴⁸. Le cadmium, ses dérivés minéraux et organiques sont hautement toxiques : ils peuvent provoquer de graves déshydratations de l'organisme, des oedèmes, certains sont cancérogènes¹⁴⁸. Les taux limites autorisés par la législation française sont de l'ordre de $0,2 \text{ mg.m}^{-3}$.

La spectrométrie de masse ou celle d'absorption de flamme sont des méthodes courantes pour doser de façon quantitative et de manière sélective les métaux lourds¹⁴⁹. D'autres méthodes de dosage¹⁵⁰, s'appuyant sur les propriétés d'absorption ou de fluorescence des porphyrines non métallées ont été proposées^{151,152,153}. H.J. Ache et son équipe ont en particulier étudié la métallation en solution de la tétra[4-(sulfonate)(phényl)]porphyrine par des ions métalliques tel le mercure(II) et le cadmium(II). Ils aussi ont réalisé ces études dans des polymères¹⁵⁴, des membranes Nafion¹⁵⁵ et dans des matrices sol-gels¹⁵⁶. Le seuil de détection se situe autour de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Les travaux de David Delmarre et Claude Bied-Charreton^{19,157,158} ont porté sur l'incorporation de porphyrines dans des matériaux sol-gel en vue de détecter des polluants.

Les porphyrines ont été choisies comme molécules sondes car leurs propriétés physico-chimiques sont très sensibles aux modifications apportées à la répartition électronique du site aromatique. Nous avons travaillé avec une porphyrine hydrosoluble et non métallée : la tétra[4-(méthyl)(pyridinium)] porphyrine.

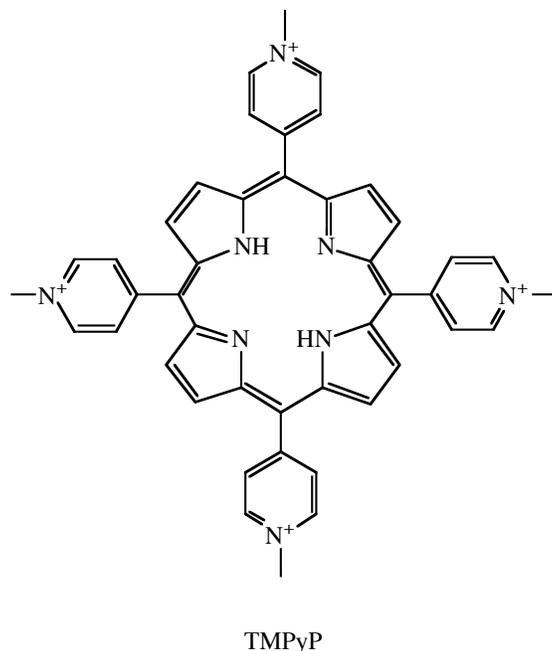


Figure V.13 Structure de la tétra[4-(méthyl)(pyridinium)] porphyrine (TmPyP).
En solution les contre-ions sont des chlorures.

Cette porphyrine est chargée positivement, ce qui nous permettra de l'adsorber à la surface des latex. Les pK_a des azotes centraux sont $pK_{a1}=2$ et $pK_{a2}=0,8$. Dans l'eau la TmPyP sera sous la forme présentée à la figure V.13. dite base libre. L'avantage de la TmPyP par rapport à d'autres molécules de la même famille est sa solubilité dans l'eau. Cela nous évite ainsi de travailler dans des solvants organiques qui rendraient l'utilisation des billes de latex difficile.

La TmPyP peut être complexée par des ions métalliques comme Hg^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} . Nous avons déterminé les constantes de complexation en solution aqueuse par différentes méthodes spectroscopiques : absorption, fluorescences stationnaire et résolue en temps. Ces trois techniques nous ont également permis d'étudier la complexation d'ions par des porphyrines immobilisées sur des billes de latex.

V.2.2. Etude en solution de la complexation de la TmPyP par des sels de métaux lourds.

Nous nous sommes essentiellement intéressés à trois ions : Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} 157.

Nous pouvons écrire l'équilibre de complexation sous la forme :

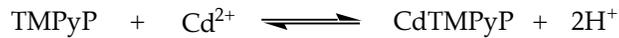


où K est la constante apparente de complexation, les activités sont assimilées à des concentrations car nous travaillons en conditions suffisamment diluées.

Nous allons tout d'abord présenter les résultats de complexation avec l'ion Cd^{2+} , puis nous nous intéresserons à l'ion Pb^{2+} et enfin à l'ion Hg^{2+} . Tous les dosages ont été effectués en tampon phosphate $\text{pH}=7,2$ (Aldrich Chemicals).

V.2.2.1. Etude de la complexation de la TMPyP par les ions cadmium (II)

Nous allons étudier l'équilibre suivant :



défini avec la constante de complexation K_1 :

$$K_1 = \frac{[\text{Cd-TMPyP}] \cdot [\text{H}^+]^2}{[\text{Cd}^{2+}] \cdot [\text{TMPyP}]} \quad (\text{V.9})$$

V.2.2.1.A. Spectroscopie d'absorption.

Nous présentons à la figure V.14. les variations du spectre d'absorption de la TMPyP avec l'addition d'acétate de cadmium.

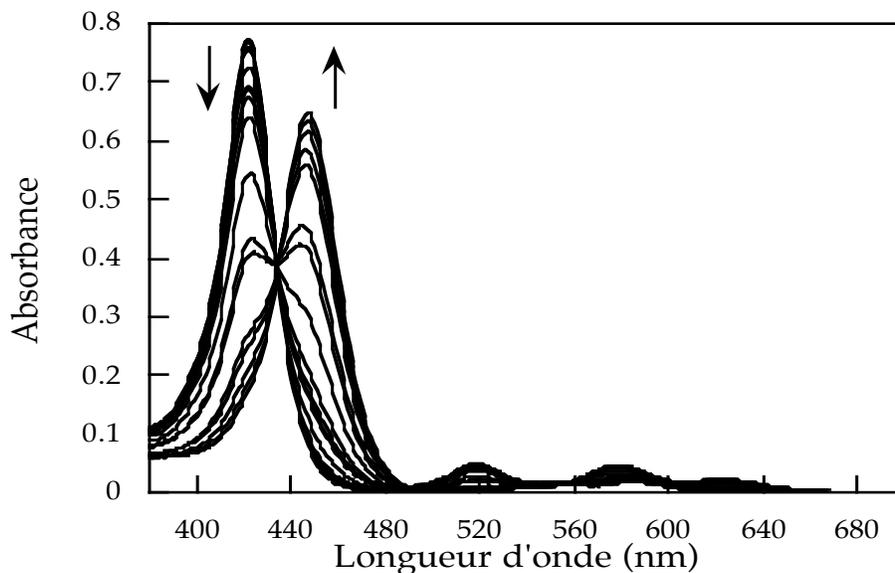


Figure V.14 Variations du spectre d'absorption d'une solution $3,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de TMPyP au cours de l'addition d'acétate de cadmium dont les concentrations sont comprises entre $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ et $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

L'ajout croissant d'ions cadmium induit la disparition de la bande à 422 nm correspondant à la porphyrine non métallée et l'apparition d'une bande à 447 nm qui correspond à la porphyrine métallée par le cadmium. Il est possible par traitement mathématique de connaître la quantité de porphyrine métallée et non métallée suivant la concentration en cadmium ajoutée. Pour cela il suffit de décomposer chaque courbe comme la superposition de deux courbes de référence qui correspondent à deux espèces distinctes. La première courbe de référence choisie correspond au spectre de la porphyrine non métallée et la seconde au spectre de la porphyrine complètement

métallée par le cadmium. Cette méthode dite de « Décomposition en Composantes Connues » a été implantée au laboratoire par R.B. Pansu (Cf. Annexe E).

Nous présentons à la figure V.15. les résultats du traitement par « Décomposition en Composantes Connues » des spectres d'absorption :

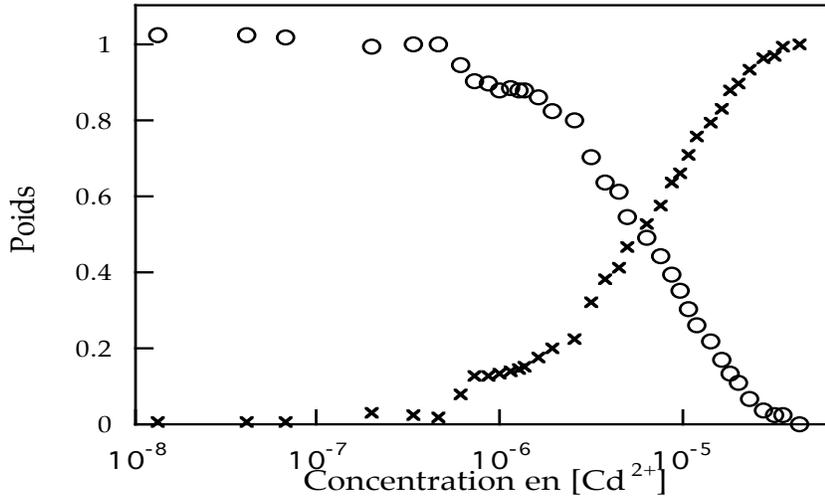


Figure V.15 Variation du poids de chaque composante en fonction de la concentration totale en cadmium.

En se plaçant au point d'intersection des deux courbes nous pouvons écrire :

$$[\text{TMPyP}] = [\text{CdTMPyP}] \quad (\text{V.10})$$

Or la constante de complexation s'écrit :

$$K_1 = \frac{[\text{Cd-TMPyP}] * [\text{H}^+]^2}{([\text{Cd}^{2+}] * [\text{TMPyP}])} \quad (\text{V.11})$$

Ainsi au point d'intersection, nous pouvons écrire :

$$K_1 = [\text{H}^+]^2 / [\text{Cd}^{2+}] \quad (\text{V.12})$$

Sachant que nous travaillons en milieu tamponné, nous connaissons la concentration en protons. Connaissant la concentration totale d'ions cadmium(II) $[\text{Cd}]_{\text{tot}}$, la concentration initiale de TMPyP $[\text{TMPyP}]_0$, en appliquant les lois de conservations de la matière ainsi que l'équation (V.5) nous pouvons écrire :

$$[\text{Cd}^{2+}] = [\text{Cd}^{2+}]_{\text{tot}} - [\text{TMPyP}]_0 \quad (\text{V.13})$$

Nous trouvons alors $K_1 = 5,7 \cdot 10^{-6}$. Cela permet de calculer la constante de complexation apparente, sachant que nous travaillons en milieu tamponné (pH=6) : $K'_1 = 1 / [\text{Cd}^{2+}]$ soit $\mathbf{pK'_1 = 5,25}$.

Nous avons montré ici qu'il est possible, par métallation de la TMPyP, de détecter des ions cadmium(II) dans un intervalle de 10^{-6} à 10^{-4} mol.L⁻¹.

Nous allons maintenant étudier les spectres d'émission de fluorescence de solution de TMPyP en présence d'ions cadmium(II).

V.2.2.1.B. Spectroscopie d'émission de fluorescence stationnaire.

Nous présentons sur la figure V.16. les variations du spectre d'émission de fluorescence d'une solution de TMPyP à 7.10^{-7} mol.L⁻¹, exposée à l'addition croissante d'ions Cd²⁺. L'excitation a été fixée à 433 nm.

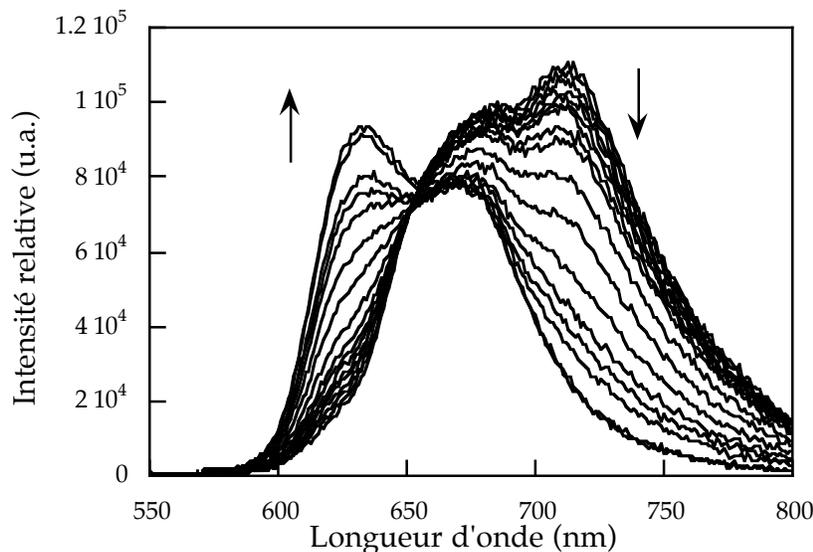


Figure V.16. Variations du spectre d'émission de fluorescence suivant l'ajout de quantités croissantes d'acétate de cadmium dont la concentration est comprise entre 10^{-9} mol.L⁻¹ et 10^{-2} mol.L⁻¹. Excitation 433 nm.

Nous observons la disparition de la bande à 720 nm ainsi que celle à 670 nm, mais dans une moindre mesure. Il y a, de plus, apparition d'une bande à 620 nm. La bande à 720 nm est caractéristique de la TMPyP base libre. Au fur et à mesure que celle-ci est complexée par les ions cadmium(II) cette bande diminue. La bande à 620 nm est caractéristique de la porphyrine métallée¹⁵⁹. La bande à 670 nm est commune aux deux formes de la porphyrine.

Nous pouvons appliquer ici le traitement par « Décompositions en Composantes Connues », nous obtenons alors :

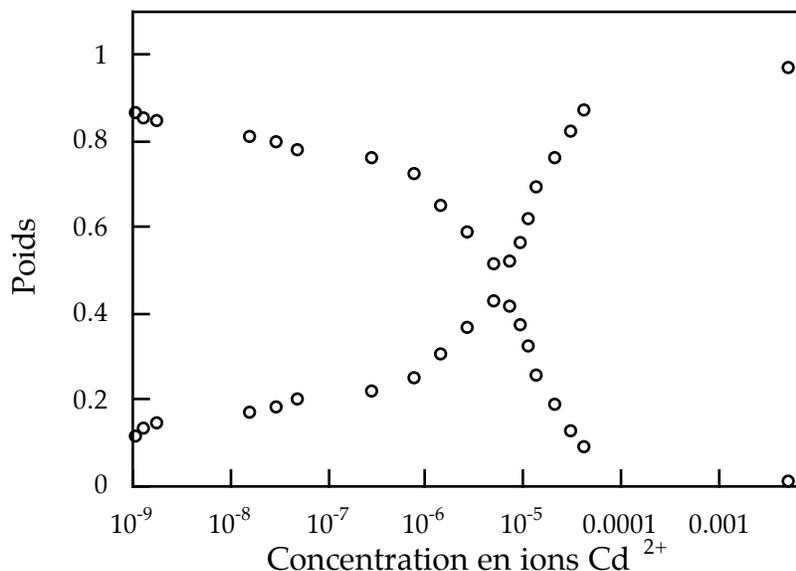


Figure V.17. Variation du poids de chaque composante suivant la quantité de cadmium ajoutée.

Il faut tout d'abord remarquer que la gamme de concentration accessible est plus étendue en émission de fluorescence qu'en absorption : de 10^{-8} mol.L⁻¹ à 10^{-4} mol.L⁻¹ d'ions cadmium(II). Le point d'équivalence (intersection) se situe à la même concentration que pour les expériences d'absorption. En travaillant en absorption et en fluorescence à des concentrations différentes de porphyrine, nous avons pu montrer que le point d'équivalence ne dépend pas de la concentration en TMPyP. Ainsi le complexe formé avec le cadmium(II) est de stoechiométrie 1-1.

Nous pouvons, à l'aide des calculs effectués précédemment, nous placer à l'intersection des deux courbes et déterminer la constante de complexation apparente. Nous trouvons $\mathbf{pK'_1=5,2}$. Ce résultat est en parfait accord avec celui trouvé en spectroscopie d'absorption.

Après avoir étudié les propriétés de fluorescence stationnaire, nous allons maintenant nous intéresser aux déclins de fluorescence de solution de TMPyP en présence d'ions cadmium (II).

V.2.2.1.C. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps.

Le montage utilisé pour cette étude est décrit dans l'annexe B. La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 433 nm et celle d'émission à 710 nm. Nous avons ajouté à une solution de TMPyP ($7 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹) des quantités croissantes d'acétate de cadmium. Nous présentons sur la figure V.18. l'évolution des déclins de fluorescence en fonction de la concentration d'ions Cd^{2+} .

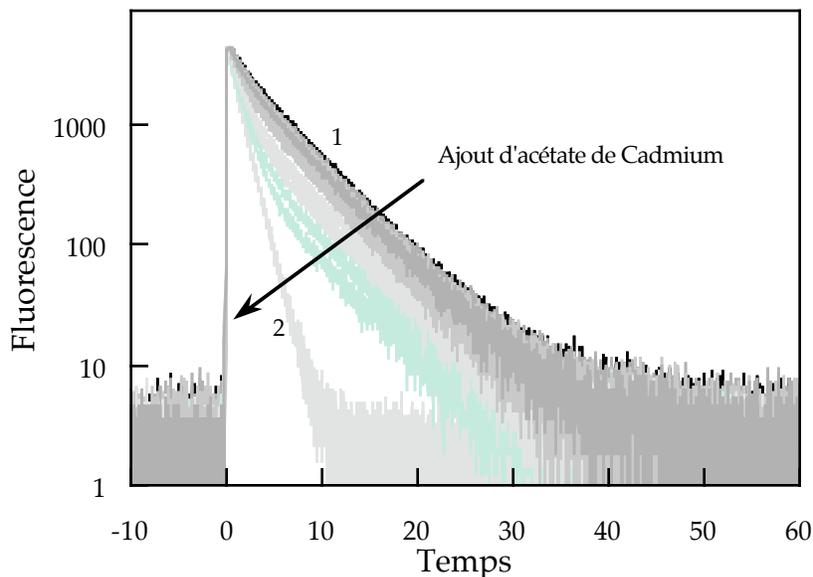


Figure V.18. *Evolution des déclin de fluorescence d'une solution de TMPyP à $7.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$
Excitation=433 nm, Emission=710 nm
(1) déclin initial, (2) $[\text{Cd}^{2+}] = 5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.*

Nous pouvons constater que le déclin de fluorescence devient de plus en plus rapide au fur et à mesure de l'ajout d'ions cadmium(II). Le déclin de la TMPyP seule en solution peut être ajusté par une fonction mono-exponentielle (déclin 1), avec une durée de vie de 13,2 ns. Le déclin (2) peut être aussi ajusté par une fonction mono-exponentielle, avec une durée de vie de 1,2 ns. A une concentration de $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ en cadmium(II), la porphyrine est totalement métallée. Le déclin (1) est donc la signature de « la composante TMPyP base libre » seule en solution, et le déclin (2) est la signature de la porphyrine complètement métallée (Cd-TMPyP). Pour les concentrations intermédiaires, les déclin peuvent être analysés selon des fonctions bi-exponentielles, dont les facteurs pré-exponentiels varient avec la quantité de cadmium(II) ajoutée.

Nous pouvons aussi utiliser le traitement pas « Décomposition en Composantes Connues » : la constante de complexation apparente est en accord avec les résultats de fluorescence stationnaire et ceux d'absorption : $\text{pK}'_1 = 5,3$.

Conclusions :

Nous avons étudié la complexation de la TMPyP par les ions cadmium(II) en mettant à profit les propriétés spectroscopiques de la porphyrine. Les expériences d'absorption, d'émission de fluorescence et de fluorescence résolue en temps ont abouti au même résultat : la porphyrine est complexée par le cadmium(II), la constante apparente de l'équilibre, en milieu tampon (pH=7,2) est :

$pK'_1=5,25 \pm 0,05$. La gamme de détection est plus étendue en fluorescence qu'en absorption : de 10^{-8} à 10^{-4} mol.L⁻¹ en ions.

V.2.2.2. Etude de la complexation de la TMPyP par les ions plomb(II)

Nous allons à présent étudier la métallation de la TMPyP par les ions plomb(II) dont l'équilibre de complexation est le suivant :



avec la constante de complexation $K_2 = \frac{[\text{Pb-TMPyP}][\text{H}^+]^2}{[\text{Pb}^{2+}][\text{TMPyP}]}$ (V.14)

Comme précédemment, nous étudierons tout d'abord les effets de l'ajout de plomb(II) au spectre d'absorption de la porphyrine, puis nous étudierons les spectres d'émission de fluorescence et enfin le déclin de fluorescence de la porphyrine.

V.2.2.2.A. Spectroscopie d'absorption.

A une solution de TMPyP ($5,3 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹), nous avons ajouté de l'acétate de plomb en quantité croissante. Nous présentons à la figure V.19. l'évolution du spectre d'absorption de la porphyrine :

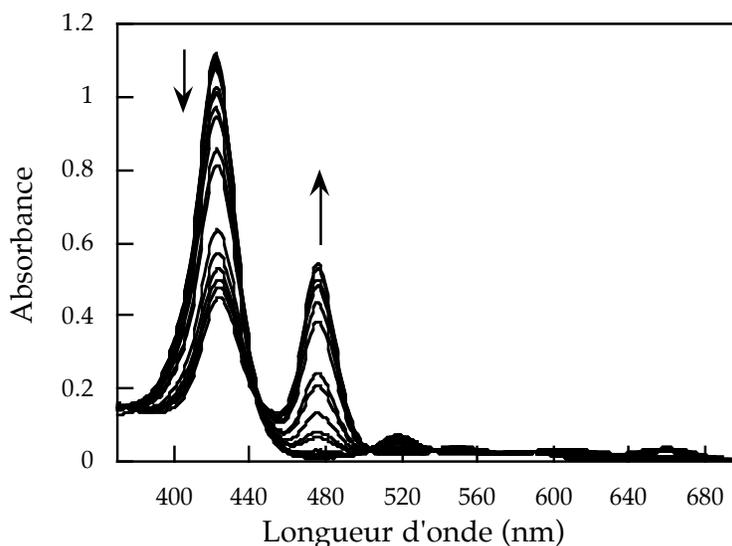


Figure V.19. Variations du spectre d'absorption d'une solution de TMPyP avec l'ajout croissant d'ions Pb(II)

Nous pouvons observer la disparition de la bande à 422 nm et l'apparition simultanée d'une bande à 480 nm. La concentration la plus élevée en ion Pb(II) que nous avons étudiée est de $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, à cette concentration il reste encore de la porphyrine non métallée. En conséquence l'analyse par « Décomposition en Composantes Connues » est difficile. Comme nous n'avons pas

le spectre de référence de la porphyrine complètement métallée, nous avons eu recours à une autre méthode. Nous avons étudié l'évolution du maximum d'absorption (à 422 nm) de la porphyrine en fonction de la concentration de sel métallique. L'analyse est décrite en Annexe E. Nous présentons ici les résultats (Figure V.20.). Nous avons supposé que l'absorbance à 422 nm est presque nulle ($A_c=0$) lorsque la porphyrine est totalement métallée.

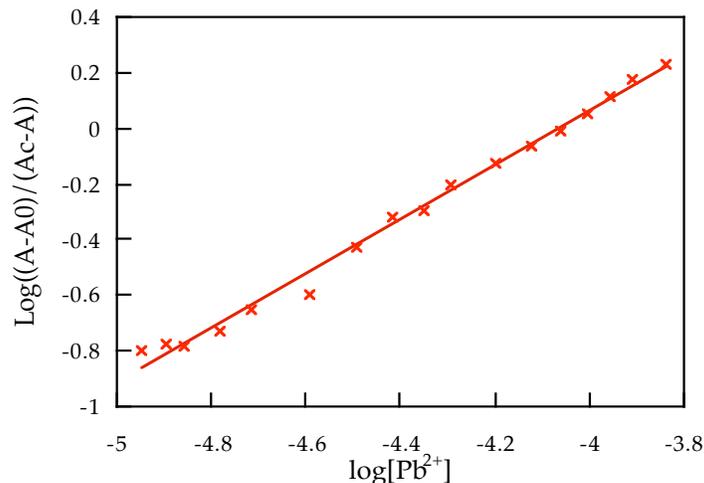


Figure V.20. Variation du $\log((A-A_0)/(A_c-A))$ en fonction du $\log([Pb^{2+}])$

Nous pouvons effectuer une corrélation linéaire entre les deux logarithmes (coefficient de corrélation de 0,996). Nous obtenons alors une constante de complexation apparente : $pK'_2=4$ pour un complexe 1-1. Le domaine de sensibilité se situe entre 10^{-5} et 10^{-3} mol.L⁻¹.

V.2.2.2.B. Spectroscopie d'émission de fluorescence stationnaire.

Des spectres d'émission de fluorescence de la porphyrine ont été réalisés en ajoutant des quantités croissantes d'acétate de plomb. La porphyrine de plomb n'est pas fluorescente. Par ajout de Pb(II), nous n'avons observé que la diminution de la bande de fluorescence de la TMPyP base libre. La fluorescence persiste pour des concentrations en plomb(II) de l'ordre de 10^{-3} mol.L⁻¹. Ainsi même à de fortes concentrations en plomb, la métallation ne semble pas totale.

V.2.2.2.C. Spectroscopie de fluorescence résolue en temps.

Une seule espèce est fluorescente, la porphyrine base libre. Les expériences de fluorescence résolue en temps (réalisées dans les mêmes conditions que précédemment) nous ont permis de voir une diminution de l'intensité au maximum du déclin, sans changement de la durée de vie.

Conclusions :

L'étude de la complexation de la TMPyP par les ions plomb(II) a permis d'évaluer, par spectroscopie d'absorption, la constante apparente de complexation : $pK'_2=4$. La gamme de détection des ions s'étend de 10^{-5} à 10^{-3} mol.L⁻¹. Le seuil de détection, en absorption, est 10 fois plus élevé que pour les ions cadmium. Les études de fluorescence ont montré que la porphyrine métallée (Pb-TMPyP) n'est pas fluorescente, et que l'intensité de fluorescence, liée à la disparition de la porphyrine base libre, diminue avec l'ajout de plomb(II) sans modifier la durée de vie. Nous n'avons pas pu atteindre une complète métallation malgré des concentrations élevées en plomb (jusque $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹).

La constante apparente de complexation est plus élevée pour le cadmium que pour le plomb. La métallation totale a été atteinte avec le cadmium (II) et pas avec le plomb (II). La porphyrine de cadmium est fluorescente, celle de plomb ne l'est pas. Nous pouvons donc par spectroscopie de fluorescence distinguer les porphyrines base libre, de celles métallées par du Cd(II) et de celles métallées par du Pb(II). Le maximum d'absorption dépend aussi du métal. Nous pouvons alors parler de « sélectivité ».

Nous allons maintenant étudier la complexation de la TMPyP par les ions mercure (II).

V.2.2.3. *Etude de la complexation de la TMPyP par les ions mercure (II)*

L'équilibre de complexation à étudier est le suivant :



avec pour constante de complexation K_3 :

$$K_3 = \frac{[\text{Hg-TMPyP}] \cdot [\text{H}^+]^2}{[\text{Hg}^{2+}] \cdot [\text{TMPyP}]} \quad (\mathbf{V.15})$$

V.2.2.3.A. *Spectroscopie d'absorption*

Nous avons ajouté à une solution de porphyrine ($4,4 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹) des quantités croissantes d'acétate de mercure. Nous présentons figure V.21. l'évolution du spectre d'absorption de la porphyrine :

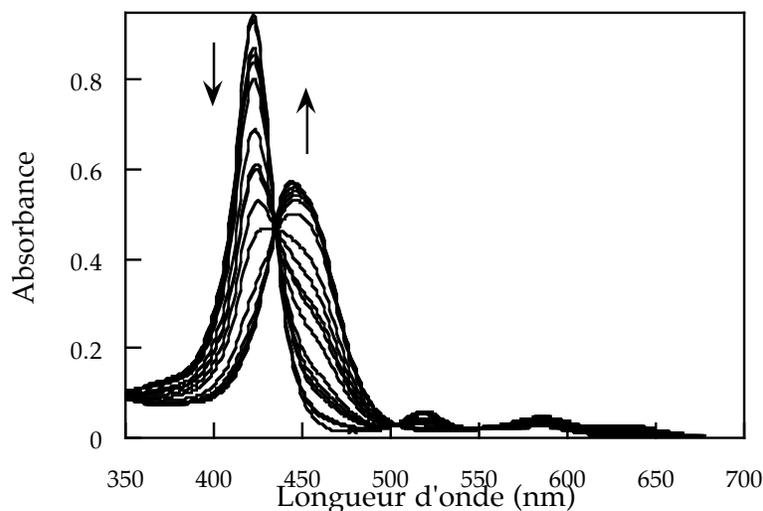


Figure V.21. Variations du spectre d'absorption d'une solution de TMPyP ($4,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) en présence de quantités croissantes d'acétate de mercure, $[\text{Hg}^{2+}]$ allant de $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ à $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Nous observons une diminution de la bande à 422 nm alors qu'apparaît simultanément une bande à 444 nm. La première bande est caractéristique de la porphyrine non métallée, la seconde est la signature de la porphyrine métallée par les ions mercure(II). Pour de fortes concentrations en mercure (II), nous observons une disparition totale de la bande à 422 nm. Nous disposons donc de deux spectres de référence : celui de la porphyrine base libre, et celui de la porphyrine totalement métallée. Cela permet de procéder à une analyse selon une « Décomposition en Composantes Connues ». Nous obtenons alors le pourcentage de porphyrine métallée et celui de porphyrine base libre (Figure V.22.)

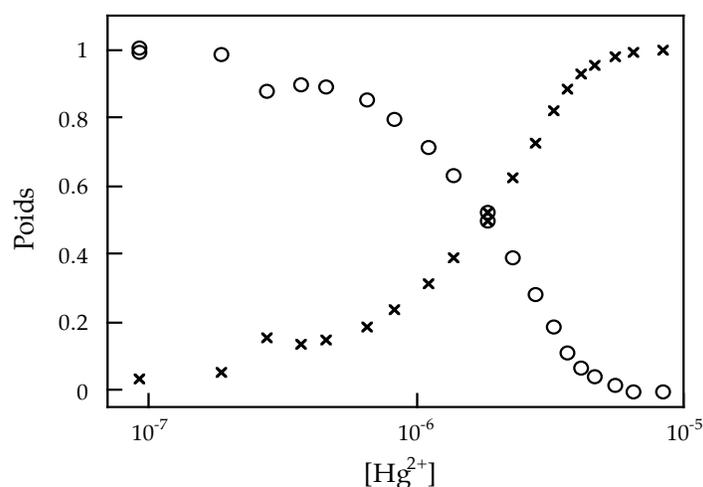


Figure V.22. Variation du poids de chaque composante (TMPyP et Hg-TMPyP) en fonction de la concentration en ions Hg^{2+}

La gamme de concentration permettant une détection des ions mercure(II) se situe entre 10^{-7} et 10^{-5} mol.L⁻¹. Selon le principe de calculs exposés au paragraphe V.2.2.1.A, nous pouvons au point d'intersection des deux courbes obtenir la constante de complexation apparente $pK'_3=5,7$.

V.2.2.3.B. Spectroscopie d'émission de fluorescence stationnaire.

Les spectres d'émission de fluorescence de la TMPyP en présence d'acétate de mercure sont présentés ci-dessous (Figure V.23.) :

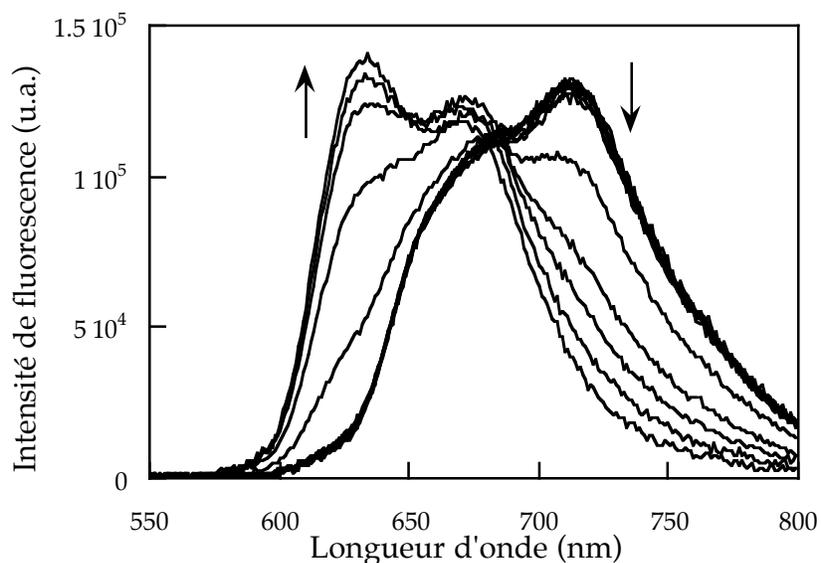


Figure V.23. Variations du spectre de fluorescence d'une solution de TMPyP (10^{-7} mol.L⁻¹) en fonction de la concentration en ions Hg^{2+} entre 10^{-9} mol.L⁻¹ et 10^{-3} mol.L⁻¹ - Excitation : 433 nm

La bande de fluorescence à 720 nm, caractéristique de la porphyrine base libre, diminue et une bande à 632 nm apparaît, correspondant à la porphyrine de mercure. Nous avons pu aller jusqu'à complète métallation de la solution de porphyrine. La décomposition des spectres résulte donc d'une analyse en « Composantes Connues », avec le spectre de la TMPyP base libre et celui de la Hg-TMPyP comme références. Nous présentons figure V.24. l'évolution du poids de chaque composante en fonction de la concentration en ion mercure (II) :

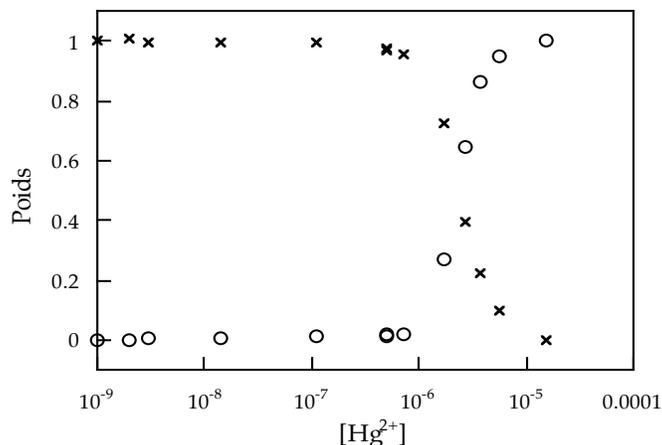


Figure V.24. *Variation du poids de chaque composante (TMPyP et Hg-TMPyP) suivant la concentration en ions mercure(II).*

Les effets de la métallation ne sont visibles qu'à partir d'une concentration de 10^{-7} mol.L⁻¹ en ions mercure(II). En deçà les variations sont peu visibles. Le point d'équivalence (intersection) se situe au même endroit, $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ en ions mercure(II), que pour les expériences d'absorption. En travaillant à des concentrations différentes de porphyrine, nous pouvons dire que le point d'équivalence ne dépend pas de la concentration en porphyrine, et donc que le complexe mercure(II)-porphyrine est un complexe 1-1. Nous trouvons un $\mathbf{pK'_3 = 5,6}$.

V.2.2.3.C. *Spectroscopie de fluorescence résolue en temps.*

Nous avons travaillé dans les mêmes conditions que précédemment : longueur d'onde d'excitation à 433 nm et d'émission à 710 nm.

Nous présentons figure V.25. l'évolution du déclin de fluorescence d'une solution de porphyrine (10^{-7} mol.L⁻¹) en présence de quantité croissante d'acétate de mercure.

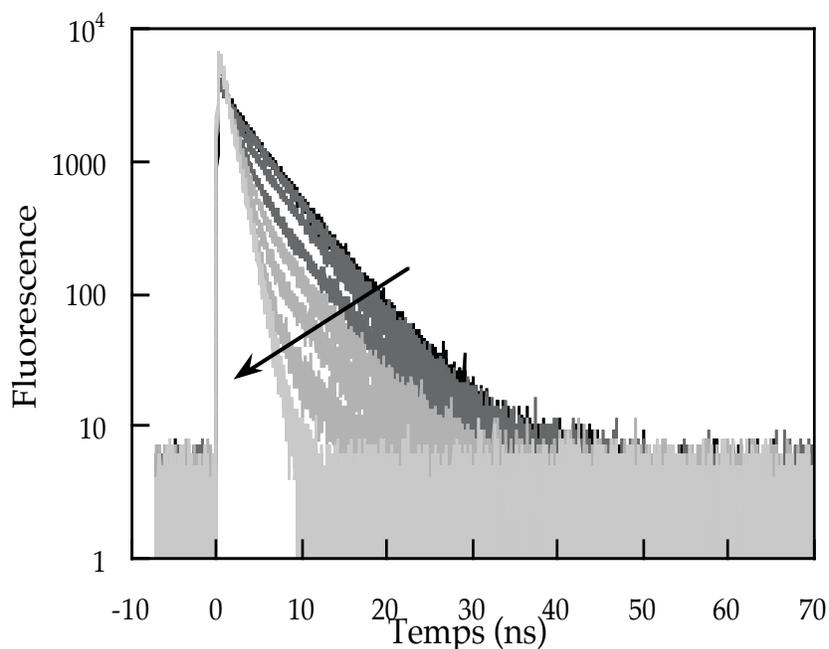


Figure V.25. Variations du déclin de fluorescence d'une solution de TMPyP ($10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) en fonction de la concentration en Hg^{2+} comprise entre $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ et $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Il faut distinguer deux phénomènes :

- Evolution de la durée de vie de fluorescence :

Le déclin est d'autant plus rapide que la concentration en ions mercure (II) est élevée. A forte concentration le déclin peut être ajusté par une fonction mono-exponentielle de durée de vie 1,25 ns. Ce comportement est caractéristique de la complète métallation de la solution de TMPyP. La durée de vie est la signature de l'espèce Hg-TMPyP.

- Evolution de l'intensité au maximum :

Les déclins n'ont pas été normalisés, ils ont tous été enregistrés dans les mêmes conditions (temps d'acquisition, puissance sur l'échantillon). Nous observons alors une augmentation de l'intensité au maximum lorsque l'on rajoute l'acétate de mercure(II). Cette augmentation s'explique par le fait que la porphyrine de mercure a un rendement de fluorescence plus élevé que la porphyrine base libre.

Comme nous disposons du déclin de fluorescence de la porphyrine base libre (TMPyP) et de la porphyrine métallée (Hg-TMPyP), nous avons envisagé une analyse en « Composantes Connues » en utilisant les deux déclins cités comme références. Nous présentons à la figure V.26. l'évolution du poids de chaque composante en fonction de la concentration en ions mercure(II).

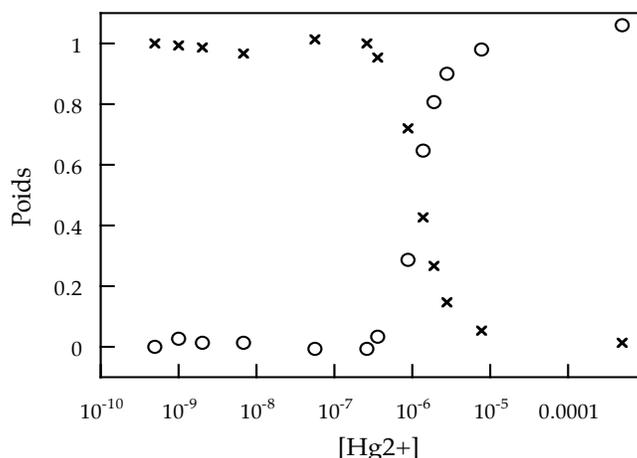


Figure V.26. Variation du poids de la porphyrine métallée (Hg-TMPyP) et non métallée (TMPyP) suivant la concentration en ions mercure(II).

Nous pouvons alors calculer la constante apparente de complexation : $pK'_3=5,8$. Cette valeur est en accord avec les valeurs trouvées précédemment.

Conclusions :

Les différentes techniques spectroscopiques ont permis de mettre en évidence la métallation par les ions mercure (II) de la porphyrine, TMPyP. La gamme de concentrations accessibles s'étend de 10^{-7} mol.L⁻¹ à 10^{-5} mol.L⁻¹. La métallation totale est alors atteinte. La constante apparente de complexation a été évaluée à : $pK'_3=5,7 \pm 0,1$.

V.2.2.4. Conclusions sur les études en solution.

Les résultats obtenus pour la complexation de la TMPyP par différents sels métalliques sont résumés dans le tableau V.3. :

	Maximum d'absorption Bande de Soret (nm)	Bandes de fluorescence (nm)	Durée de vie de fluorescence (ns)	Logarithme de la constante de complexation pK'	Sensibilité de la détection (mol.L ⁻¹)
TMPyP	422	670-720	13,2		
Cd-TMPyP	447	620-670	1,2	5,2	$10^{-7} - 10^{-4}$
Pb-TMPyP	480	non fluo.	non fluo.	4	$10^{-5} - 10^{-3}$
Hg-TMPyP	444	632-670	1,2	5,7	$10^{-7} - 10^{-5}$

Tableau V.3. *Propriétés spectroscopiques de la porphyrine TMPyP base libre ou métallée, résultats obtenus en solution (pH=6).*

Nous avons montré que le dosage d'ions métalliques, comme Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , est possible avec une porphyrine hydrosoluble : la tétraméthylpyridinium porphyrine. Le seuil de détection est du même ordre de grandeur en ce qui concerne les ions mercure(II) et les ions cadmium(II). La constante de complexation est plus faible dans le cas des ions plomb(II) que pour les deux autres métaux étudiés. Le seuil de détection est plus faible que celui des ions plomb(II). La sensibilité semble donc meilleure pour les ions mercure(II) et cadmium(II).

Les caractéristiques spectroscopiques permettent de distinguer les trois types de porphyrines métallées selon la nature du métal. En effet, le maximum d'absorption est différent selon l'ion métallique à doser. La différence de position de la bande de Soret n'est cependant que de 3 nm entre la porphyrine de mercure et celle de cadmium. Le spectre d'émission de fluorescence permet de mieux discriminer les espèces puisque le décalage entre porphyrine de mercure et celle de cadmium s'élève à 12 nm. La porphyrine de plomb n'est pas fluorescente, ce qui permet une détection sélective. Les expériences de fluorescence résolues en temps nous ont permis de caractériser la durée de vie des espèces.

Ainsi en combinant spectroscopie d'absorption et spectroscopie d'émission de fluorescence, nous pouvons distinguer trois types d'ions métalliques et les doser. Ces études en solution constituent l'étape préliminaire de l'étude de l'interaction porphyrine base libre ou métallée avec les billes de latex « Orange 40 carboxylate ».

V.2.3. Effets de l'adsorption de la TMPyP sur les latex « Orange 40 carboxylate » ; étude de la complexation par des sels de métaux lourds.

Nous pouvons, avant d'aller plus loin, nous interroger sur la justesse du choix de la porphyrine comme molécule sonde. Un avantage de la TMPyP est qu'elle est soluble dans l'eau, qui est aussi le solvant des suspensions de billes. De plus, la porphyrine est chargée positivement alors que les billes sont chargées négativement : ainsi une interaction électrostatique est possible. Nous avons déjà discuté de la nature hydrophobe de la surface des billes, le caractère aromatique de la porphyrine pourrait permettre à celle-ci d'établir également des interactions de type hydrophobe avec la surface des latex. L'adsorption semble donc tout à fait possible, qu'en est-il du transfert d'énergie des fluorophores des billes vers la porphyrine ? Quel est l'effet de la métallation sur le recouvrement des spectres ?

Nous présentons en figure V.27. le spectre d'émission de fluorescence d'une solution de billes « Orange 40 carboxylate » accompagné du spectre d'absorption de la porphyrine base libre ainsi que celui de la porphyrine métallée par du cadmium(II) :

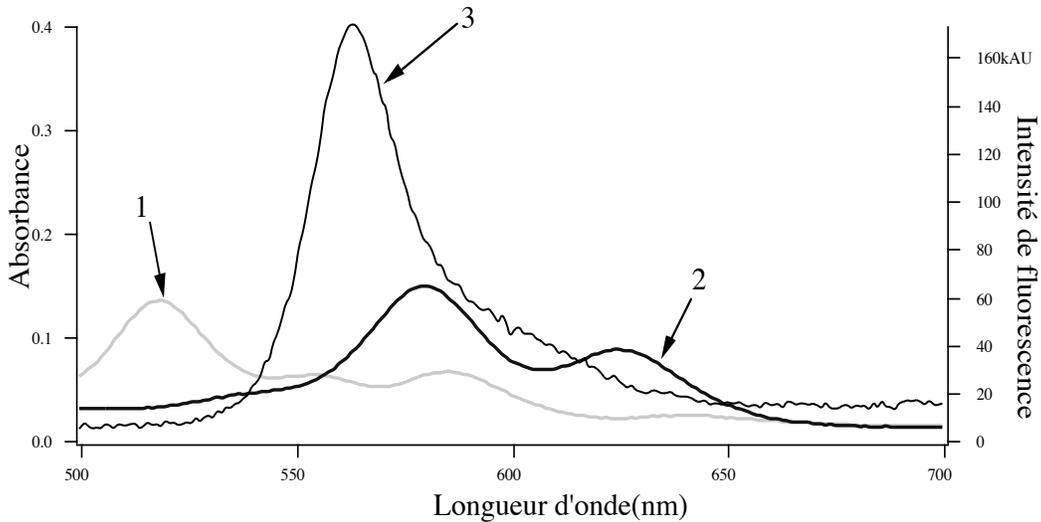


Figure V.27. **1)** Spectre d'absorption de la TMPyP base libre
2) Spectre d'absorption de la TMPyP métallée par du cadmium(II)
3) Spectre d'émission de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate ».

Nous constatons que le recouvrement est plutôt faible lorsque la porphyrine est non métallée, en revanche le déplacement des bandes Q par métallation entraîne un recouvrement beaucoup plus grand. Nous nous attendons à ce qu'il existe un transfert d'énergie des billes vers le TMPyP. Ce transfert devrait s'accroître lorsque la porphyrine est métallée. Nous avons calculé les distances de Förster entre les billes « Orange 40 carboxylate » et la porphyrine non métallée ou métallée : bille-TMPyP : 3,75 nm ; bille-TMPyPHg : 4,21 nm ; bille-TMPyPPb : 4,26 nm ; bille-TMPyPCd : 4,28 nm. Il semble donc *a priori* possible de discriminer porphyrine et porphyrine métallée.

V.2.3.1. Adsorption de TMPyP à la surface de latex.

V.2.3.1.A. Spectroscopie d'absorption

Nous avons travaillé avec une solution de latex « Orange 40 carboxylate » contenant $4,4 \cdot 10^{14}$ billes.L⁻¹. A 990 μ L de cette solution ($4,36 \cdot 10^{11}$ billes), nous avons ajouté 10 μ L d'une solution de TMPyP à $1,2 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹. Il y a donc 170 molécules de porphyrines pour une bille. Si nous faisons l'hypothèse d'une adsorption totale des porphyrines, le taux de couverture est $4,7 \cdot 10^{-8}$ mol.m⁻². Après ajout de la porphyrine, nous avons étudié la cinétique d'adsorption sur les billes par spectroscopie d'absorption U.V.-Visible. La figure V.28. présente l'évolution sur 7 heures des spectres d'absorption de l'échantillon décrit ci-dessus :

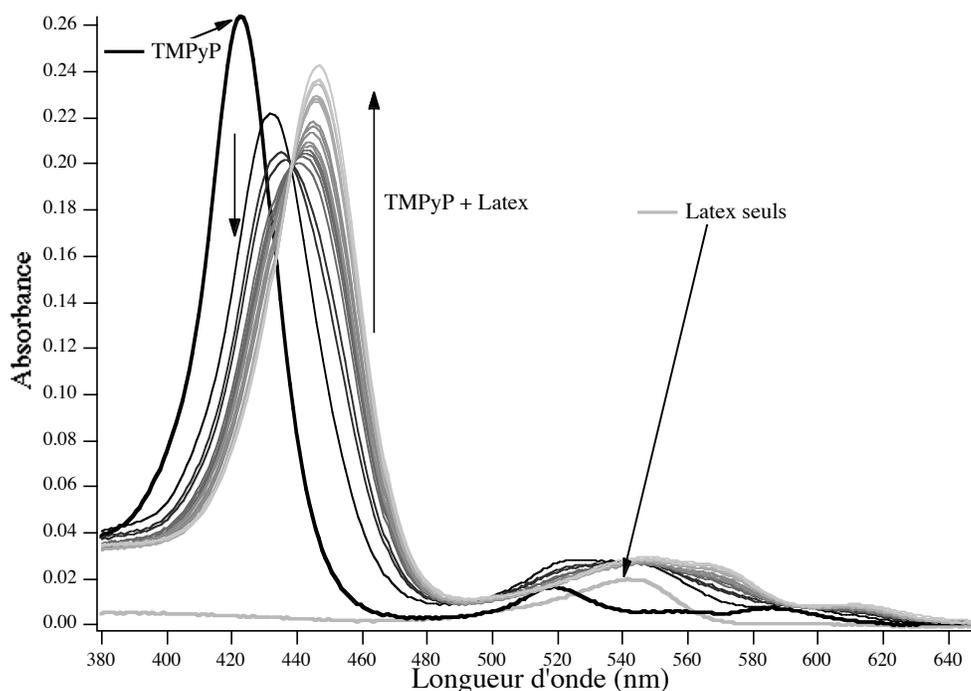


Figure V.28. Evolution avec le temps des spectres d'absorption d'un mélange latex « Orange 40 carboxylate » et TMPyP (170 molécules de TMPyP pour une bille). Acquisition : 7 heures.

Dans un premier temps la bande de Soret de la porphyrine est déplacée de 422 nm à 431 nm. Un déplacement vers le rouge, du même ordre de grandeur a été observé lors de l'incorporation de la TMPyP dans des matrices sol-gel¹⁹. Ce déplacement vers le rouge de la bande d'absorption peut s'interpréter comme le signe d'une plus grande interaction de la TMPyP avec le milieu (sol-gel ou surface du latex). Si en milieu sol-gel, la bande de Soret n'évolue pas avec le temps, il n'en va pas de même pour les latex. En effet, nous pouvons observer la disparition de la bande à 431 nm au profit d'une bande à 446 nm. Chaque bande est caractéristique d'une espèce, nous observons en effet un point isobestique à 438 nm.

Une analyse en « Composantes Principales » montre également qu'il existe deux espèces. Si l'on choisit comme référence le déclin au temps juste après l'ajout de TMPyP et le déclin après 7 heures (Cf. Figure V.29.), nous pouvons réaliser une analyse en « Composantes Connues ».

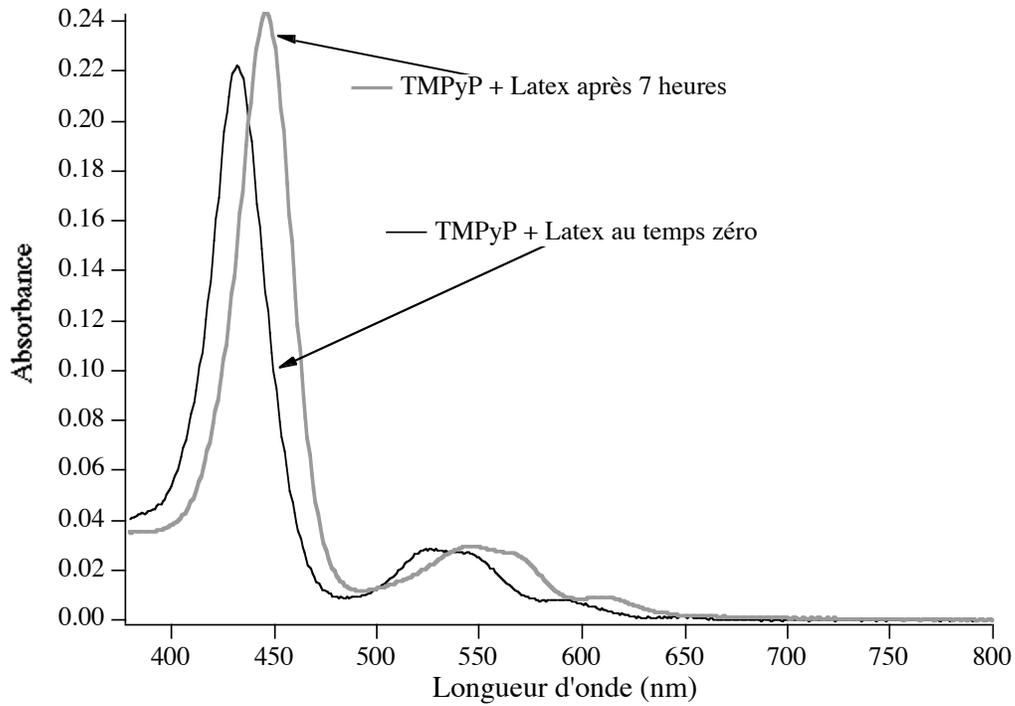


Figure V.29. *Choix des références pour l'analyse en « Composantes Connues ».*

Nous présentons figure V.30 le résultat de l'analyse en « Composantes Connues » :

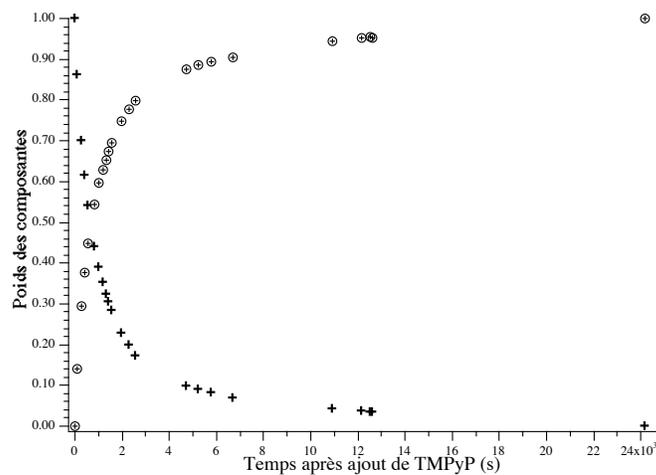
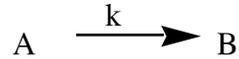


Figure V.30. *Evolution avec le temps du poids des composantes de référence par analyse en « Composantes Connues » - Références TMPyP-Latex($t=0$) et TMPyP-Latex($t=7$ heures).*

Le spectre obtenu après 7 heures présente une bande de Soret fine, sans épaulement.

L'analyse nous permet de dire que le poids de l'espèce qui absorbe à 431 nm devient nul avec le temps, donc l'espèce disparaît au profit d'une autre espèce caractérisée par une bande d'absorption à 446 nm. Il ne s'agit pas d'un équilibre, mais d'une réaction totale. Nous pouvons donc envisager la réaction suivante, l'espèce A se transforme en espèce B avec une constante de vitesse k :



Nous pouvons donc écrire que :

$$[A] = [A]_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

où [A] est la concentration de A au temps t, et $[A]_0 = 1,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ la concentration initiale en espèce A.

Ecrivons les relations qui lient l'absorbance aux concentrations, nous noterons DO(431) et DO(446) les absorbances respectivement à 431 nm et à 446 nm :

$$DO(431) = \varepsilon_A(431) \cdot l \cdot [A] + \varepsilon_B(431) \cdot l \cdot [B] \quad (\mathbf{V.11})$$

En appliquant la conservation de la matière : $[A]_0 = [A] + [B]$, l'expression (V.11) devient :

$$DO(431) = [A] \cdot l \cdot (\varepsilon_A(431) - \varepsilon_B(431)) + [A]_0 \cdot l \cdot \varepsilon_B(431) \quad (\mathbf{V.12})$$

Nous avons vu que $[A] = [A]_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$ ainsi l'expression (V.12) devient :

$$DO(431) = [A]_0 \cdot l \cdot (\varepsilon_A(431) - \varepsilon_B(431)) \cdot \exp(-k \cdot t) + [A]_0 \cdot l \cdot \varepsilon_B(431) \quad (\mathbf{V.13})$$

En utilisant le même type de raisonnement nous obtenons l'expression (V.14) pour l'absorbance à 446 nm :

$$DO(446) = -[A]_0 \cdot l \cdot (\varepsilon_B(446) - \varepsilon_A(446)) \cdot \exp(-k \cdot t) + [A]_0 \cdot l \cdot \varepsilon_B(446) \quad (\mathbf{V.14})$$

Nous avons représenté à la figure V.31. l'évolution en fonction du temps des maxima d'absorption à 431 nm et 446 nm.

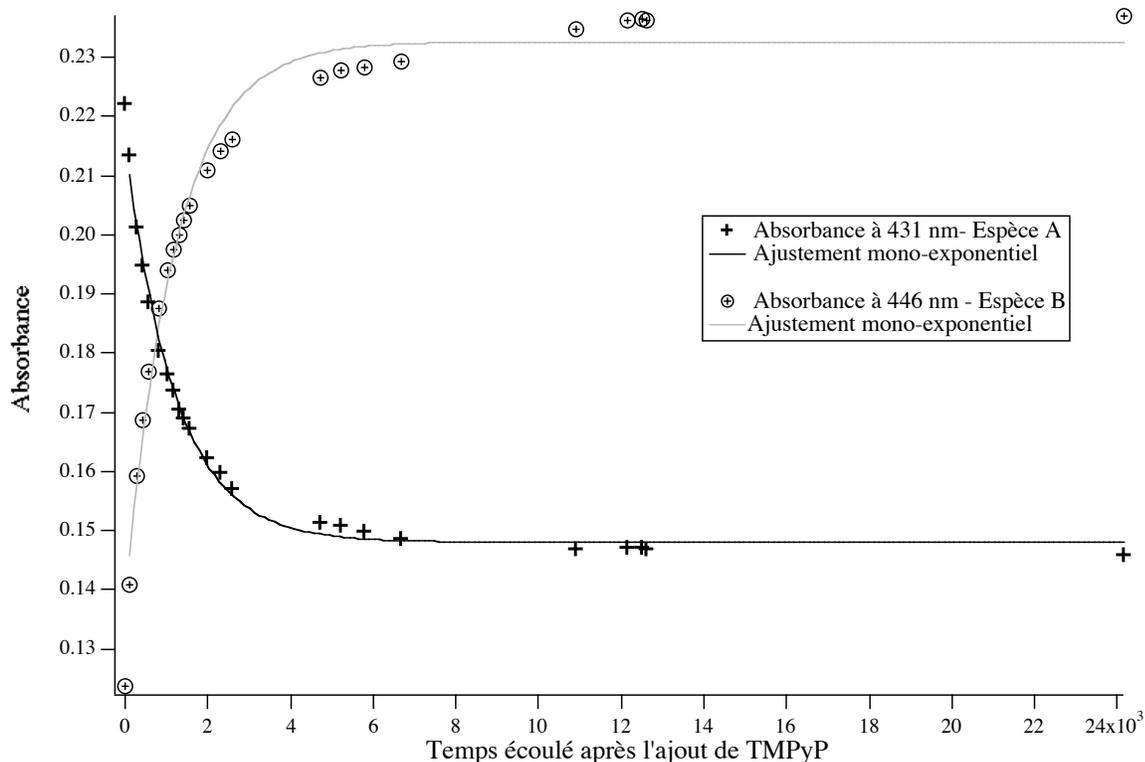


Figure V.31. Evolution avec le temps du maximum d'absorption à 431 et à 446 nm.

L'évolution des bandes à 431 et 446 nm peut être dans les deux cas ajustée par une fonction mono-exponentielle avec une constante de vitesse de $8,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. L'évolution des bandes, et un état stationnaire est atteint au bout d'environ 10000 secondes, soit à peu près trois heures.

Des équations (V.13) et (V.14) et des ajustements mono-exponentiels précédents, nous pouvons déduire les coefficients d'absorption molaires : $\epsilon_B(431)$, $\epsilon_B(446)$, $\epsilon_A(431)$, $\epsilon_A(446)$. Nous avons trouvé :

- **A** $\epsilon_A(431)=179926 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_A(446)=114856 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
- **B** $\epsilon_B(431)=123358 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_B(446)=193888 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

L'équilibre d'adsorption met en jeu deux espèces A et B, A disparaît au cours du temps au profit de B. Nous avons peu d'information sur la nature des espèces, nous avons caractérisé leur cinétique et leur coefficient d'absorption molaire. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses quant aux espèces mises en jeu :

- L'espèce A est la porphyrine adsorbée en surface des latex, le changement de milieu par rapport au solvant eau induit un déplacement de la bande de Soret vers le rouge (comme pour les

matrices sol-gel), puis il est possible que la porphyrine pénètre plus profondément dans la chevelure de polymères (rappelons que nous travaillons ici avec des latex fonctionnalisés par des carboxylates). En « s'enfonçant » dans les brins de polymères, les molécules de TMPyP ne subissent plus le même microenvironnement, d'où un déplacement de la bande de Soret (espèce B). La pénétration des molécules sondes dans la « chevelure » est cohérente avec le fait que celle-ci est poreuse^{55,87}. D'autre part la porphyrine a peut-être plus d'affinité pour la surface de polystyrène (plus hydrophobe) que pour les brins portant les groupes carboxylates, ainsi elle pénètre » la chevelure pour accéder à des sites plus hydrophobes.

- Nous pouvons aussi remarquer que le déplacement de la bande de Soret jusque 446 nm n'est pas sans rappeler le déplacement observé lors de la métallation en solution (par exemple par le cadmium ou le mercure). Nous pouvons donc envisager une éventuelle métallation à la surface des latex ou bien encore une protonation des porphyrines menant à l'espèce B. La métallation semble peu probable car nous n'avons introduit aucun ion métallique en quantité importante (nous travaillons avec de l'eau distillée et désionisée), les contre-ions des groupes carboxylates sont sans doute des ions sodium. Il reste donc à envisager une éventuelle protonation de la porphyrine. Nous avons signalé plus haut que les pK_a de la TMPyP en solution sont très faibles (2 et 0,8). L'adsorption de la porphyrine pourrait modifier un pK_a ou les deux : en effet, à la surface des latex, il est possible que la forme protonée de la porphyrine (hexa-cationique) soit plus stabilisée que la forme base libre (tétra-cationique). La TMPyP se trouvant entourée de groupes anioniques, l'adsorption de la forme la plus chargée est peut-être plus favorable énergétiquement. Si on stabilise la forme acide, le pK_a de la TMPyP adsorbée est alors plus élevé qu'en solution aqueuse.

Si nous nous penchons plus attentivement sur les bandes Q, nous savons qu'elles sont au nombre de quatre lorsque la porphyrine est sous forme de base libre, et qu'elles ne sont plus que deux dans la forme protonée (passage de la symétrie D_{4h} à D_{2h}). La bande d'absorption des latex se trouve au niveau de l'absorption des bandes Q, et les masque en partie. Nous avons donc retranché le spectre des latex seuls en solution aux spectres des solutions de latex en présence de TMPyP. Nous parlerons de spectres corrigés. Nous présentons sur la figure V.32, les spectres d'absorption de la porphyrine base libre en solution, ainsi que deux spectres corrigés (TMPyP-latex(t=0) et TMPyP-latex(t=7h)) :

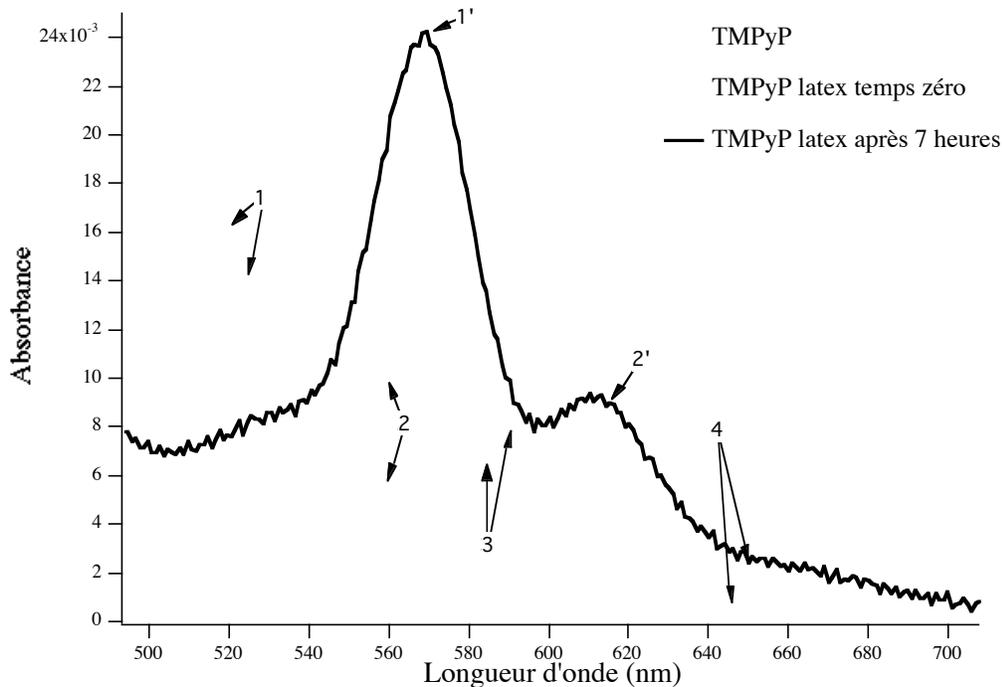


Figure V.32. Spectres d'absorption de la TMPyP en solution, de la TMPyP adsorbée sur les latex juste après l'ajout de la porphyrine, et de la TMPyP adsorbée 7 heures après le mélange latex-porphyrine. Aux spectres en présence de latex a été retranchée la contribution des latex.. Les chiffres indiquent les différentes bandes Q.

Il est assez net que juste après l'ajout de la TMPyP à la solution de latex, la porphyrine possède toujours quatre bandes Q. Elle est donc vraisemblablement sous forme base libre. En revanche, avec le temps, seules deux bandes Q subsistent. Ceci est une preuve en faveur de la métallation ou de la protonation. Pour les raisons exposées plus haut, nous pensons que la protonation est plus probable.

Nous nous sommes limités à ces informations pour ce qui est des expériences d'absorption, pour nous concentrer sur l'influence de la porphyrine sur les propriétés de fluorescence des billes.

V.2.3.1.B. Effet de l'ajout de TMPyP sur les propriétés d'émission de fluorescence stationnaire des billes.

A 2 mL d'une solution de latex « Orange 40 carboxylate » à $1,38 \cdot 10^{15}$ billes.L⁻¹, nous avons ajouté des quantités croissantes de TMPyP. Nous présentons à la figure V.33, l'évolution des spectres d'émission de fluorescence avec le temps, après ajout de TMPyP à une solution de latex.

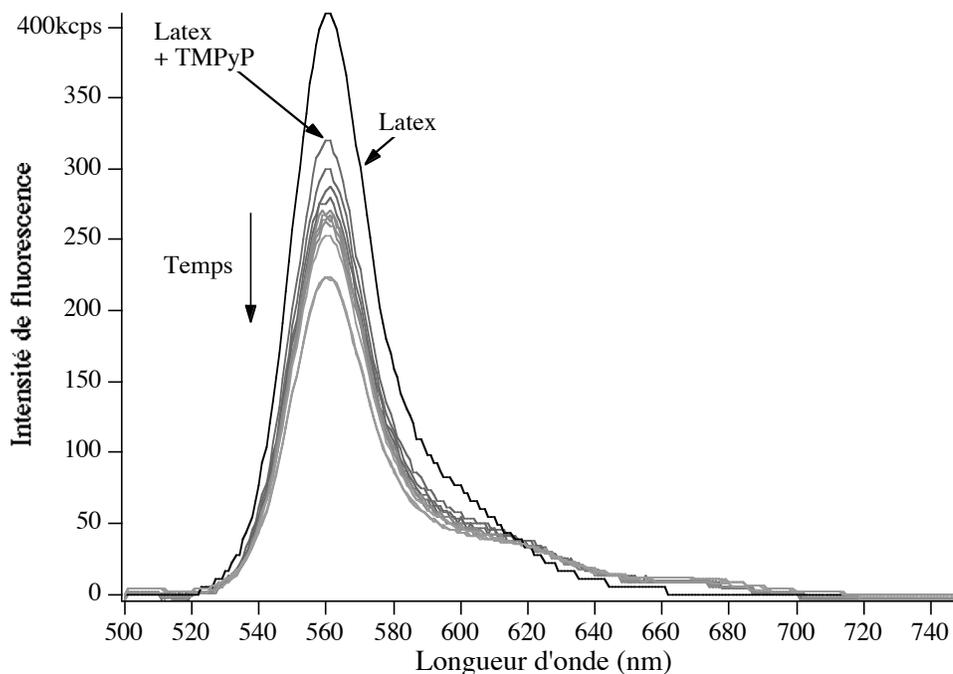


Figure V.33. *Evolution avec le temps du spectre d'émission de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate » en présence de TMPyP - Excitation 495 nm. L'échantillon est constitué d'une solution à $1,38 \cdot 10^{15}$ billes.L⁻¹ et $6,2 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ en TMPyP ; soit 270 molécules de TMPyP pour une bille.*

La fluorescence diminue nettement avec le temps. Ainsi nous mettons en évidence l'extinction de la fluorescence des billes par la porphyrine adsorbée. Lors des expériences de spectroscopie d'absorption, nous avons également observé une évolution des spectres avec le temps. Une espèce A (porphyrine base libre adsorbée) disparaît au profit d'une espèce B (porphyrine protonée et enfouie dans les « brins »). Cette espèce possède un spectre d'absorption très déplacé vers le rouge, ce qui rend le recouvrement avec le spectre d'émission de fluorescence des latex plus grand. En effet, l'intégrale de recouvrement est 1,7 fois plus grand pour l'espèce B que pour l'espèce A. (Cf. Figure V.34) Nous avons calculé le rayon de Förster pour l'espèce A et l'espèce B, nous trouvons : $R_0(A) = 3,64$ nm ; $R_0(B) = 3,96$ nm.

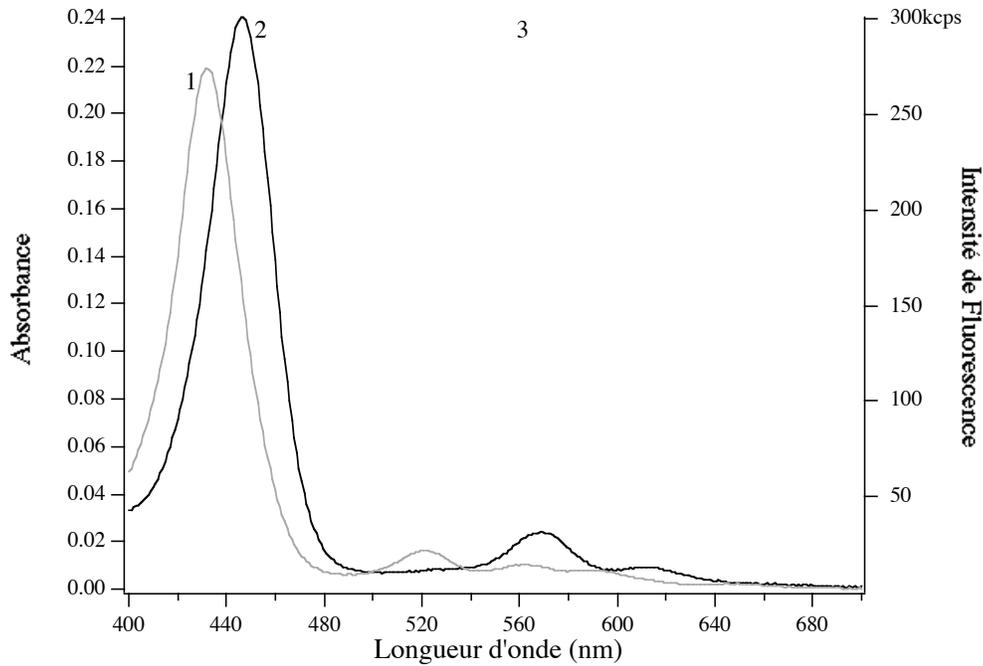


Figure V.34. *Spectres d'absorption de la TMPyP adsorbée à la surface de latex « Orange 40 carboxylate »*
1) Spectre immédiatement après ajout de la porphyrine à une solution de latex Espèce A
2) Spectre 4 heures après l'ajout Espèce B
3) Spectre d'émission de fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate »

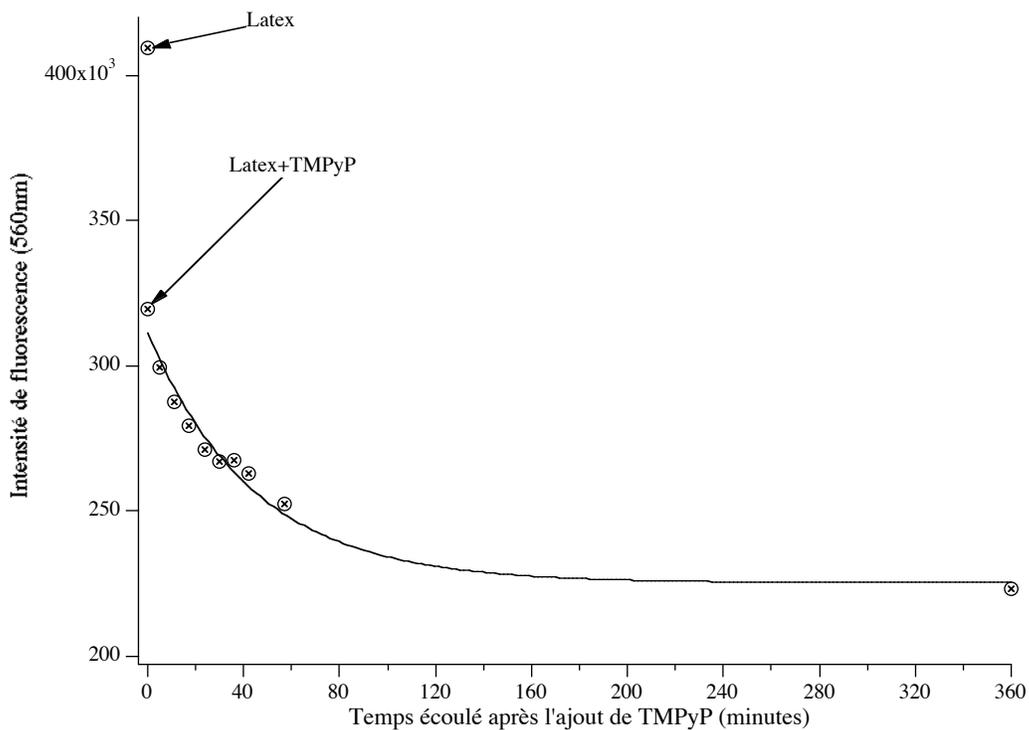


Figure V.35. *Evolution avec le temps de l'intensité de fluorescence des latex à 560 nm après ajout de TMPyP- Excitation 495 nm.*

L'extinction de la fluorescence se stabilise en un peu plus de trois heures après l'ajout de TMPyP à la solution de latex (Figure V.35.). L'extinction accrue de la fluorescence des latex se corrèle avec l'apparition de l'espèce B, et correspond à l'augmentation de l'intégrale de recouvrement.

Tous les spectres présentés ci-après ont été enregistrés quatre heures après l'ajout de la porphyrine. Nous présentons tout d'abord les résultats lorsque la longueur d'onde d'excitation est fixée à 495 nm (Figure V.36). Cette longueur d'onde est celle du laser, et correspond à un minimum d'absorption de la porphyrine.

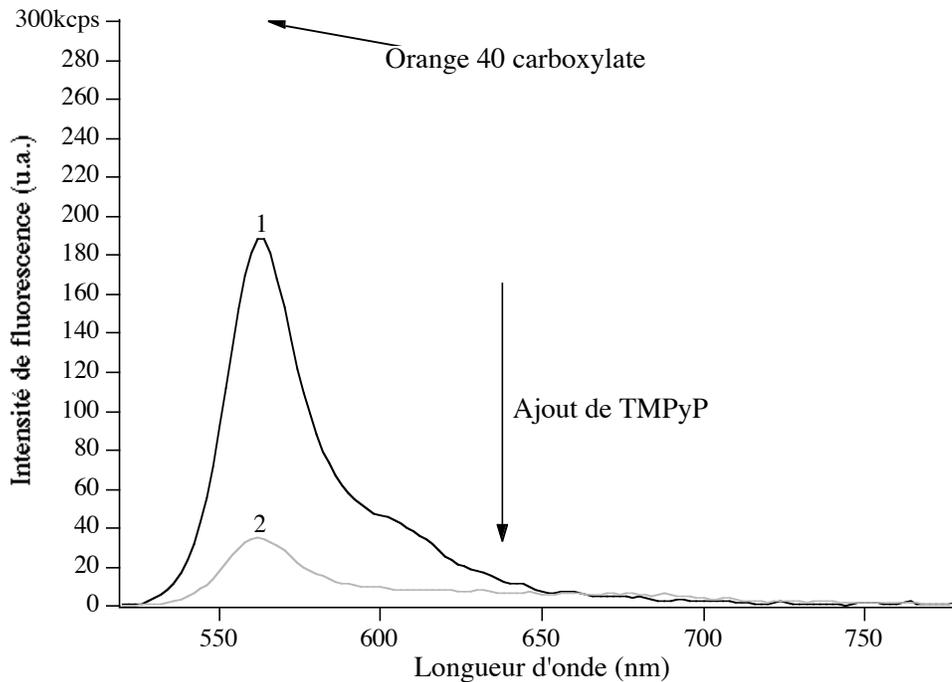


Figure V.36. *Spectres d'émission de fluorescence (excitation 490 nm) d'une solution de latex « Orange 40 carboxylate » Ajouts croissants de TMPyP - 1) $2,8 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ 2) $9,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$*

Nous pouvons constater une diminution de l'intensité de fluorescence de la bande d'émission des latex. Ainsi la porphyrine adsorbée éteint la fluorescence des billes. Nous présentons à la Figure V.37 un tracé de Stern-Volmer en fonction de la concentration totale en TMPyP (nous n'avons en effet aucune information sur la quantité de porphyrine adsorbée).

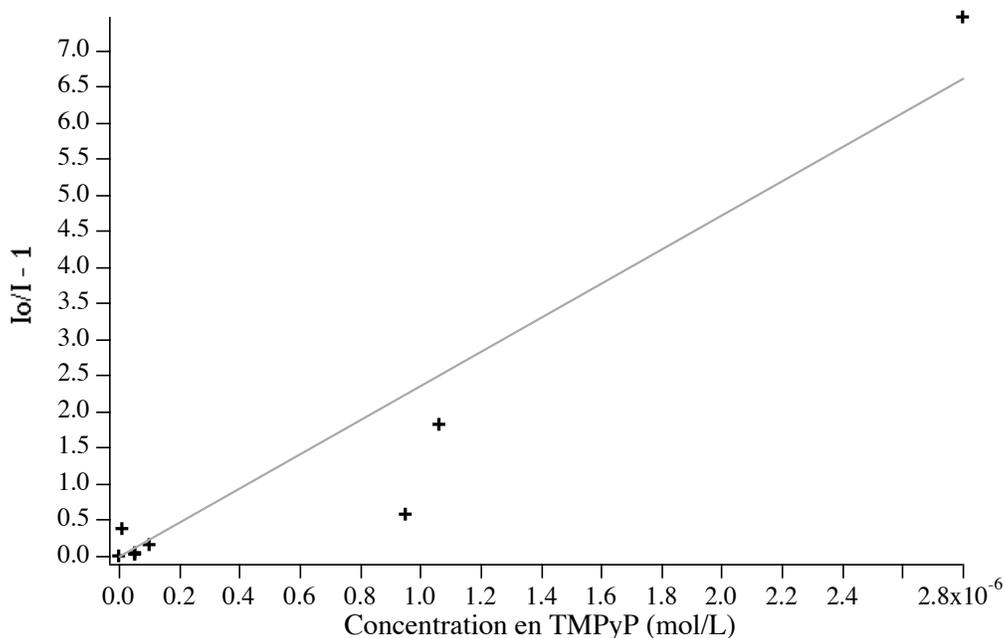


Figure V.37. *Tracé de Stern-Volmer, billes de latex « Orange 40 carboxylate » mises en présence de quantités croissantes de TMPyP. Excitation 495 nm.*

Nous pouvons ajuster le tracé de Stern-Volmer par une droite de pente : $2,4 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. Ainsi les porphyrines adsorbées sont toutes des quenchers équivalents pour les fluorophores des billes. Ces fluorophores ne semblent pas présenter de sous-ensembles *i.e* il existe une seule population de fluorophore, sensible au quenching par la porphyrine adsorbée.

Nous savons que la TMPyP est fluorescente, nous avons donc, sur les mêmes échantillons que précédemment, étudié les spectres d'émission de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation de 445 nm. Nous présentons à la figure V.38 quelques spectres d'émission de fluorescence :

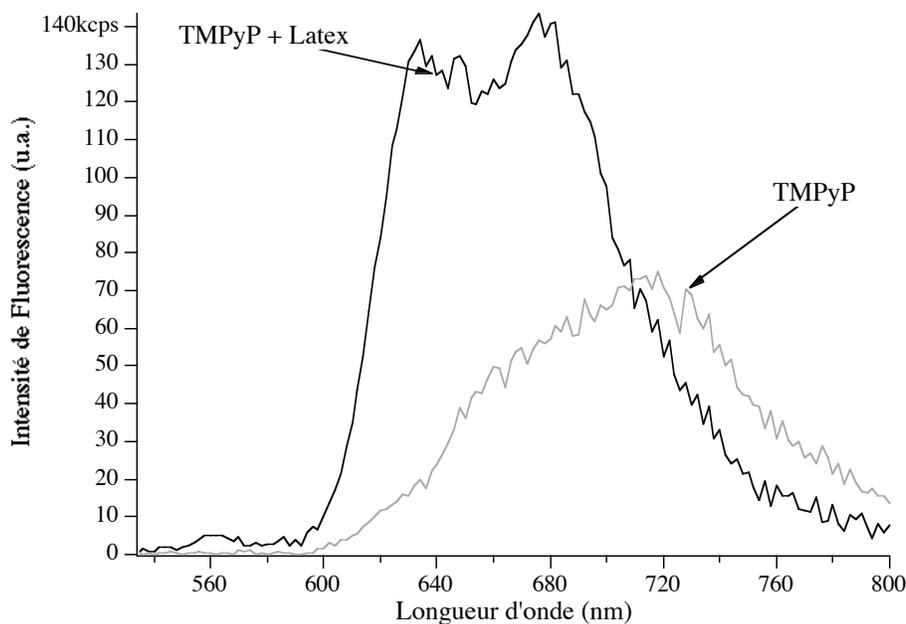


Figure V.38. Spectres d'émission de fluorescence (excitation 445 nm) d'une solution de TMPyP dans l'eau ($9,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) et d'une solution de TMPyP ($9,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) en présence latex.

Le spectre d'émission de fluorescence de la porphyrine en solution et adsorbée sur les latex est nettement différent. Lorsque la TMPyP est dans l'eau, elle présente (Cf. § V.2) deux bandes à 670 et 720 nm. Lorsqu'elle est adsorbée sur le latex, on observe toujours la bande à 670 nm, mais celle à 720 nm a apparemment disparu. Une bande à 635-640 nm est apparue. Ce comportement n'est pas sans rappeler le comportement de la TMPyP protonée en solution¹⁵⁹. Ceci est cohérent avec les changements observés sur le spectre d'absorption : disparition de deux bandes Q et décalage vers le rouge de 24 nm.

V.2.3.1.C. Effet de l'ajout de TMPyP sur les déclin de fluorescence des billes.

Nous avons travaillé avec le montage décrit dans l'annexe B. Nous allons tout d'abord présenter l'évolution du déclin de fluorescence des billes (excitation 495 nm-émission 562 nm) avec des quantités croissantes de porphyrine, quatre heures après le mélange.

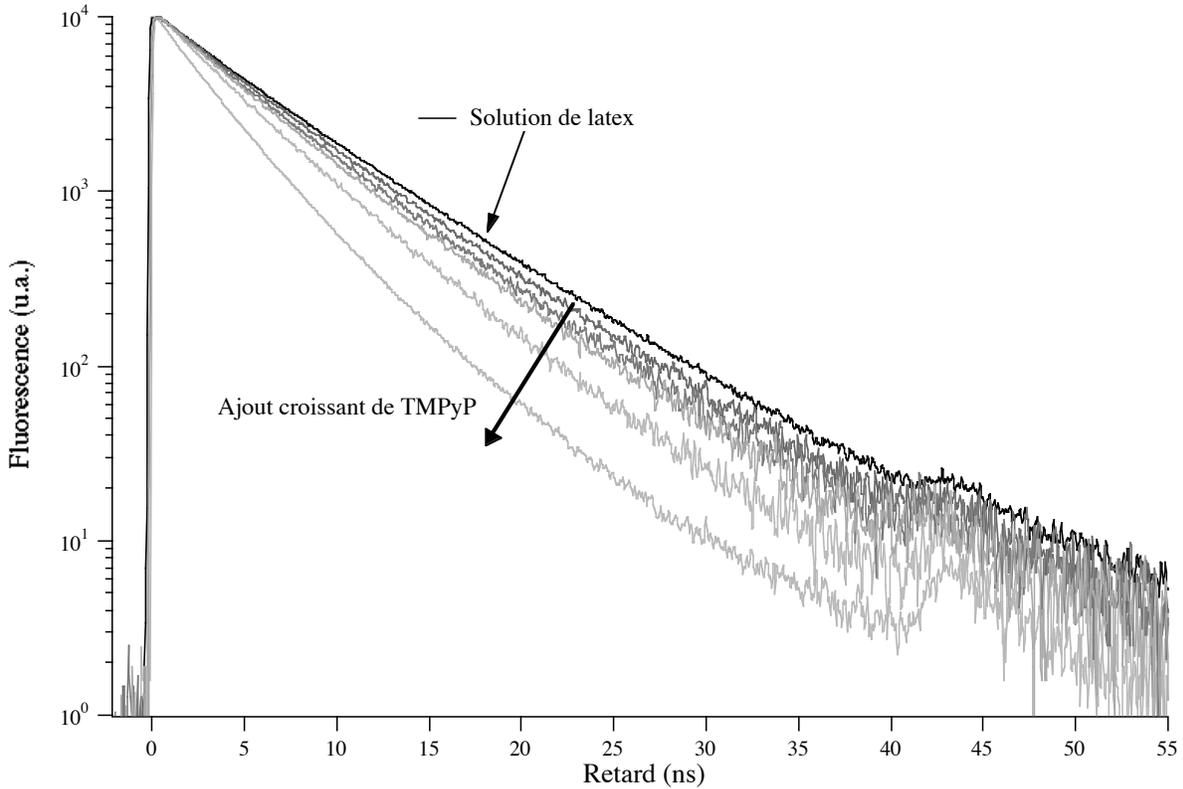


Figure V.39. *Evolution du déclin de fluorescence des billes de latex « Orange 40 carboxylate » avec l'ajout de porphyrine - Les déclins sont mesurés à 562 nm, 4 heures après l'ajout de la TMPyP - Excitation 495 nm.*

Le déclin de fluorescence est d'autant plus rapide que la quantité totale de porphyrine introduite est élevée. Ceci est lié à l'extinction de fluorescence des billes par la TMPyP, comme observé en fluorescence stationnaire. Les déclins sont complexes. Afin de mieux caractériser l'effet de l'ajout de TMPyP au déclin de fluorescence des billes, nous présentons à la figure V.40 l'évolution de la constante de vitesse moyenne (définie au chapitre III) avec la quantité totale de porphyrine par unité de surface :

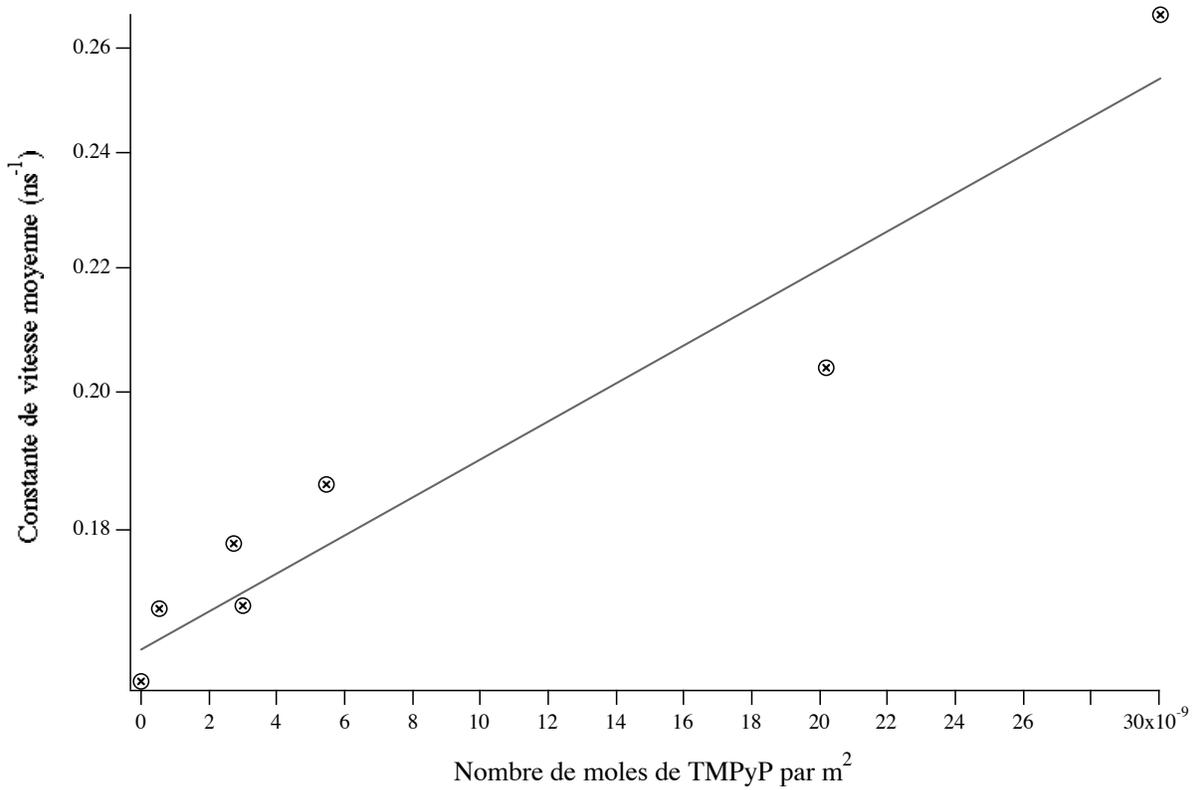


Figure V.40. *Evolution de la constante de vitesse moyenne en fonction du nombre de moles de porphyrine par unité de surface.*

Un ajustement linéaire donne une pente de $3.10^6 \pm 4.10^5 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{ns}^{-1}$.

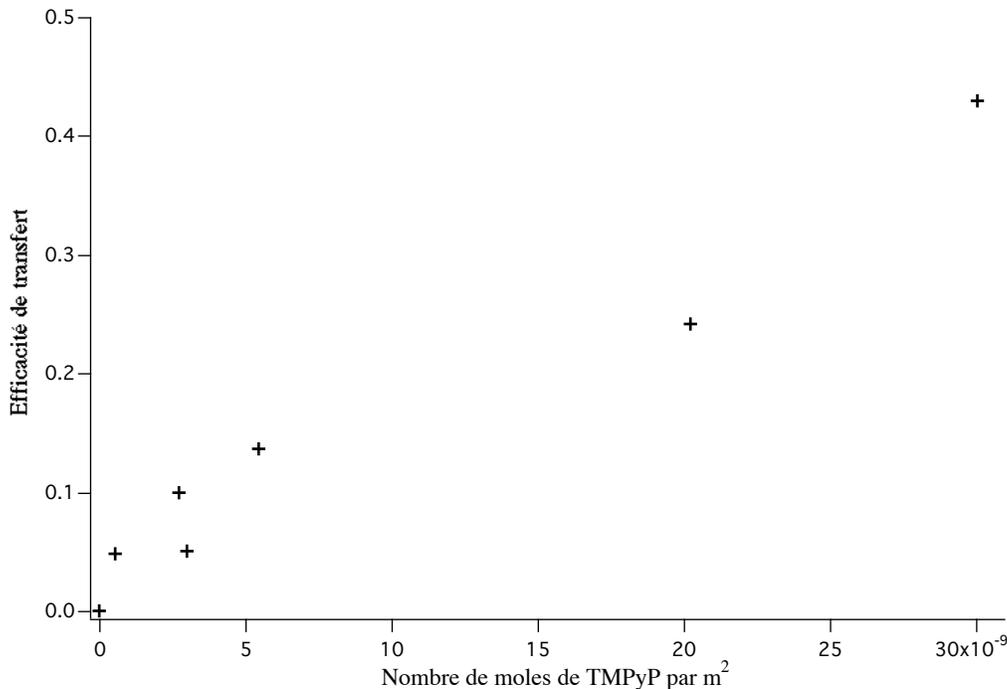


Figure V.41 *Evolution de l'efficacité du transfert d'énergie des latex « Orange 40 carboxylate » vers les molécules de porphyrines.*

Si nous nous intéressons à l'efficacité de transfert, nous constatons que pour 110 molécules de porphyrine pour une bille (soit 440 nm^2 i.e 7% de la surface d'une bille) l'efficacité de transfert est de 50%. Le seuil de détection se situe au delà de 10 molécules de TMPyP pour une bille (avec une efficacité d'environ 10%). Les billes de latex sont donc sensibles à la présence de TMPyP.

V.2.3.2. *Ajout d'ions métalliques.*

V.2.3.2.A. *Ajout d'ions Cadmium(II)*

- Fluorescence stationnaire

Nous travaillons avec une longueur d'onde d'excitation de 495 nm afin de sonder la fluorescence des billes de latex. A une solution aqueuse de latex ($2,9 \cdot 10^{15}$ billes.L⁻¹) nous avons ajouté $1,5 \cdot 10^{-9}$ moles de TMPyP soit environ 100 molécules de TMPyP pour une bille, nous avons attendu que l'équilibre soit atteint, puis nous avons ajouté des ions cadmium en large excès (environ 200 fois plus d'ions que de TMPyP). Nous avons au préalable vérifié que l'ajout d'ions cadmium(II) ne modifie pas l'intensité du spectre d'émission de fluorescence des latex seuls en solution. L'effet des ions cadmium sur les latex en présence de TMPyP est assez rapide (pas d'évolution au delà de quelques dizaines de minutes). L'ajout de porphyrine déjà métallée par du cadmium est équivalent à l'ajout de cadmium à une solution de latex-TMPyP.

Nous présentons sur la Figure V.42 le tracé de Stern-Volmer consécutif à l'ajout de porphyrine à l'échantillon de latex puis à l'ajout d'ions cadmium(II). L'ajout d'ions cadmium(II) induit une extinction de fluorescence accrue. Il semblerait que la métallation ait bien eu lieu. Nous n'avons pas été jusque-là en mesure de caractériser les propriétés spectroscopiques de l'espèce adsorbée-métallée.

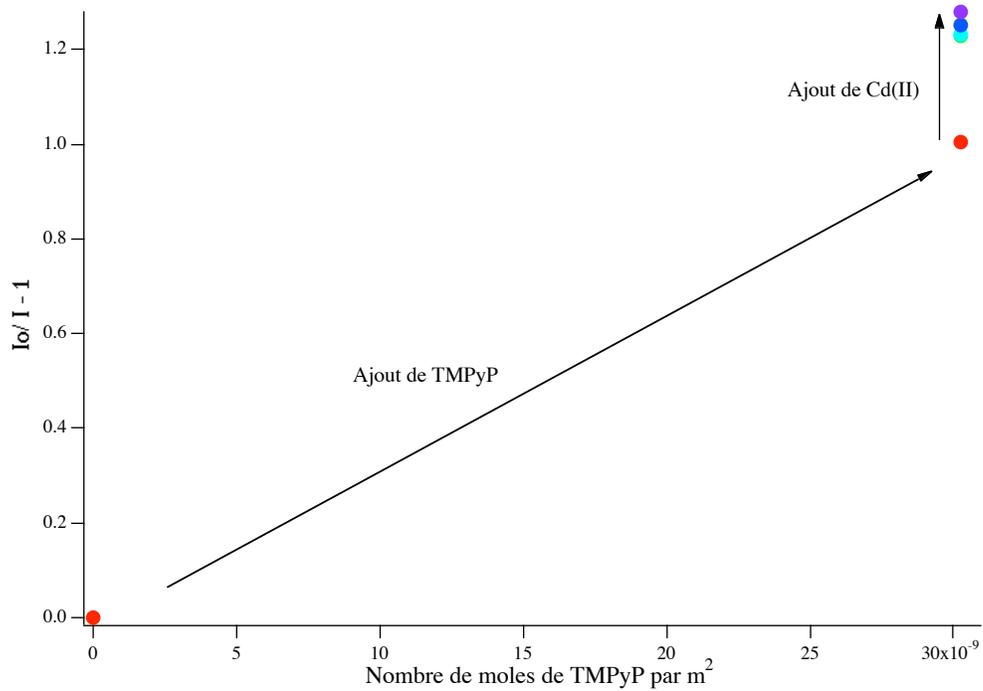


Figure V.42. *Tracé de Stern-Volmer pour un échantillon de latex « Orange 40 carboxylate » mis en présence de TMPyP, puis ajout d'ions cadmium(II)*

- Fluorescence résolue en temps

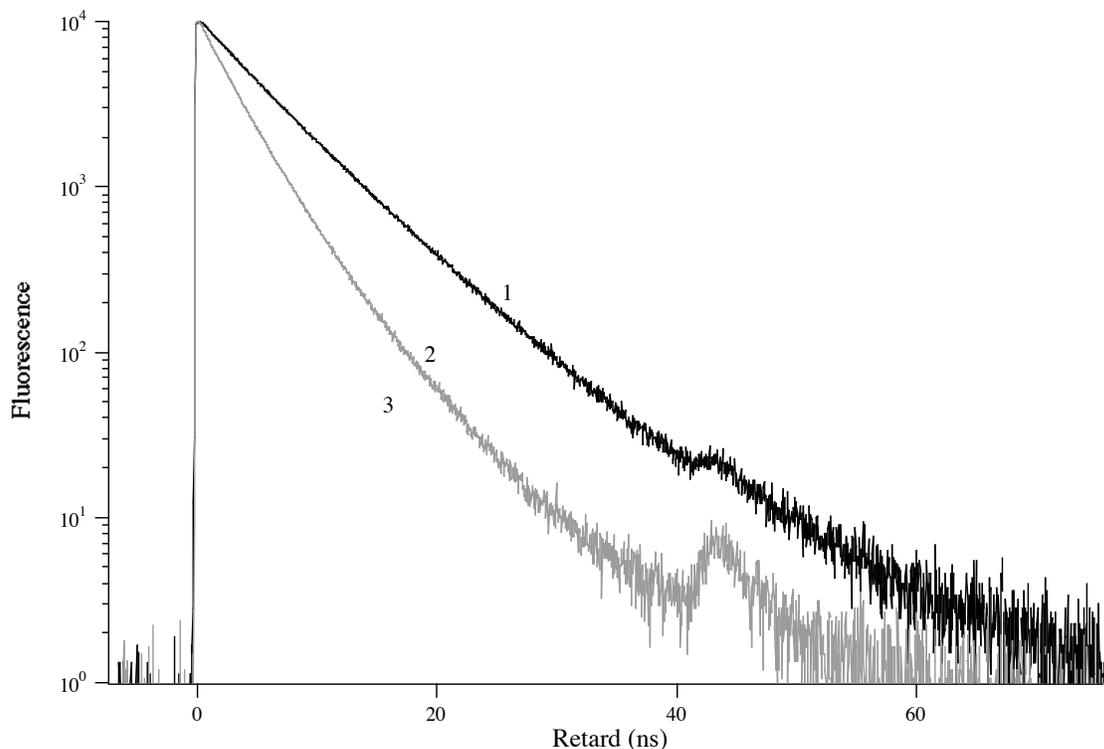


Figure V.43. *Déclins de fluorescence - Excitation 495 nm*
1) *Latex seuls ($2,9 \cdot 10^{15}$ billes.L⁻¹)*
2) *Latex et TMPyP (100 molécules pour une bille)*
3) *Latex et TMPyP (100 molécules pour une bille) et ajout d'ions cadmium(II) en excès.*

Nous avons travaillé avec le montage décrit en annexe B, nous présentons tout d'abord les déclins de fluorescence de l'échantillon décrit au paragraphe ci-dessus (figure V.43). Nous constatons que le déclin devient plus rapide après ajout d'ions cadmium(II). Nous avons vérifié au préalable que le déclin des billes en solution n'est pas modifié par l'ajout d'ions métalliques. Nous présentons ci-après l'évolution de la constante de vitesse moyenne du déclin lors de l'ajout de porphyrine suivi de l'ajout d'acétate de cadmium :

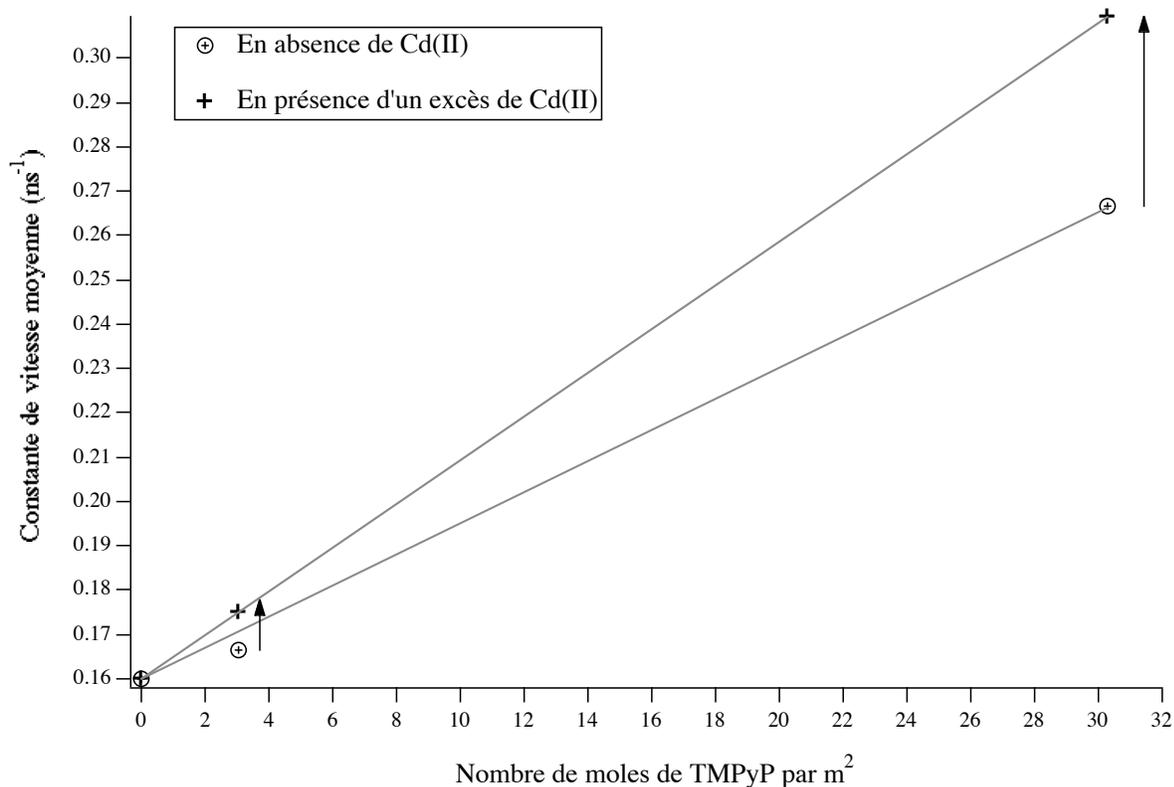


Figure V.44. *Constante de vitesse moyenne en fonction de la quantité de porphyrine, et selon la nature de la porphyrine (métallée ou non).*

Les ajustements linéaires donnent pour la porphyrine non métallée une pente (à +/- 10 %) de $3,4 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{ns}^{-1}$ et pour la porphyrine de cadmium $4,9 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{ns}^{-1}$.

Sachant que les ions cadmium n'influent pas sur les propriétés de fluorescence des billes, ni en fluorescence stationnaire ni en fluorescence résolue en temps, l'effet de l'ajout des ions métalliques en présence de porphyrine montre que l'espèce B (TMPyP protonée adsorbée) se métalle.

Nous pouvons donc discriminer avec les latex une porphyrine d'une porphyrine métallée par des ions cadmium. Il nous reste maintenant à étalonner notre éventuel capteur et à déterminer le seuil de sensibilité en ion métallique.

V.2.3.2.B. Ajout d'ions Plomb(II)

- Fluorescence stationnaire

Nous avons travaillé dans les mêmes conditions que précédemment : échantillon de latex à $2,9 \cdot 10^{15}$ billes.L⁻¹ et ajout de porphyrine de telle sorte qu'il y ait 100 molécules pour une bille, puis ajout d'ions plomb(II) en excès. Nous avons également travaillé avec un échantillon où le rapport du

nombre de molécules de porphyrine et celui du nombre de billes est de 740. Les ions métalliques ne modifient pas le spectre d'émission de fluorescence des billes.

Voici tout d'abord quelques spectres d'émission de fluorescence :

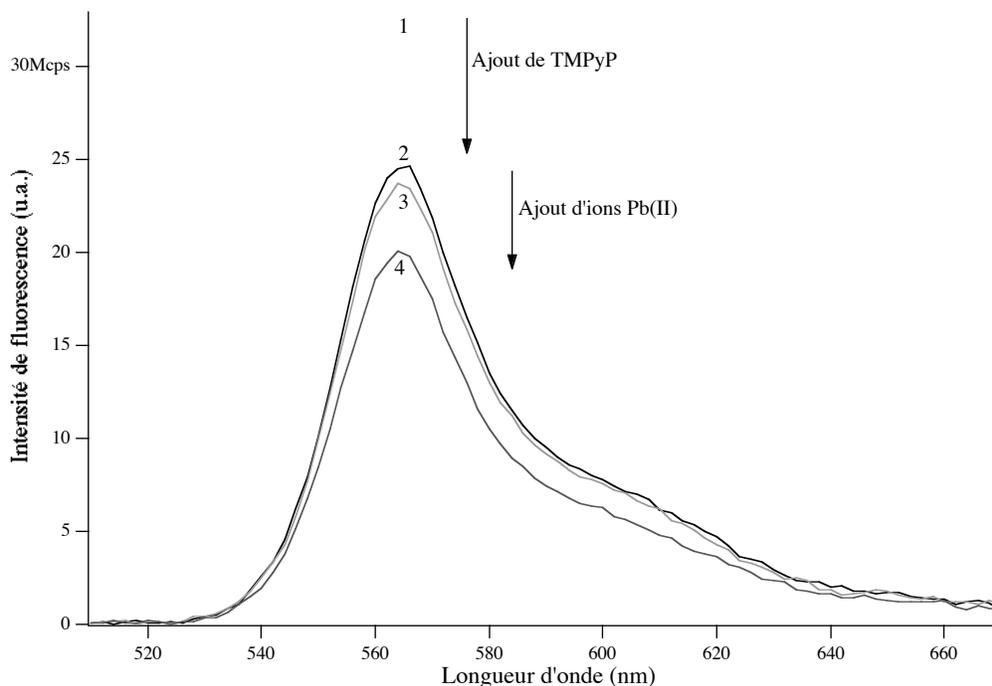


Figure V.45. Spectres d'émission de fluorescence -Excitation : 495 nm
1) Latex seuls ($2,9 \cdot 10^{15}$ billes.L⁻¹)
2) Latex et TMPyP ($2 \cdot 10^{-8}$ mol.m⁻²) : 730 molécules pour une bille
3) Latex, TMPyP ($2 \cdot 10^{-8}$ mol.m⁻²), et plomb(II) en défaut (dix fois moins que de porphyrine)
4) Latex, TMPyP ($2 \cdot 10^{-8}$ mol.m⁻²), et plomb(II) en excès (trois fois plus que de porphyrine)

L'ajout d'ions plomb(II) se corrèle à une diminution de l'intensité de fluorescence.

Nous présentons à la Figure V.46 le tracé de Stern-Volmer pour deux concentrations de porphyrine.

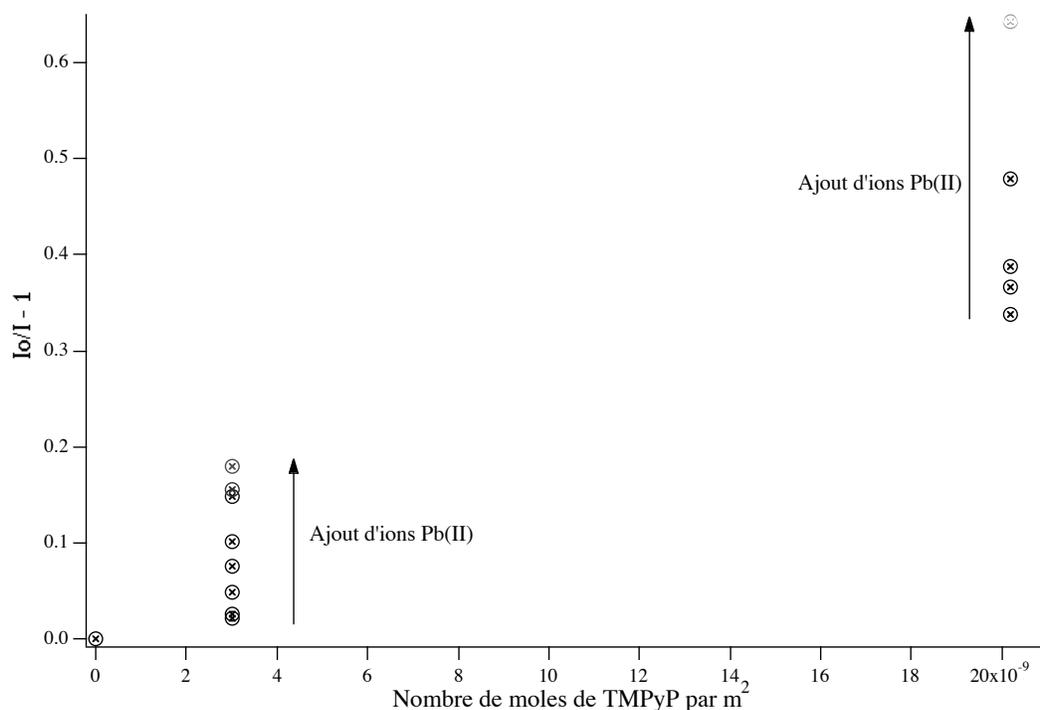


Figure V.46. *Tracé de Stern-Volmer lorsque les latex sont mis en présence de TMPyP, puis d'ions plomb(II).*

L'ajout d'ions plomb(II) induit une augmentation de l'extinction de fluorescence des billes. Il faut toutefois noter que la cinétique de métallation est très lente et reste à étudier. Pour cette raison nous n'avons pu déterminer avec une précision satisfaisante la pente des tracés de Stern-Volmer.

- Fluorescence résolue en temps

Les mêmes échantillons que précédemment ont été étudiés. Aucun effet des ions métalliques n'a été observé sur l'allure du déclin de fluorescence des billes en absence de porphyrine. Quelques heures après ajout de porphyrine, nous avons ajouté des ions plomb(II) : nous n'avons pas été en mesure d'observer de différence.

V.2.3.2.C. *Ajout d'ions Mercure(II)*

- Fluorescence stationnaire

L'ajout d'acétate de mercure(II) en excès à des échantillons de billes de latex et porphyrine induit une diminution de l'intensité de fluorescence.

Nous avons également comparé deux échantillons de billes de latex où pour le premier la porphyrine base libre a été tout d'abord ajoutée, puis après quelques heures de l'acétate de

mercure a été mis en excès. Le second échantillon consiste en une solution de latex (même concentration que précédemment) à laquelle a été ajoutée de la porphyrine métallée par du mercure(II) en même quantité que la porphyrine base libre de l'échantillon précédent. Les spectres de fluorescence stationnaires sont identiques : ainsi l'adsorption de porphyrine métallée par du mercure(II) est équivalente à l'adsorption de porphyrine suivie de la métallation.

- Fluorescence résolue en temps

Pour comparer l'effet de la porphyrine et de la porphyrine métallée, nous présentons à la figure V.47 l'évolution de la constante de vitesse moyenne :

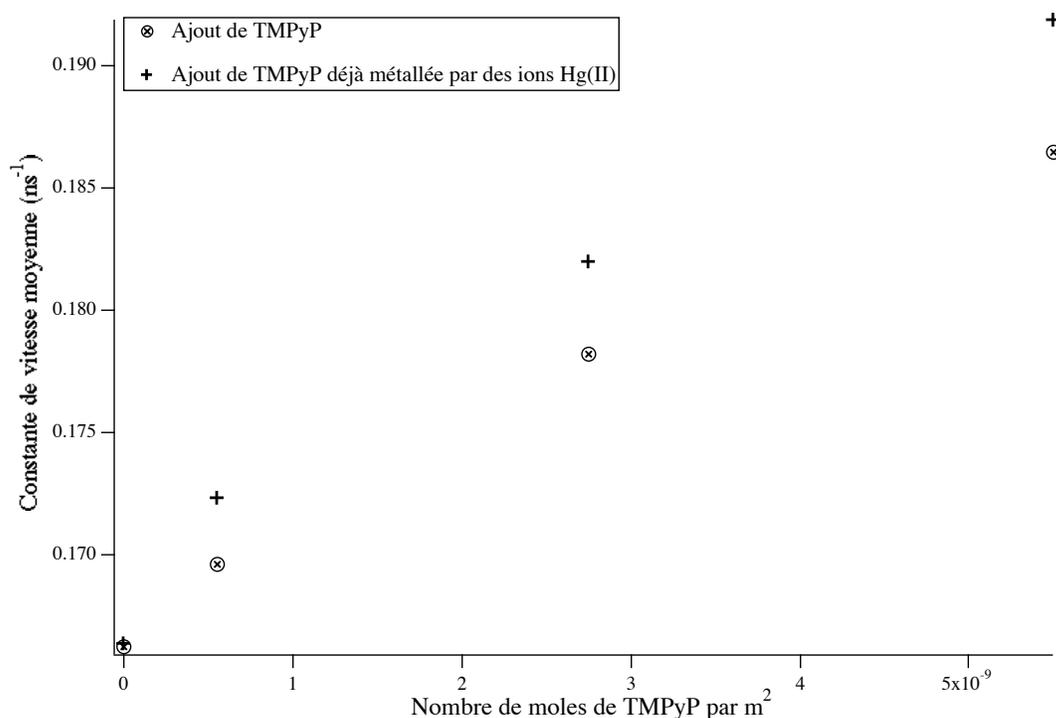


Figure V.47. Evolution de la constante de vitesse moyenne avec la quantité de porphyrine et selon la nature de la porphyrine (métallée ou non).

L'ajout de porphyrine base libre puis d'acétate de mercure(II) et l'ajout de porphyrine métallée sont équivalents. L'effet d'extinction de la fluorescence est plus marqué dans le cas de la porphyrine de mercure. Nous pouvons donc discriminer porphyrine et porphyrine métallée. La constante de vitesse moyenne se corrèle de façon linéaire avec la quantité de porphyrine : la pente est différente selon la nature de la porphyrine. Nous avons trouvé une pente de $3,4 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{ns}^{-1}$ pour la porphyrine, et $4,4 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{ns}^{-1}$ pour la porphyrine métallée par du mercure(II). cette constante de vitesse est du même ordre de grandeur que celle mesurée pour la porphyrine de cadmium, quoique légèrement plus faible.

V.2.4. Conclusions

Nous avons étudié ici l'interaction entre la TMPyP et les latex « Orange 40 carboxylate ». Les expériences de spectroscopie d'absorption comme de fluorescence ont montré que la porphyrine s'adsorbe, vraisemblablement en se protonant, à la surface des latex. L'équilibre est atteint après quelques heures. La TMPyP non métallée induit une extinction de la fluorescence des billes, l'effet est proportionnel à la quantité de porphyrine. Les billes « Orange 40 carboxylate » sont donc sensibles à la présence de TMPyP non métallée. Le seuil de détection se situe autour de 10 molécules de porphyrine pour une bille. Pour environ 10 fois plus de TMPyP l'efficacité de transfert atteint 50 %.

	Efficacité d'extinction ($\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{ns}^{-1}$)
TMPyP	$3,4 \cdot 10^6$
TMPyP-Cd	$4,9 \cdot 10^6$
TMPyP-Pb	0
TMPyP-Hg	$4,4 \cdot 10^6$

Tableau V.3. *Synthèse des efficacités de transfert lorsque les latex « Orange 40 carboxylate » sont en présence de TMPyP base libre ou métallée*

L'ajout d'ions métalliques à une solution billes-TMPyP *i.e* support-sonde donne lieu à des changements des propriétés de fluorescence des latex. L'ajout de plomb(II) donne de façon surprenante des effets en fluorescence stationnaire (le quenching est exalté) mais aucun effet sur les déclin. L'ajout de mercure(II) et de cadmium(II) en excès conduit à une exaltation du phénomène d'extinction, tant en fluorescence stationnaire qu'en fluorescence résolue en temps. La porphyrine adsorbée peut être totalement métallée. Les latex « Orange 40 carboxylate » sont capables de discriminer une porphyrine non métallée d'une porphyrine métallée par du mercure(II) ou du cadmium(II). Les effets sur les temps de déclin de la TMPyP-Hg et de la TMPyP-Cd sont sensiblement identiques. Il semble donc difficile de distinguer les deux espèces.

V.3. Synthèse, bilan

Nous avons essayé d'illustrer dans cette étude la modularité de notre concept support-sonde à base de latex fluorescents « Orange 40 carboxylate ». Nous avons en particulier étudié l'interaction

d'une protéine, le Cytochrome C, avec les billes afin de mettre au point un capteur de potentiel d'oxydoréduction. Le Cytochrome C s'adsorbe sur les latex, bien qu'il ne pénètre pas dans les latex il induit une extinction de la fluorescence. Le changement de degré d'oxydation du métal central module la réponse lumineuse du latex : lorsque le Cytochrome passe de l'état oxydé à l'état réduit le phénomène de quenching est exalté. Le couple billes « Orange 40 carboxylate »- Cytochrome C répond donc aux exigences d'un capteur selon notre concept initial.

L'interaction d'une porphyrine hydrosoluble s'est montrée très intéressante : la TMPyP s'adsorbe sur les latex en se protonant, elle induit une extinction de la fluorescence des billes. Celle-ci est accrue par la métallation de la porphyrine. La réponse des billes est modulée par l'état métallé ou non métallé de la sonde. Il nous reste à étudier la sélectivité de la TMPyP adsorbée sur les latex par rapport à des ions lourds comme le cadmium(II), le mercure(II) ou le plomb(II).



VI. CONCLUSION

Bilan de notre approche

Nous avons montré la faisabilité d'une approche de capteur où les fonctions de détection et de signalisation sont séparées. Nous avons choisi comme supports lumineux des nanosphères fluorescentes. Elles servent de transducteurs. Nous avons exploré la modularité du capteur en essayant plusieurs molécules sondes adsorbées à la surface des billes. Nous avons montré que l'information entre la détection (sonde) et la signalisation (bille) est relayée par transfert d'énergie.

Nous avons évalué quatre supports : des « Orange Fluospheres® » de taille différente et de groupes de surface différents. Nous avons caractérisé les propriétés spectroscopiques du fluorophore emprisonné dans la matrice (BODIPY) ainsi que dans le toluène. Les billes de plus petite taille (20 et 40 nm) semblent être des supports où l'effet d'antenne est le plus efficace. Comme nous envisageons des interactions électrostatiques entre les billes et les molécules sondes les latex « Orange 40 carboxylate » semblent être les meilleurs candidats de par leur densité surfacique de charge élevée.

Les premières études ont porté sur l'interaction du Bleu de Méthylène (indicateur coloré d'oxydoréduction) avec les billes. Nous avons caractérisé l'adsorption du BM sur les billes selon un modèle de Langmuir. L'affinité du BM pour les latex anioniques est forte. La quantité de BM adsorbé module la réponse lumineuse des supports. Il y a inhibition ratiométrique de la fluorescence des billes par le BM. L'extinction est d'autant plus efficace que la taille des latex est petite. Ainsi le

seuil de détection du BM est de quelques centaines de molécules pour une bille pour les « Orange 100 carboxylate », environ 5 BM pour une bille de « Orange 40 carboxylate » et 1 molécule pour un latex « Orange 20 carboxylate ».

Des essais de réduction du BM adsorbé à la surface de billes « Orange 40 carboxylate » se sont révélés concluants : la réponse des billes est sensible à l'état redox de la sonde.

L'adsorption de quantités variables de Cytochrome C induit également des modulations de la fluorescence (intensité et durée de vie) des billes « Orange 40 carboxylate ». La réduction du métal central de la protéine induit une plus grande extinction de la fluorescence des supports. Nous avons un système bille-Cytochrome sensible au potentiel d'oxydoréduction.

L'étude de la métallation d'une porphyrine hydrosoluble (tétraméthylpyridinium porphyrine TMPyP) en solution aqueuse nous a permis de caractériser ses propriétés de sondes à métaux lourds (Hg(II), Pb(II), Cd(II)). Nous avons ensuite montré que la fluorescence des latex « Orange 40 carboxylate » dépend de l'état métallé ou non métallé de la TMPyP. Nous pouvons a priori discriminer l'effet des ions plomb de celui des ions cadmium et mercure.

Les systèmes (billes-sondes) décrits ci-dessus demandent à être calibrés. Nous tenons à signaler que ces études sont préliminaires, et l'aspect capteur n'est pas toujours facile à mettre en exergue car les systèmes étudiés sont particulièrement complexes. Nous avons en effet montré que les billes se sont révélées sensibles à différentes molécules mais la dynamique des mécanismes d'extinction n'est pas élucidée.

Afin de mieux caractériser les supports, des billes de 100 nm de diamètre ont été immobilisées dans des films de poly(vinyl alcool). Des études de billes individuelles ont été faites grâce à la microspectroscopie résolue en temps. Nous avons ainsi montré que la réponse (en terme de durée de vie) d'une bille à une excitation lumineuse ne dépend pas de la bille choisie. Ces nano-objets sont de bons supports potentiels pour des capteurs puisque leur réponse ne dépend pas du milieu (eau ou matrice de PVA). Des mesures avec des billes uniques sont envisageables puisque la réponse est indépendante de la bille. L'étude de systèmes billes-Bleu de Méthylène en matrice a révélé des hétérogénéités de concentration en BM autour des billes. Les latex sont donc sensibles individuellement à des concentrations locales différentes.

Plusieurs questions sont restées sans réponse. Nous n'avons pas élucidé la répartition des fluorophores dans les billes. Le mode d'extinction des billes par les sondes reste complexe. Des expériences plus approfondies d'anisotropie résolue en temps, d'absorption transitoire ou l'utilisation de techniques pompe-sonde pourraient permettre de mieux caractériser le système. Des

simulations de type Monte-Carlo pourraient éventuellement permettre de modéliser le comportement d'un ensemble bille-sonde ou du moins d'éliminer certains modèles.

Pour les plus petites billes (40 et 20 nm) l'adsorption des molécules demanderait à être mieux caractérisée. Nous nous proposons en particulier de procéder à des expériences d'ultracentrifugation afin d'évaluer la quantité de sonde adsorbée.

Perspectives

Une des principales inconnues de cette étude est la connaissance des billes qui nous servent de support. Afin de mieux maîtriser le système que nous élaborons nous nous proposons de synthétiser un analogue de BODIPY que nous injecterons dans des billes. Nous caractériserons tout d'abord les propriétés physico-chimiques et optiques du fluorophore (coefficient d'absorption molaire, rendement quantique de fluorescence, durée de vie, solvatochromisme ...). Nous aurons donc une connaissance précise des caractéristiques du chromophore. Une fois cette étude menée, en partenariat avec l'entreprise Estapor nous souhaitons doper des billes de polymère avec le fluorophore. Des études en films (de même nature que les billes) devraient pouvoir nous éclairer sur le comportement des fluorophores dans un polymère. L'association avec Estapor nous permettra d'avoir des informations précises sur la nature des billes, leur mode de synthèse, leur mode de chargement. En faisant varier les paramètres précédents il nous semble possible de mieux caractériser la distribution des fluorophores à l'intérieur des billes. Si les billes sont de diamètre suffisant, nous souhaiterions développer des études d'imagerie sous microscope afin d'interroger des particules individuelles. Nous envisagerons l'élaboration de systèmes de capteurs sur le schéma présenté dans cette étude. Nous suggérons cependant un greffage covalent, moins aléatoire que l'adsorption, des sondes à la surface des billes. Après les étapes de couplage et lavage, il sera possible de caractériser le nombre de molécules sondes greffées.

Nous pouvons proposer une mise en oeuvre de nos capteurs dans des matrices poreuses mais non solubles dans l'eau (une matrice sol-gel par exemple). Si les billes sont couplées à des molécules sondes et si la réponse du film avant exposition à un analyte est calibrée il est possible de mettre la matrice en présence d'une solution d'analyte et d'étudier d'une part la diffusion de l'analyte dans le sol-gel par fluorescence, et d'autre part de doser l'analyte si la réponse des billes-sondes est modulée par la quantité d'analyte. Il pourrait être intéressant de mélanger dans un même film des billes greffées par des sondes spécifiques répondant à différents analytes. Il serait alors possible de détecter plusieurs ions ou molécules simultanément.

Quoiqu'il en soit ces billes de latex fluorescentes ouvrent certainement de plus larges perspectives. Les champs d'investigation sont multiples et nous croyons que ces billes sont porteuses de nombreuses potentialités. La micromanipulation de ces objets nous semblent particulièrement attrayante, par exemple pour l'étude *in vivo* et la mesure de concentrations locales. Nous pouvons aussi imaginer de greffer des molécules A sur une bille et des molécules B sur une autre bille. En manipulant les billes et en les rapprochant il serait possible d'étudier les réactions de couplage entre les molécules A et B. Il s'agirait d'études à l'échelle moléculaire, les billes servant de supports et de transducteurs.



Annexe A : PARTIE EXPERIMENTALE

Spectroscopies d'absorption et de fluorescence stationnaire

Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectrophotomètre U.V.-vis. Cary 500, double faisceau, avec 0,1 nm de précision en longueur d'onde.

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont été mesurés avec un spectrofluorimètre SPEX Fluorolog-3 (Jobin-Yvon). La résolution est de 0,2 nm. Nous travaillons en cuve, dans la configuration où les faisceaux sont à angle droit. La densité optique des échantillons est inférieure à 0,1 afin d'éviter les effets de réabsorption. Dans le cas contraire les spectres sont corrigés de l'absorption. Les spectres sont corrigés de la variation spectrale de la sensibilité de détection. La longueur d'onde d'excitation est identique à celle utilisée pour les expériences de fluorescence résolue en temps.

Dissolution des billes de latex dans du toluène.

On utilise du toluène de qualité HPLC, à un taux de pureté de 99,5% (Aldrich Chemicals).

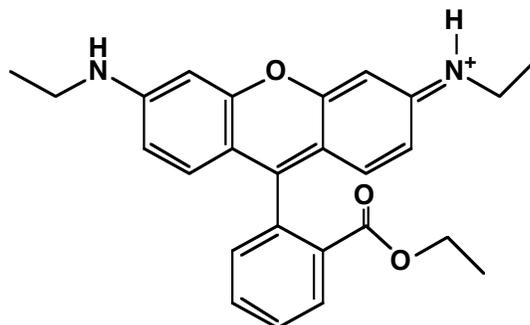
On prélève 100 μ L ou 50 μ L des solutions commerciales de latex, auxquels on ajoute 5 mL de toluène. Chaque échantillon est alors mis deux heures dans une cuve à ultra-sons, afin de solubiliser le polystyrène. Puis on laisse décanter les solutions deux jours à l'abri de la lumière, et à température ambiante. Chaque échantillon est ensuite filtré et lavé avec du toluène, sur célite 521 (Prolabo), et avec un fritté de porosité 3. Le volume de toluène de lavage est contrôlé grâce à une burette de 100 mL. Chaque filtrat est stocké à l'abri de la lumière, et à 4°C.

Type de billes	Volume de latex (μL)	Volume de toluène (mL)
Orange 100 sulfate	100	5+84
Orange 100 carboxylate	100	5+50
Orange 40 carboxylate	50	5+60
Orange 20 carboxylate	100	5+60

Tableau A.1. *Extraction du colorant BODIPY des billes de latex.*

Mesure du rendement quantique de fluorescence du fluorophore dans le toluène, et dans la matrice polymérique.

On utilise le chlorure de Rhodamine 6G (ou Rhodamine 590) comme référence (Exciton). Cette molécule a un rendement quantique de fluorescence de $\phi_F=0,83$ dans le méthanol¹⁶⁰.



Rhodamine 6G , M=479,02 g/mol

Dans le méthanol, $\epsilon=102000 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

La densité optique, à 540 nm, de l'échantillon de référence a été ajustée de façon à ce qu'elle soit identique à celle du fluorophore dans le toluène. L'absorbance est inférieure à 0,05 afin d'éviter les effets de filtre interne. Les spectres de fluorescence sont corrigés des effets de dépendance en longueur d'onde.

Le rendement quantique a été calculé selon l'équation suivante :

$$\phi_{BDY} = \frac{S_{BDY}}{S_{ref}} * \phi_{ref} * \frac{A_{ref}}{A_{BDY}} * \left(\frac{n_{BDY}}{n_{ref}}\right)^2$$

où ϕ_{BDY} et ϕ_{ref} sont respectivement les rendements de fluorescence du fluorophore (dans le toluène ou l'eau) et de la référence (dans le méthanol) ; S_{BDY} et S_{ref} l'aire sous la courbe des spectres d'émission de fluorescence, respectivement du fluorophore et de la référence ; A_{BDY} et A_{ref} l'absorbance au maximum d'absorption du fluorophore (539 nm dans le toluène, 542 nm dans la matrice), respectivement du BODIPY et de la référence ; n_{BDY} est l'indice du toluène ou de l'eau, et n_{ref} est l'indice du solvant méthanol.

Nous avons utilisé les valeurs suivantes pour les indices de réfraction¹⁶¹ : $n_{\text{MeOH}}=1,3288$ - $n_{\text{toluène}}=1,4961$ - $n_{\text{eau}}=1,33$.

Préparation des solutions tampons

Les tampons à pH et force ionique constante ont été préparés selon des modes opératoires décrits dans la littérature¹⁶². Ce sont des tampons à base d'acide phosphorique, acide acétique glacial, et acide borique. L'ajout de soude permet d'ajuster le pH. Le contrôle de la force ionique est réalisé par ajout de perchlorate de potassium.

Préparation des échantillons de latex, des solutions de BM.

Nous utilisons des billes commercialisées par Molecular Probes. Elles sont livrées en suspension aqueuse, en présence d'azide (agent antibactérien). Ces solutions sont dites solutions « mères ». Elles sont conservées à l'abri de la lumière, à 4°C. Avant toute préparation d'échantillon, elles sont toujours préalablement soumises à quelques minutes de sonication. Les échantillons dilués sont toujours constitués de quelques microlitres de solution « mère » de latex, ajoutés à quelques millilitres (4 ou 5 selon les cas) d'eau distillée et désionisée.

Le Bleu de Méthylène (Aldrich Chemicals, pureté 97%) est utilisé sans aucune purification. Une quantité connue de BM est pesée, puis dissoute dans une fiole jaugée avec de l'eau distillée et désionisée. Les solutions de BM sont toujours « fraîches », en effet ce colorant a tendance, avec le temps, à s'adsorber sur les surfaces de verre. Il faut donc veiller à n'utiliser que des solutions « fraîches ».

Préparation des solutions de porphyrine et de Cytochrome C.

Les solutions de porphyrine ont été préparées à partir de TMPyP synthétisée au laboratoire. Le tampon est un tampon phosphate (pH=7,2 Aldrich). Les ions lourds sont ajoutés sous forme d'acétates (Aldrich ou Prolabo).

Nous avons utilisé du Cytochrome C extrait du coeur de cheval (Aldrich Chemicals). Nous avons toujours travaillé en milieu tamponné, Tampon Hepes (pH=7,35 à 20°C).

Expériences d'ultrafiltration sur les billes « Orange 40 carboxylate » et « Orange 20 carboxylate »

Nous avons utilisé des tubes Centricon 50 et 100 de chez Millipore, dont la membrane est en cellulose régénérée ce qui permet d'éviter les adsorptions spécifiques. Le seuil de coupure est respectivement à 50000 Da soit 2-3 nm et 100000 Da soit 5-8 nm. Après avoir versé les échantillons (billes et BM dans l'eau), il faut centrifuger à 5000 rpm pendant 10 minutes.

Nous avons aussi essayé des tubes d'ultrafiltration UltraFree-4 de chez Millipore-Amicon dont la membrane est en polyéther-sulfone avec un seuil de coupure est à 10000 Da. La méthode de centrifugation est la même que précédemment. Dans les deux cas il nous a été impossible d'accéder à la quantité de BM libre, car le colorant s'adsorbe totalement sur la surface des membranes des tubes d'ultrafiltration.

Préparation des films de PVA^{163,120,141}

On utilise du poly(vinyl alcool) à un degré de 80% de saponification (Wako). Il est dissout dans de l'eau distillée de façon à obtenir une solution aqueuse à 1 % en poids de PVA. Les latex (« Orange 100 sulfate » ou « Orange 100 carboxylate ») sont ajoutés pour avoir une solution à environ 0,001% en poids de billes. La solution eau-PVA-latex ainsi obtenue est déposée à la tournette sur des lamelles de microscope : rotation à 300 tours.min⁻¹ pendant 5 s, puis rotation à 1600 tours.min⁻¹ pendant 60 s. L'épaisseur de la couche de PVA au dessus des billes est inférieure à 50 nm.

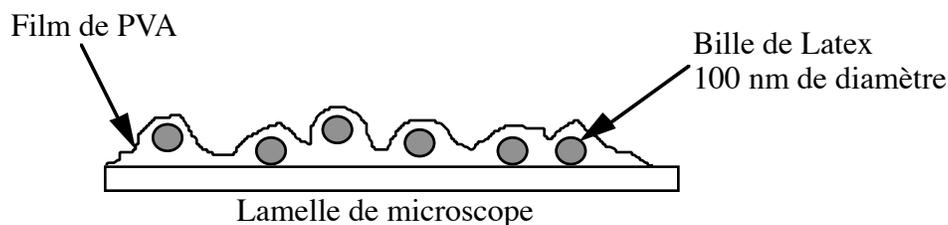


Figure Annexe A.1 Schéma sommaire d'un film de PVA dans lequel des billes de latex ont été immobilisées.

Nous rajoutons du Bleu de Méthylène (Aldrich Chemicals) à la solution eau-PVA-latex, une agitation vigoureuse permet une bonne homogénéisation, puis les films sont préparés à la tournette comme décrit précédemment. Les concentrations de BM sont de $6,06 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et $6,06 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Nous avons testé les différentes façons de préparer les solutions selon l'ordre d'ajout des composés ; soit trois procédures A, B, C.

- **A** 1. Solution de PVA + latex ; 2. ajout de BM
- **B** 1. Solution de PVA + BM ; 2. ajout de latex
- **C** 1. BM + latex ; 2. ajout de la solution de PVA

Nous n'avons observé aucune différence. Nous avons opté pour la procédure A.

Annexe B : Montage de spectroscopie de fluorescence résolue en temps ; Laboratoire P.P.S.M., Ecole Normale Supérieure de Cachan.

Nous présentons figure B.1 le montage utilisé pour mesurer en cuve et sous microscope les déclinés de fluorescence. Le montage expérimental est constitué de trois parties:

- la source de lumière,
- le microscope / la cuve,
- la chaîne de détection.

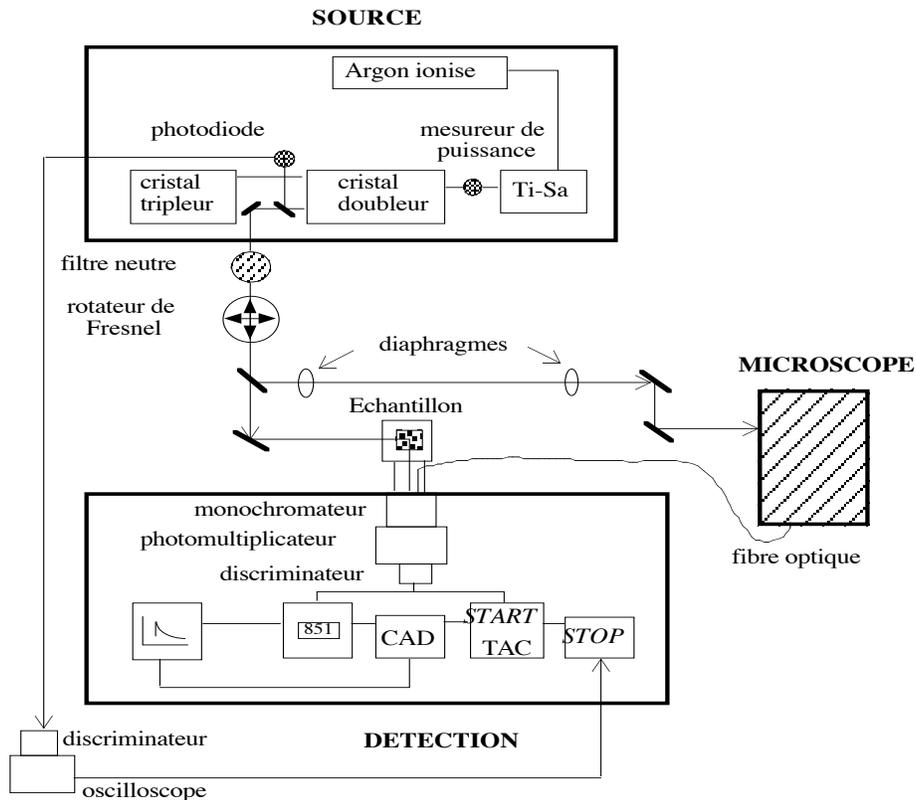


Figure B.1 Montage de spectroscopie de fluorescence résolue en temps.

Le laser est un cristal de Saphir dopé aux ions Titane, pompé par un laser à Argon ionisé. L'ensemble délivre des impulsions de 1.3 ps de largeur à mi-hauteur, avec un taux de récurrence de 82 MHz. Ce taux peut être abaissé à 4 MHz par une cellule de Bragg implantée dans le module doubleur, pour permettre :

- la relaxation complète des échantillons entre deux excitations successives dans le cadre de la fluorescence résolue en temps. La baisse du taux de récurrence correspond à une augmentation du temps séparant deux impulsions voisines.
- la limitation du photoblanchiment de l'échantillon en diminuant la quantité de lumière qu'il reçoit. Ceci permet d'observer un même échantillon pendant plusieurs minutes sans dommage.

Des cristaux doubleur (LBO, lithium tri borate) et tripleur (BBO, barium beta borate) permettent d'obtenir une large gamme de longueurs d'onde.

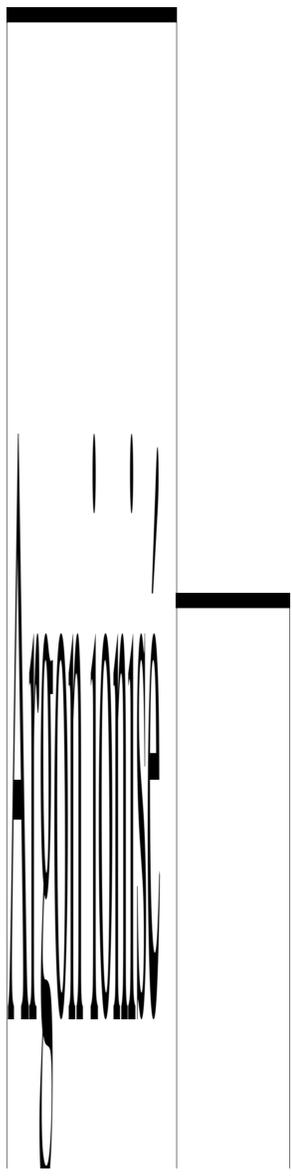


Figure B.2 Longueurs d'onde accessibles avec le montage grâce aux cristaux doubleurs et tripleurs

Le faisceau est ensuite envoyé sur l'échantillon, soit en cuve soit sous microscope. Nous avons travaillé avec une longueur d'onde d'excitation de **497 nm**. Nous présentons Figure B.3 le montage plus détaillé du microscope couplé à une cale piézoélectrique¹⁰⁵.

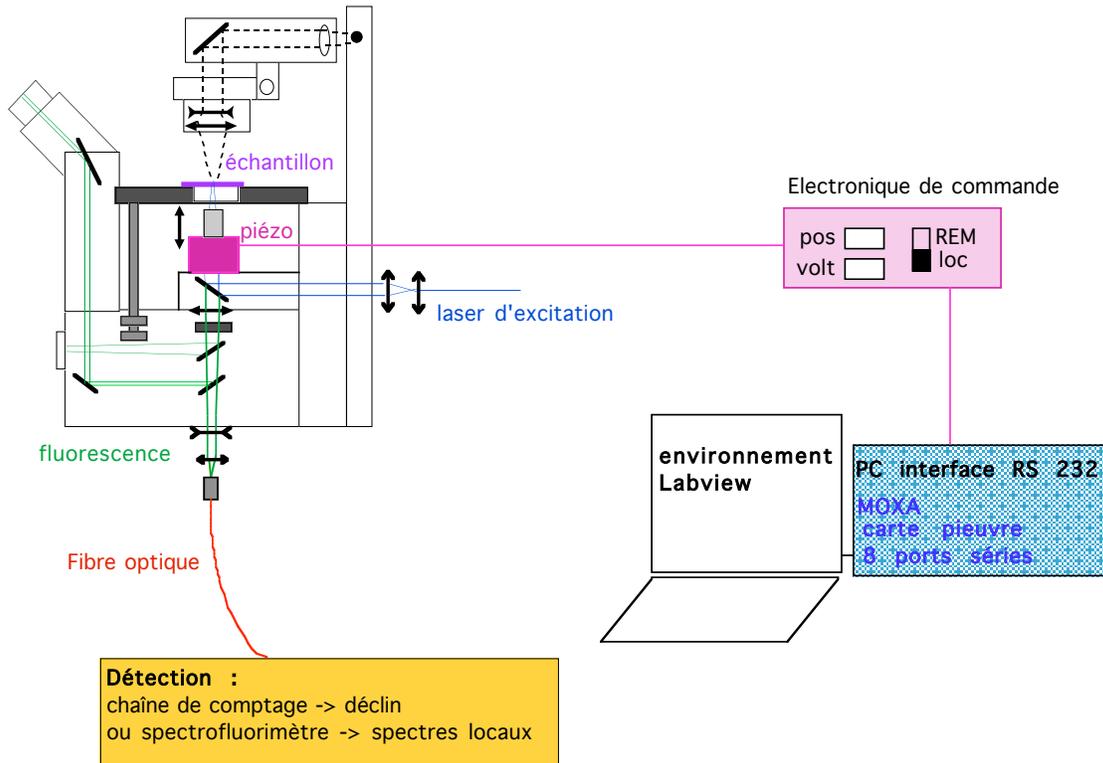


Figure B.3 Schéma détaillé du microscope.

Le microscope est un microscope inversé Nikon Diaphot 200, rendu confocal grâce au positionnement d'une fibre optique qui joue le rôle de diaphragme de détection. Nous avons utilisé un objectif de grossissement 100 à immersion (Fluor 100), d'ouverture numérique 1,3. La profondeur de champ est optimisée de façon à obtenir 0,5-0,45 μm . La largeur du point d'observation est inférieure à 0,5 μm , mais n'a pas été mesurée. Ce montage a été caractérisé par Nathalie Coste pendant ses travaux de thèse.

Annexe C : Montage de microscopie confocale ; Laboratoire du Professeur H. Masuhara, Département de Physique Appliquée, Université d'Osaka, Japon.

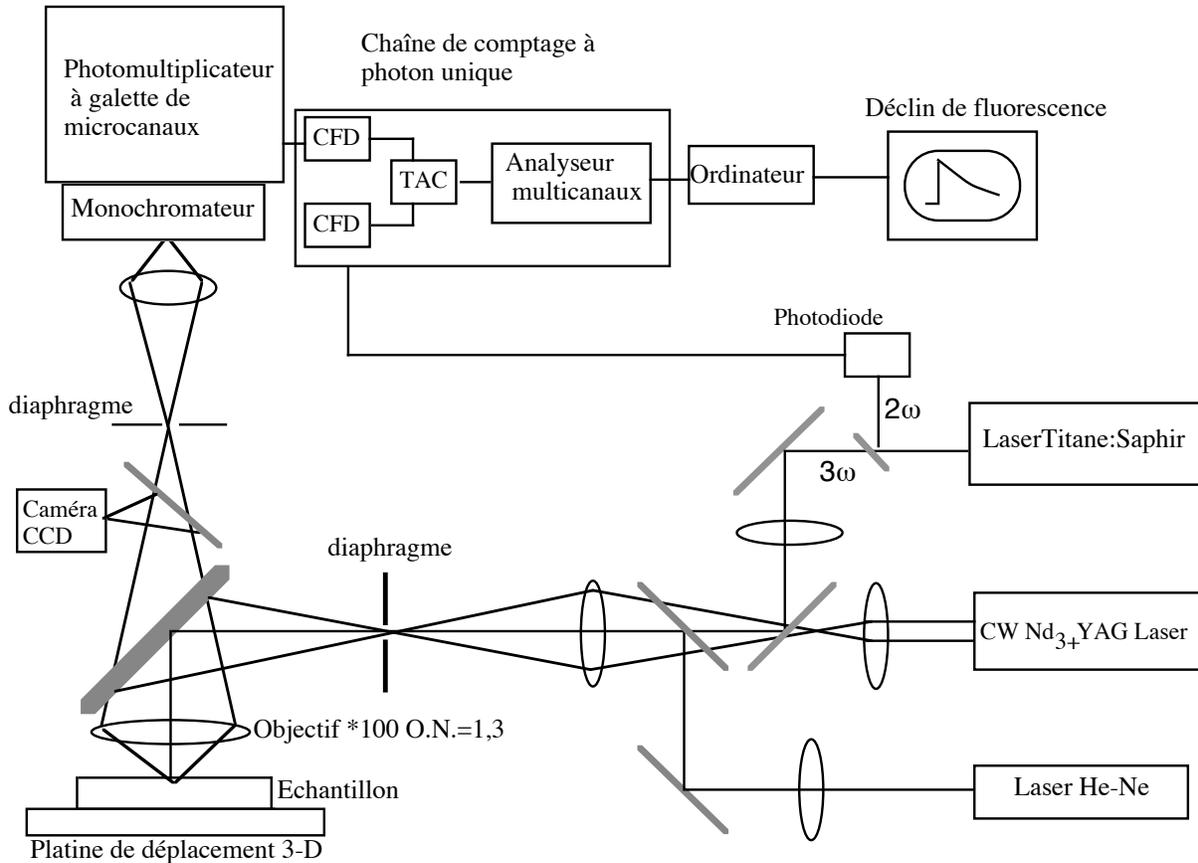


Figure C.1 Montage de microspectroscopie résolue en temps

Ce montage nous a permis de mesurer le déclin de fluorescence de billes uniques, immobilisées en films de PVA. Le microscope confocal (Carl Zeiss, UMSP-60) est couplé avec un laser Titane-Saphir (Spectra Physics, Tsunami, 900 nm, pulse de 2 ps de largeur à mi-hauteur, taux de répétition de 82 MHz). La longueur d'onde d'excitation est fixée à 450 nm, grâce au doublement de fréquence du laser Tsunami, le taux de répétition a été abaissé à 4 MHz grâce à un sélecteur d'impulsions. Les déclins ont été analysés à 560 nm, grâce au monochromateur. Nous n'avons pas utilisé le laser néodyme-YAG (Il sert en effet pour la micro-manipulation d'objets). Le laser He-Ne nous a servi pour régler la confocalité, afin de superposer le point d'excitation et celui d'émission. Ce laser nous a également permis de localiser chaque bille grâce à leur figure de diffraction. En effet, pour « voir une bille », il faut pouvoir distinguer aux oculaires une tâche de fluorescence. Cependant la fluorescence est difficilement détectable à l'oeil. Le point lumineux est faible. Pour

s'assurer d'être sur une bille et non une impureté, nous avons toujours vérifié qu'à un point fluorescent sous excitation correspondaient des anneaux de diffraction avec le laser He-Ne.

Nous avons toujours travaillé avec un objectif de grossissement 100 à immersion. La taille du diaphragme avant le monochromateur est de 0,16 mm. Ainsi le champ d'observation est de $1 \mu\text{m}^2$.

Les déclins ont été accumulés pendant une durée de l'ordre de 20 minutes. Aucun « bleaching » n'a été observé pendant l'accumulation.

Annexe D : Imagerie pour étudier les films de PVA.

Microscope à Force Atomique (A.F.M.) ; Laboratoire du Professeur Masuhara, Département de Physique Appliquée, Université d'Osaka, Japon

Nous avons grâce à l'A.F.M. eu accès aux images topographiques de la surface des films de latex « Orange 100 sulfate » dans le PVA. Le microscope est un Nanoscope III de chez Digital Instruments. Nous avons travaillé en mode « tapping », avec une fréquence de balayage de 2Hz. Les pointes utilisées sont des pointes de silicium, de 10-15 μm de longueur et de 5-20 nm de rayon de courbure.

Microscope à épifluorescence ; Centre de Recherche I.B.M. Zürich, Suisse

Il s'agit d'un microscope Nikon EFD-3. A l'excitation un filtre de bande passante 465-495 nm a été utilisé, et un filtre de bande passante 605-655 nm à l'émission. Une caméra CCD SBIG (Santa Barbara Instrument Group), refroidie, recueille les images pendant 4 secondes. L'acquisition se fait sur 16 bits. Des objectifs de grossissement 20 et 100 à immersion ont été utilisés.

Microscope Optique à Fond Noir ; Centre de Recherche I.B.M. Zürich, Suisse

C'est un microscope Leika Polyvar Sc., avec éclairage lumière blanche. Les objectifs utilisés sont de grossissement 20 ou 100. L'appareil photographique est un Nikon CoolPix 950.

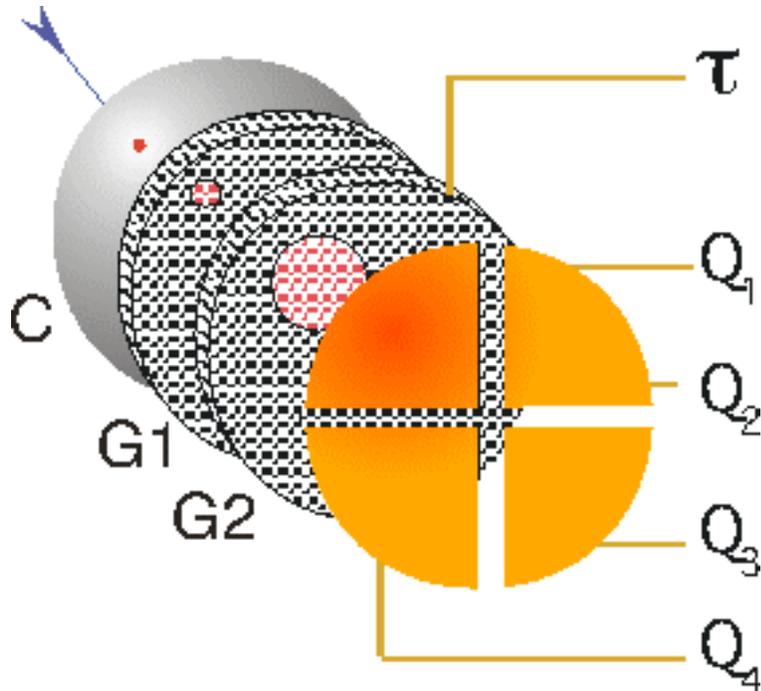
Détecteur imageur (QUAD), PPSM, Cachan

Nous nous sommes trouvé limités en microscopie confocale classique par le nombre de billes que nous pouvions observer dans un temps raisonnable. Nous avons repris cette étude en utilisant un détecteur imageur résolu dans le temps. Ce détecteur (QUAD) est expérimental, il a été mis au point par K. Kemnitz. Son élaboration est en cours de perfectionnement.

Principe de fonctionnement :

Il s'agit d'un photomultiplicateur à galettes de micro canaux dont l'anode est modifiée.

Lorsque qu'un photon (flèche) atteint la photocathode un électron est émit. Cet électron est amplifié dans un canal de la première galette de micro-canaux G1. L'avalanche produite est amplifiée de nouveau dans la galette G2 pour donner en moyenne 10^6 électrons. Au cours de cette amplification l'information spatiale sur la position de l'impact sur la photo-cathode a été conservée.



L'anode est partagée en quatre quadrants. En mesurant la charge collectée par chacun des quarts $Q_1 \dots Q_4$ et en calculant le barycentre, on peut reconstituer l'image présente à la surface de la photocathode. Dans le même temps, pour chaque photon collecté, on mesure le retard à la fluorescence du photon. Les images de 256-256 pixels ont une taille de $100 \times 100 \mu\text{m}$.

Annexe E : Traitements mathématiques

Analyse des déclins de fluorescence

Dans les cas les plus simples (un seul fluorophore, par exemple) le déclin est mono- ou bi-exponentiel (deux conformations du fluorophores par exemple). Dans cette étude les ajustements mono ou multiexponentiels se feront selon la méthodes des moindres carrés, par l'algorithme de Levenberg-Marquardt^{124,125}. Mais il existe rarement une seule espèce fluorescente sous une forme et un environnement unique. Le déclin de fluorescence est alors complexe, mais il peut être décrit comme une somme d'exponentielles⁵ :

$$I(t) = \sum_i \alpha_i * \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (\text{E.1})$$

où α_i représente le poids de la durée de vie τ_i . Chaque composante i peut représenter une espèce i , ou n'avoir aucune réalité physique. Dans ce cas l'expérimentateur pourra préférer des paramètres moyens pour décrire le déclin. Il est possible de calculer la durée de vie moyenne selon⁵ :

$$\bar{\tau} = \frac{\int_0^{\infty} t * I(t) * dt}{\int_0^{\infty} I(t) * dt} \quad (\text{E.2})$$

Les déclins sont obtenus par une technique impulsionnelle couplée à un comptage à photon unique. L'échelle de temps est de l'ordre de 60-70 ns. La largeur de l'impulsion laser Titane-Saphir est inférieure à 2 ps. La durée de vie des espèces est ici de l'ordre de 5-6 ns. Nous avons choisi dans ces conditions de ne pas déconvoluer de la fonction expérimentale.

Un ensemble de déclins peut aussi être analysé selon une « Décomposition en Composantes Principales » ou « Décomposition en Composantes Connues » (Cf. ci dessous)

Méthode de décomposition en Composantes Principales et Connues (Chimio-métrie)

Robert Pansu a implanté ce programme au laboratoire avec le logiciel IgorPro.

De façon générale un nombre limité d'espèces, présentes dans des proportions variables participent à une famille de courbes étudiées (spectres d'absorption, de fluorescence, déclins de fluorescence). Il peut être intéressant de déterminer le nombre d'espèces et leur proportion relative. Ce problème peut être traité mathématiquement : chacune des M courbes est considérée comme un vecteur dans un espace vectoriel de dimension N (N est le nombre de points). Il existe un algorithme

qui permet de trouver une base orthogonale décrivant cet espace vectoriel, chaque vecteur ayant une signification qui lui est propre. Chaque spectre ou déclin peut être décomposé sur une base de vecteurs orthonormés. Le choix de ces vecteurs se fait par analyse de la variance. Pour chacun des éléments de la base, on calcule la part de variance qu'il décrit. Si un petit nombre i éléments de base suffit à décrire l'essentiel de la variance des données, on choisit de décrire l'ensemble des courbes comme ceux issus d'un mélange des ces i espèces. Cet algorithme permet donc d'accéder au nombre i de contributions suffisant à décrire le système. La méthode dite de « Décomposition en Composantes Principales » permet ainsi de décomposer les déclins ou spectres pour extraire le nombre de déclins ou de spectres qui constituent une base orthonormée. Ces courbes sont les composantes principales. Elles sont caractéristiques des espèces qui participent au phénomène, le poids de chaque composante donne la proportion relative des espèces.

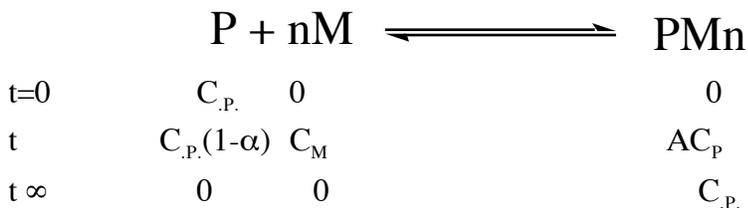
La méthode de « Décomposition en Composantes Connues » permet de décomposer un ensemble de spectres sur une base de spectres de référence qui ont été préalablement choisis par l'expérimentateur. Ces courbes de références sont les composantes connues. Par exemple lors de la métallation des porphyrine les spectres de référence sont celui de la porphyrine base libre et celui de la porphyrine totalement métallée. Le poids de chaque composante donne la proportion de porphyrine base libre et métallée.

Méthode de dosage spectrophotométrique : calcul de la constante d'équilibre.

La complexation de la TMPyP a été en partie étudiée par la méthode de dosage spectrophotométrique décrite par Legget¹⁶⁴. Il est possible de déduire la stoechiométrie du complexe mis en jeu et de calculer sa constante de complexation.

La méthode d'étude est la spectroscopie d'absorption.

Considérons la réaction générale suivante :



α est l'avancement de la réaction, $C_{.P.}$ est la concentration initiale en ligand, C_M est la concentration en métal à l'instant t .

La constante de complexation de l'équilibre s'écrit :

$$K = \frac{[PM_n]}{[P][M]^n} = \frac{\alpha C_0}{C_p(1-\alpha)(C_M)^n}$$

ce qui peut encore s'écrire : $\frac{\alpha}{1-\alpha} = K(C_M)^n$

L'absorbance est mesurée à longueur d'onde fixe, la loi de Beer-Lambert s'écrit alors :

$A = A_p + A_{PM} + A_M$ or A_M est nul

donc $A = A_{PM} + A_p = \epsilon_{PM}l[PM] + \epsilon_p l[P]$

soit encore $A = \epsilon_{PM}l\alpha C_p + \epsilon_p l(1-\alpha)C_p$

En l'absence de métal $A_0 = \epsilon_p l C_p$; lorsque la porphyrine est métallée $A_C = \epsilon_{PM} l C_p$

On peut écrire $\alpha = \frac{A - A_0}{A_C - A_0}$ donc $\frac{A - A_0}{A_C - A} = K(C_M)^n$

ce qui peut encore s'écrire : $\log\left(\frac{A - A_0}{A_C - A}\right) = \log K + n \log(C_M)$

En traçant le logarithme du rapport ci-dessus en fonction de la concentration en métal, si la corrélation est linéaire l'ordonnée à l'origine donne la constante de complexation, et la pente la stoechiométrie.

Dans notre étude A est l'absorbance pour une concentration donnée en plomb(II) C_M et A_0 est l'absorbance initiale (solution de TMPyP base libre) , A_C est l'absorbance de la solution de TMPyP totalement métallée.

Annexe F : quelques notions plus théoriques sur le transfert d'énergie et la modélisation en milieu polymère.

Nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'interaction d'accepteurs à la surface de billes de latex fluorescentes (donneurs). Les déclins des systèmes D-A sont complexes, et nous n'avons pas pu ajuster les déclins selon les modèles classiques. Nous présentons toutefois succinctement quelques notions générales sur le transfert d'énergie et son utilisation en milieu polymère.

** Du transfert d'énergie*

Le transfert de l'excitation électronique en milieu condensé a d'abord été étudié par Th. Förster^{165,166}. Ce transfert est lié au type de couplage entre les molécules du milieu. Dans des systèmes constitués de composants bien définis (i.e dont les propriétés spectroscopiques sont connues et identifiées) comme les cristaux moléculaires, les polymères, les protéines, bien que les propriétés de l'état fondamental soient additives, il n'en va pas de même pour les états électroniques excités. Les caractéristiques photophysiques sont parfois différentes de ceux des composants isolés. Ceci vient du fait que l'excitation peut ne pas être localisée sur un des composants. En effet, celle-ci peut être totalement délocalisée sur l'ensemble du système, ou bien elle peut être localisée temporairement, et être transférée d'un composant du système à un autre. Trois cas peuvent être distingués :

1 Fortes modifications du spectre d'absorption : l'enveloppe vibronique du spectre est complètement différente de celle du composant initial, isolé (un exemple est la formation de dimères à fortes concentrations : thionines, rhodamines) . De tels effets sont dus à de fortes interactions entre les composants : on parlera alors de cas de **couplage fort**. Ce cas est lié à une presque totale délocalisation de l'excitation électronique sur tous les composants du système.

2 Quelques modifications du spectre d'absorption : l'enveloppe vibronique est conservée, mais il y a éclatement des niveaux vibroniques individuels des composants. Les interactions sont donc plus faibles que précédemment, et on parlera de cas de **couplage faible**. L'excitation électronique sera moins délocalisée.

3 Absence (ou quasi absence) de modifications dans le spectre d'absorption avec pourtant des modifications des propriétés de fluorescence. On est alors dans le cas de **couplage très faible**. L'excitation peut être considérée comme localisée spatialement pendant un temps t . Et les caractéristiques photophysiques peuvent être interprétées en terme de transfert d'excitation¹²³.

Le transfert d'énergie selon Förster a été utilisé pour caractériser des distributions de molécules sondes « emprisonnées » dans des géométries restreintes, en particulier dans des verres poreux^{167,168}, de la silice poreuse^{169,170,171} ou des membranes¹⁷².

* *Du modèle de Förster*

Soit un milieu rigide, **tridimensionnel**, où les accepteurs sont distribués de façon aléatoire. Considérons le **couplage très faible** : le couplage des états électroniques et vibroniques du donneur D et de l'accepteur A est considéré comme une interaction dipôle-dipôle. La constante de vitesse, k_{DA} , du transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur, séparés par une distance r , peut s'écrire comme :

$$k_{DA} = \frac{3}{2} * \kappa^2 * \left(\frac{1}{\tau_D}\right) * \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (\mathbf{F.1})$$

où k tient compte de la dépendance angulaire de l'interaction dipôle-dipôle,

$$\kappa^2 = (\sin \theta_D * \sin \theta_A * \cos \phi - 2 * \cos \theta_D * \cos \theta_A)^2 \quad (\mathbf{F.2})$$

où θ_D et θ_A sont les angles caractérisant la direction des moments dipolaires de transition de D et A par rapport au vecteur joignant D et A ; ϕ est l'angle azimutal entre D et A ; τ_D est la durée de vie du donneur en absence d'accepteur ; R_0 est la distance critique de transfert.

Cette distance est liée au recouvrement du spectre d'absorption de A et du spectre d'émission de D selon^{121,173} :

$$R_0 = 0,2108 * [\kappa^2 * \Phi_D * \left(\frac{1}{n^4}\right) * \int_0^\infty I_D(\lambda) * \varepsilon_A(\lambda) * \lambda^4 * d\lambda]^{1/6} \text{ en angström} \quad (\mathbf{F.3})$$

où Φ_D est le rendement quantique de fluorescence du donneur, n est l'indice de réfraction du milieu, $I_D(\lambda)$ est l'intensité de fluorescence du donneur en fonction de la longueur d'onde (normalisée à l'unité sous la courbe) ; $\varepsilon_A(\lambda)$ est le coefficient d'absorption molaire en fonction de la longueur d'onde.

Le déclin de fluorescence d'un donneur individuel dans un ensemble d'accepteurs N_A s'écrit comme :

$$\frac{d\rho_i}{dt} = -\frac{\rho_i}{\tau_D} - \left(\frac{1}{\tau_D}\right) * \sum_{j=1}^{N_A} \frac{3}{2} * \kappa_{ij}^2 * \left(\frac{R_0}{r_{ij}}\right)^6 * \rho_i \quad (\mathbf{F.4})$$

où ρ_i est la probabilité que la molécule de donneur i soit excitée au temps t . La somme se fait sur tous les accepteurs j et dépend des séparations relatives, r_{ij} , et de l'orientation κ_{ij} . Le rétro-transfert des accepteurs vers les donneurs n'est pas pris en compte dans l'équation (F.4), ce qui est le cas lorsque donneur et accepteur sont de natures différentes. Ainsi le déclin de fluorescence du donneur

est exponentiel. Cependant l'expérience ne donne pas accès au déclin d'un seul donneur, mais de l'ensemble des donneurs avec des distributions de κ_{ij} et r_{ij} . Förster a fait la moyenne sur chaque déclin des N_A accepteurs. Pour une distribution aléatoire de κ_{ij} et r_{ij} , la moyenne est indépendante de l'accepteur considéré, et le déclin moyenné sur l'ensemble des donneurs est un produit de N_A termes identiques (F.5) :

$$\rho(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau_D}\right) \left[\iiint \exp\left(-\frac{3}{2} * \kappa^2 * \left(\frac{1}{\tau_D}\right) * \left(\frac{R_o}{r}\right)^6\right) * \frac{r^2 * \sin \theta_D * \sin \theta_A}{2 * V} d\theta_D d\theta_A d\phi dr \right]^{N_A}$$

où V est le volume. Le déclin peut alors s'écrire comme :

$$\rho(t) = \exp\left[-\frac{t}{\tau_D} - g * \frac{4}{3} * \pi^{\frac{3}{2}} * n_A * R_o^3 * \sqrt{\frac{t}{\tau_D}}\right] \quad (\text{F.6})$$

où n_A est la concentration d'accepteurs, g est un facteur numérique donné par :

$$g = \left(\frac{3}{2} * \langle \kappa^2 \rangle\right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{F.7})$$

$\langle \kappa^2 \rangle$ est la facteur d'orientation moyenné.

Dans le cas « dynamique », la réorientation des molécules est infiniment rapide, toutes les réorientations possibles ont lieu pendant le transfert d'énergie, et on peut, à partir de l'équation

$$(F.2), \text{ établir le facteur moyen sur tous les } i \text{ et } j : \kappa_{ij}^2 = \frac{2}{3}.$$

Dans le cas « statique » les orientations sont fixes durant le transfert d'énergie, alors les termes d'orientation doivent être moyennés sur un ensemble aléatoire (mais statique) de distribution angulaire, alors $g=0,845$.

Effet de la diffusion translationnelle :

Dans l'équation (F.6), il a été supposé que la distribution des séparations relatives, r_{ij} est indépendante du temps. Ceci n'est plus valide en solution, on peut alors ajouter un terme de diffusion¹⁷⁴ à l'équation différentielle donnant la probabilité d'excitation du donneur. La solution¹⁷⁴ de cette équation différentielle est complexe, et peu pratique lorsque l'on veut procéder à un ajustement d'un déclin expérimental. Cependant en faisant une interpolation des solutions à temps courts avec celles à temps longs, on peut obtenir une solution approximative^{175,176,177} :

$$\rho(t) = \exp\left[-\frac{t}{\tau_D} - 4 * \pi * D * r_f * n_A * t - g * \frac{4}{3} * \pi^{\frac{3}{2}} * n_A * R_o^3 * \sqrt{\frac{t}{\tau_D}}\right] \quad (\text{F.8})$$

r_f est appelé « rayon de piège efficace », D est le coefficient de diffusion relatif.

$$r_f \approx 0,676 * \left(g^2 * D * \frac{R_o^6}{\tau_D}\right)^{\frac{1}{4}} ; D = D_A + D_D \quad (\text{F.9})$$

Le coefficient de diffusion peut être estimé à partir de l'équation de Stokes-Einstein¹⁴⁰ :

$$D = \frac{k * T}{6 * \pi * \eta} * \left(\frac{f_A}{r_A} + \frac{f_D}{r_D} \right) \quad (\text{F.10})$$

r_A et r_D sont les rayons des sphères équivalentes respectivement à l'accepteur et au donneur, f_A et f_D sont des facteurs de forme.

Effet du transfert d'excitation donneur-donneur :

Lorsque la concentration de donneur est faible, la distance moyenne entre donneur est largement supérieure à la distance critique de transfert D-D, alors le traitement du transfert D-A fait précédemment est correct. Cependant lorsque le donneur est à une concentration où il faut envisager le transfert D-D, et si les vitesses de transfert D-D et D-A sont comparables le problème devient plus complexe. On peut cependant considérer le cas où le transfert D-A est prépondérant, alors le transfert D-D est inclus sous forme de terme diffusif (comme dans le cas de la diffusion translationnelle). Cela est vrai en milieu solide. On peut alors évaluer le coefficient de diffusion selon¹⁷⁸ :

$$D = 0,428 * C^{\frac{4}{3}} * R_o^2 * \frac{1}{\tau_D} \quad (\text{F.11})$$

où C est une concentration réduite, définie comme :

$$C = \frac{4}{3} * \pi * n_D * R_o^3 \quad (\text{F.12})$$

n_D est la concentration en donneurs.

Ainsi s'il y a transfert de l'excitation entre donneurs selon un mode de diffusion, l'équation (F.8) reste valable, avec un coefficient de diffusion défini par (F.11).

Dans des géométries plus restreintes (polymères, surfaces, films ...) des modèles du transfert d'énergie ont été proposés sous forme de fonction à une ou deux dimensions^{179,180}. Ainsi pour une distribution aléatoire d'accepteurs, le déclin de fluorescence des donneurs peut s'écrire comme :

$$\rho(t) = \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau_D}\right) - \frac{4}{3} * g * \pi * n'_A * R_o^2 * \left(\frac{t}{\tau_D}\right)^{\frac{1}{3}}\right] \quad (\text{F.13})$$

où n'_A est la densité surfacique de donneurs.

Pour les milieux organisés, comme des molécules de donneurs (carbazole) et d'accepteurs (anthracène) dans des films de Langmuir-Blodgett, Tamaï et son équipe¹⁸⁰ ont proposé un modèle type Förster à deux dimensions auquel s'ajoute un terme exponentiel dû à la fluorescence des donneurs non-quenchés :

$$\rho(t) = a_1 * \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau_D}\right) - \frac{4}{3} * g * \pi * n_A * R_o^2 * \left(\frac{t}{\tau_D}\right)^{1/3}\right] + a_2 * \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau_D}\right)\right] \quad (\mathbf{F.14})$$

La même équipe¹⁷⁹ a également étudié le transfert d'énergie à deux dimensions entre la rhodamine 6G (donneur) et le Malachite Green (accepteur) adsorbés à la surface de vésicules d'amphiphyles. Mais dans ce cas la superposition d'un modèle à deux et à trois dimensions décrit le système (**F.15**) :

$$\rho(t) = a_1 * \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau_D}\right) - \frac{4}{3} * g * \pi * n'_A * R_o^2 * \left(\frac{t}{\tau_D}\right)^{1/3}\right] + a_2 * \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau_D}\right) - \frac{4}{3} * g * \pi^{\frac{3}{2}} * n_A * R_o^3 * \left(\frac{t}{\tau_D}\right)^{1/2}\right]$$

En effet, il faut tenir compte de l'éventuelle pénétration des molécules dans la bi-couche lipidique des vésicules, mais aussi de la déformation de la surface des vésicules (localement non plate). Un tel modèle peut également rendre compte d'une distribution non uniforme et non aléatoire des molécules sur la surface des vésicules.

* *Polymères et transfert d'énergie*

De nombreux groupes de recherche ont travaillé sur des systèmes polymères permettant de mimer l'antenne photosynthétique : piégeage de l'énergie et migration^{181,127}.

L'étude de la fluorescence de molécules de N-isopropylcarbazole immobilisées dans des films de polystyrène a montré que l'excitation migre entre chromophores selon une marche au hasard, chaque « pas » se fait selon un transfert résonant dipôle-dipôle en accord avec le modèle de Förster¹³⁰. Il faut distinguer deux « régimes » de transfert d'énergie ou deux types de systèmes :

* En solution rigide diluée le transfert de l'énergie se fait en une seule étape du donneur à l'accepteur. En effet, les donneurs sont trop éloignés les uns des autres pour qu'une migration multiétapes D-D ait lieu.

* Dans les films de polymères dopés par des chromophores ou dans les cristaux organiques moléculaires, le transfert d'énergie est essentiellement gouverné par une migration de molécule dopante (donneur) en molécule dopante, suivi d'un transfert à une impureté (accepteur). Le système que nous souhaitons élaborer entre dans cette catégorie.

Des études photophysiques ont permis de mieux caractériser la conformation, et la dynamique des polymères¹⁸². Le modèle de Poisson, qui décrit le quenching de la fluorescence dans des micelles a été appliqué avec succès pour décrire la fluorescence d'une molécule sonde (le pyrène) dans une émulsion de polymère. Ainsi l'association des chaînes de polymères a pu être caractérisée¹⁸³. L'étude de la formation de films à partir de particules de latex a été étudiée par transfert d'énergie

entre un donneur et un accepteur. Le transfert d'énergie entre le phénanthrène et l'anthracène augmente à mesure que l'interdiffusion des chaînes de polymères s'accroît. Des modèles tenant compte de l'hétérogénéité des distributions des donneurs et accepteurs ont été mis au point, et ont permis d'accéder au coefficient de diffusion¹⁸⁴.

Plusieurs équipes ont utilisé le transfert direct d'énergie pour sonder la morphologie interne^{46,185,186,187} ou la structure de la surface de particules de latex¹⁸⁸. Il suffit pour cela de marquer la région à étudier avec des donneurs et des accepteurs appropriés. C'est la mesure du déclin de fluorescence des donneurs en présence d'accepteurs qui fournit les informations nécessaires à l'étude. En effet, le transfert d'énergie résonant non radiatif est sensible à la distribution des distances entre fluorophores (Cf. équation (F.1)). De cette distribution de distances peut être déduite une connaissance plus détaillée de la morphologie du milieu sondé. M.A. Winnik, J.M.G. Martinho et leurs équipes se sont plus particulièrement penchés sur la modélisation du transfert dipôle-dipôle, et l'ajustement du déclin de fluorescence pour une distribution arbitraire de donneurs et d'accepteurs dans des systèmes à symétrie sphérique¹⁸⁹. Le principe est le suivant :

Les donneurs D présentent une durée de vie τ_D en l'absence d'accepteurs (A), les mesures d'augmentation de constante de vitesse du déclin de fluorescence du donneur en présence d'accepteurs sont liées à la distance (r) séparant les deux centres des dipôles de transition des molécules A et D.

Dans cette étude, le facteur d'orientation est pris égal à l'unité. Si toutes les paires de donneurs et d'accepteurs sont situées à la même distance r , et si la dilution des donneurs est assez grande, le déclin des donneurs $I_D(t)$ sera exponentiel, avec une constante de vitesse plus grande qu'en l'absence d'accepteurs. Cependant, la plupart des systèmes possèdent une distribution de distances des paires D-A. Ainsi après l'excitation laser, le déclin de fluorescence du donneur n'est plus simplement exponentiel. Le déclin présente une composante rapide (temps courts) qui est caractéristique des molécules de D et A proches spatialement, il existe une composante lente, caractéristique des paires D-A plus distantes. Deux facteurs jouent sur la distributions de distances entre D et A : la forme et taille de l'espace qu'occupent A et D, et la variation de concentration de D et A sur le nano-domaine étudié. Nous n'avons jusqu'à présent présenté que des systèmes à 2 ou 3 dimensions où les distributions de A et D sont uniformes sur tout l'espace. Cependant, en travaillant dans des géométries restreintes, il faut tenir compte des effets de bord. C'est ce qu'ont fait Klafter et Blumen : l'obtention de la probabilité de survie se fait en intégrant sur le volume du domaine étudié. Ce modèle, cependant, ne s'applique que si les donneurs sont situés dans des environnements équivalents i.e tous les donneurs voient la même distribution de A. Un tel modèle peut s'appliquer à des molécules de D et A distribuées à la surface d'une sphère. Mais il n'est plus applicable dans le cas où les molécules de D se trouvent à l'intérieur de la sphère et les molécules de A à la surface : en

effet, une molécule D proche de la surface ne voit pas la même distribution de A qu'une molécule de D au coeur de la sphère.

Etant donnés les systèmes que nous allons étudier, nous nous contenterons ici de présenter la modélisation du transfert d'énergie D-A de l'intérieur de la sphère vers la surface.

Nous présentons à la figure F.1 un schéma des distributions aléatoires et uniformes de donneurs et d'accepteurs :

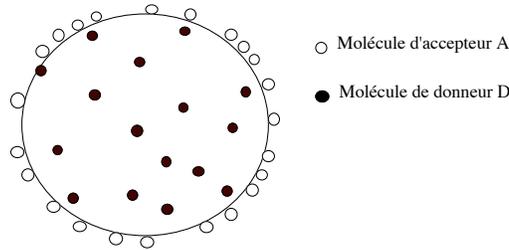


Figure F.1 Schéma des distributions aléatoires et uniformes des donneurs et accepteurs en géométrie sphérique.

Dans cette configuration, les positions des donneurs ne sont pas équivalentes, la distribution de distances A-D dépend de la position des donneurs. Le transfert D-D n'est pas pris en compte.

Le déclin $I_D(t)$ des donneurs en présence d'accepteurs peut s'écrire comme :

$$I_D(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau_D}\right) * \int_0^{R_s} R^2 * \exp[-g(R,t)] * dR$$

où R_s est le rayon de la sphère, R la position du donneur par rapport au centre de la sphère.

La fonction $g(R,t)$ est définie comme suit :

$$g(R,t) = \frac{2 * \pi * C_A * R_s^{(R_s+R)}}{R} \int_{(R_s-R)}^{(R_s+R)} \left\{ 1 - \exp\left[-\frac{t}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6\right] \right\} * r * dr$$

où r est la distance qui sépare un donneur d'un accepteur, R_0 est la distance de Förster caractéristique de D et A, C_A est la concentration totale d'accepteurs. Une telle fonction peut s'exprimer de façon numérique en utilisant les fonctions incomplètes Γ .

Il est important de noter que ce modèle n'est pas applicable à des données expérimentales si le rayon de la sphère est plus de deux fois supérieur à la distance de Förster entre donneur et accepteur. En effet, la contribution essentielle au déclin de fluorescence viendra des fluorophores de coeur, non affectés par le transfert d'énergie vers les accepteurs en surface.

Annexe G : Isothermes de Langmuir 140

Les molécules peuvent s'adsorber sur une surface selon deux modes : la physisorption ou la chimisorption.

La physisorption (adsorption physique) met en jeu des interactions de type Van der Waals, faibles et à longue portée. L'enthalpie de physisorption est faible, de l'ordre de quelques dizaines de $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Une molécule « physisorbée » conserve son identité, aucune rupture de liaison ne peut avoir lieu.

La chimisorption (adsorption chimique) met en jeu des liaisons de plus fortes : les molécules se lient à la surface, généralement de façon covalente. L'enthalpie de chimisorption est de l'ordre de quelques centaines de $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. La molécule « chimisorbée » peut subir des ruptures de liaisons : c'est le principe de la catalyse sur des surfaces solides.

Nous avons étudié l'adsorption de molécules de Bleu de Méthylène (BM) sur la surface de billes de polystyrène de 100 nm de diamètre. Les groupes de surface sont soit des sulfates, soit des carboxylates. Les interactions du BM avec la surface des billes sont faibles (interactions électrostatiques, éventuellement hydrophobes) : il s'agit donc de physisorption.

Il est possible de décrire de façon simple les phénomènes d'adsorption d'espèces sur une surface.

Le **modèle de Langmuir** pose trois hypothèses :

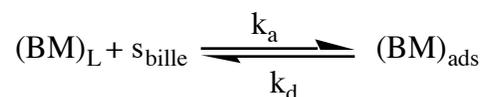
- * L'adsorption se limite à une monocouche ;
- * Tous les sites d'adsorption sont équivalents, et la surface est uniforme (à l'échelle microscopique la surface est plate) ;
- * L'adsorption d'une molécule sur un site donné ne dépend pas de l'occupation des sites voisins. Quelle que soit la molécule, la probabilité d'adsorption est la même.

Il est utile de définir ici le **taux de couverture**, $\theta = \frac{\sigma}{\sigma_{\max}}$ (G.1) : c'est la fraction de sites occupés,

σ , sur le nombre total de sites occupables, σ_{\max} .

L'**isotherme d'adsorption** est, à température, constante, l'évolution de θ en fonction de la concentration de BM libre (non adsorbé), $[BM]_L$.

Dans notre cas, l'équilibre dynamique peut s'écrire selon :



où $(BM)_L$ représente une molécule de BM « libre », s_{bille} est un site d'adsorption à la surface des billes et $(BM)_{ads}$ est une molécule adsorbée sur un site. On écrit k_a et k_d les constantes de vitesse, respectivement, de la réaction d'adsorption et de désorption.

On peut définir la **vitesse de la réaction d'adsorption** comme la variation du taux de couverture avec le temps : $(\frac{d\theta}{dt})_a$. La réaction d'adsorption est un acte élémentaire, la vitesse peut s'écrire comme :

$$(\frac{d\theta}{dt})_a = k_a * [BM]_L * [s_{bille}] = k_a * [BM]_L * \sigma_{max} * (1 - \theta) \quad (\text{G.2})$$

De même, on peut définir la **vitesse de désorption** comme : $(\frac{d\theta}{dt})_d = -k_d * \sigma_{max} * \theta \quad (\text{G.3})$.

A l'équilibre cinétique, les vitesses d'adsorption et de désorption sont égales et ainsi le taux de couverture s'exprime comme :

$$\theta = \frac{K_{ads} * [BM]_L}{1 + K_{ads} * [BM]_L} \quad (\text{G.4}) \text{ avec } K_{ads} = \frac{k_a}{k_d} \quad (\text{G.5})$$

K_{ads} est la constante d'association du BM sur la surface. Elle sera aussi appelée **constante d'affinité**.

Nous voulons étudier l'adsorption du BM sur des billes, et vérifier que le BM adsorbé a un effet sur les propriétés de fluorescence des billes. Le paramètre intéressant pour les études de fluorescence est donc le **nombre de moles de BM adsorbé par unité de surface** (mol.m^{-2}) : σ_{surf} . Nous noterons $\sigma_{surfMax}$ le nombre de moles maximum de sites occupables par unité de surface (mol.m^{-2}). Le taux de couverture peut aussi s'écrire :

$$\theta = \frac{\sigma}{\sigma_{max}} = \frac{\sigma_{surf}}{\sigma_{surfMax}} \quad (\text{G.6})$$

Pour l'étude de l'adsorption du BM sur les billes de latex, en combinant les équations (G.4) et (G.6), nous pouvons écrire :

$$\sigma_{surf} = \sigma_{surfMax} * \left(\frac{K_{ads} * [BM]_L}{1 + K_{ads} * [BM]_L} \right) \quad (\text{G.7})$$

où σ_{surf} est le nombre de moles de BM adsorbées par unité de surface (mol.m^{-2}), et $\sigma_{surfMax}$ le nombre de moles maximum de sites occupables par unité de surface (mol.m^{-2}).

Selon l'équation (G.7) pour accéder à l'isotherme de Langmuir, il faut connaître le nombre de moles de BM libre et le nombre de moles de BM lié.

Il faut donc **déterminer expérimentalement** $[BM]_L$, la concentration en Bleu de Méthylène non adsorbé. Pour cela nous avons centrifugé des échantillons contenant latex et colorant à 15300 rpm soit 20600g, à 20°C, pendant 30 minutes dans une centrifugeuse SIGMA 2K15 avec un rotor NR 12148. Les billes ont « précipité » au fond du tube, et nous avons prélevé le surnageant. Une seule centrifugation n'est pas efficace, il reste des billes dans le surnageant. Il faut procéder à plusieurs centrifugations successives. Le surnageant prélevé a donc subi une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment. Le second surnageant prélevé est lui aussi centrifugé dans les conditions décrites plus haut. Dans le surnageant de la troisième centrifugation, nous n'avons pu déceler la présence de billes, ainsi nous avons mesuré l'absorbance A_{sgnt} après trois centrifugations. Nous avons travaillé dans des conditions telles qu'il n'y a pas de dimères en solution dans le surnageant. La concentration en BM libre s'écrit alors comme :

$$[BM]_L = \frac{A_{sgnt}}{\varepsilon_{BM} * l} \quad (\text{G.8})$$

où ε_{BM} est le coefficient d'absorption molaire du BM au maximum d'absorption ($\text{L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).

Pour calculer la concentration de BM adsorbé, il suffit de faire la différence entre la concentration initiale et la concentration de BM non adsorbé :

$$[BM]_{ads} = [BM]_0 - [BM]_L \quad (\text{G.9})$$

où $[BM]_0$ est la concentration de BM initiale.

Nous calculons le nombre de moles adsorbées par unité de surface, σ_{surf} , selon :

$$\sigma_{surf} = \frac{V}{S} * ([BM]_0 - [BM]_L) \quad (\text{G.10})$$

où V est le volume de l'échantillon et S la surface totale offerte par les billes.

A partir des expériences d'absorption et des calculs précédents, comment évaluer les caractéristiques de l'isotherme de Langmuir ($\sigma_{surfMax}, K_{ads}$) ?

D'après l'équation (G.7) l'isotherme de Langmuir est le nombre de moles de BM adsorbé par unité de surface en fonction de la concentration en BM libre : nous avons donc tracé $\sigma_{surf} = f([BM]_L)$.

Avec le logiciel IgorPro nous avons ajusté les courbes obtenues par une fonction du type :

$$\sigma_{surf} = w_0 * \left(\frac{w_1 * [BM]_L}{1 + w_1 * [BM]_L} \right) \quad (\text{G.11})$$

L'ajustement donne donc directement :

$$w_0 = \sigma_{surfMax} \text{ en mol.m}^{-2}$$

$$w_1 = K_{ads} \text{ en L.mol}^{-1}$$

L'équation (G.11) nous permet **d'évaluer les paramètres de l'isotherme** d'adsorption à partir des résultats expérimentaux.

Nous avons calculé le nombre maximal de sites occupables par billes, $n_{sites/bille}$, selon :

$$n_{sites/bille} = \frac{\sigma_{surfMax} * N_A}{S_{bille}} \quad (\text{G.12})$$

où N_A est le nombre d'Avogadro, et S_{bille} la surface d'une bille en m^2 .

Lors des expériences de spectroscopie de fluorescence nous connaissons la concentration totale en BM dans les échantillons, il nous faut accéder au nombre de moles de BM adsorbé par m^2 : σ_{surf} . Nous avons utilisé les paramètres de l'isotherme de Langmuir estimés expérimentalement, K_{ads} et $\sigma_{surfMax}$.

En combinant l'équation de conservation de la matière et l'équation (G.7) nous devons résoudre l'équation (G.13) pour déterminer le nombre de moles de colorant adsorbé par unité de surface :

$$\sigma_{surf}^2 - \left(\frac{V}{S * K_{ads}} + [BM]_0 * \frac{V}{S} + \sigma_{surfMax} \right) * \sigma_{surf} + [BM]_0 * \frac{V}{S} * \sigma_{surfMax} = 0 \quad (\text{G.13})$$

où V est le volume de l'échantillon, S la surface totale des billes.

Ainsi à partir des connaissances d'un certain nombre de paramètres de l'échantillon (concentration initiale en Bleu de Méthylène, volume, surface totale disponible) et à partir des caractéristiques de l'isotherme de Langmuir (constante d'affinité, nombres maximum de sites occupables) : nous pouvons déterminer le nombre de moles de BM adsorbé par mètre carré.

Références Bibliographiques

- (1) Kieslinger, D.; Draxler, S.; Trznadel, K.; Lippitsch, M. E. *Sens. Actuat. B* **1997**, 38-39, 300-304.
- (2) Cattrall, R. W. *Chemical Sensors*; Oxford University Press: Oxford, England, **1997**.
- (3) Walt, D. R. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 267-278.
- (4) Soulet, A. "Mise au point de photodétecteurs chimiques à base de sondes fluorescentes séquestrées dans des films "sol-gel".," Thèse de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan, **1999**.
- (5) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Second Edition ; Kluwer Academic / Plenum Press: New York, **1999**.

- (6) Czarnik, A. W. *Fluorescent Chemosensors for ion and molecular recognition*; ACS Symposium Series 538: Washington, DC, **1993**.
- (7) Haugland, R. P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*; 7th edition ; Molecular Probes, Inc. Eugene, Oregon, **1999**.
- (8) Schulman, S. G.; Chen, S.; Bai, F.; Leiner, M. J. P.; Weis, L.; Wolfbeis, O. S. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *304*, 165-170.
- (9) Meuwis, K.; Boens, N.; De Schryver, F. C.; Gallay, J.; Vincent, M. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 2469-2473.
- (10) Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Lakowicz, J. R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1241-1251.
- (11) Guo, X.-Q.; Castellano, F. N.; Li, L.; Lakowicz, J. R. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 632-637.
- (12) Lippitsch, M. E.; Draxler, S.; Kieslinger, D. *Sens. Actuat. B* **1997**, *38-39*, 96-102.
- (13) Barker, S. L. R.; Clark, H. A.; Swallen, S. F.; Kopelman, R.; Tsang, A. W.; Swanson, J. A. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1767-1772.
- (14) Stryer, L. *Biochemistry*; 4th ed.; W.H. Freeman and Company: New York, **1995**.
- (15) McNamara, K. P.; Rosenzweig, Z. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4853-4859.
- (16) Clark, H. A.; Barker, S. L. R.; Brasuel, M.; Miller, M. T.; Monson, E.; Parus, S.; Shi, Z.-Y.; Song, A.; Thorsrud, B.; Kopelman, R.; Ade, A.; Meixner, W.; Athey, B.; Hoyer, M.; Hill, D.; Lightle, R.; Philbert, M. A. *Sens. Actuat. B* **1998**, *51*, 12-16.
- (17) Clark, H. A.; Hoyer, M.; Parus, S.; Philbert, M. A.; Kopelman, R. *Mikrochim. Acta* **1999**, *131*, 121-128.
- (18) Tan, W.; Kopelman, R.; Barker, S. L. R.; Miller, M. T. *Anal. Chem. News and Features* **1999**, 606A-612A.
- (19) Delmarre, D., "Incorporation de porphyrines dans des matrices sol-gel. Etudes spectroscopiques et application à la détection de polluants" Thèse de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan, **1998**.
- (20) Murkovic, I.; Lobnik, A.; Mohr, G.; Wolfbeis, O. S. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *334*, 125-132.
- (21) Giuliano, K. A.; Post, P. L.; Hahn, K. M.; Taylor, D. L. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 405-434.
- (22) Frank, A. J.; Proctor, S. J.; Tilby, M. J. *Blood* **1996**, *88*, 977-984.
- (23) Kopelman, R.; Dourado, S. *SPIE* **1996**, *2836*, 2-11.
- (24) Kitamura, N.; Sasaki, K.; Misawa, H.; Masuhara, H. In *Microchemistry : Spectroscopy and Chemistry in small domains*; Masuhara, H., De Schryver, F. C., Kitamura, N., Tamai, N., Eds.; North-Holland Delta Series: Amsterdam, **1994**.
- (25) Kim, H.-B.; Hayashi, M.; Nakatani K.; Kitamura N.; Sasaki K.; Hotta J.; Masuhara H. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 409-414.

- (26) Gensh, T.; Hofkens, J.; van Stam, J.; Faes, H.; Creutz, S.; Tsuda, K.; Jérôme, R.; Masuhara, H.; De Shryver, F. C. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8440-8451.
- (27) Sasaki, K.; Shi, Z.-Y.; Kopelman, R.; Masuhara, H. *Chem. Lett.* **1996**, *2*, 141-142.
- (28) Kurihara, K.; Ohtsu, M.; Yoshida, T.; Abe, T.; Hisamoto, H.; Suzuki, K. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3558-3566.
- (29) Tan, W.; Shi, Z. Y.; Smith, S.; Birenbaum, D.; Kopelman, R. *Science* **1992**, *258*, 778-781.
- (30) Tan, W.; Shi, Z. Y.; Kopelman, R. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2985-2990.
- (31) Rosenzweig, Z.; Kopelman, R. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2650-2654.
- (32) Shalom, S.; Strinkovski, A.; Peleg, G.; Druckmann, S.; Krauss, A.; Lewis, A.; Linial, M.; Ottolenghi, M. *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 256-259.
- (33) McNamara, K. P.; Rosenzweig, N.; Rosenzweig, Z. *Mikrochim. Acta* **1999**, *131*, 57-64.
- (34) Clark, H. A.; Hoyer, M.; Philbert, M. A.; Kopelman, R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4831-4836.
- (35) Clark, H. A.; Kopelman, R.; Tjalkens, R.; Philbert, M. A. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4837-4843.
- (36) Bryan, A. J.; de Silva, A. P.; de Silva, S. A.; Rupasinghe, R. A. D. D.; Sandanayayke, K. R. A. S. *Biosensors* **1989**, *4*, 169-179.
- (37) de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Habib-Jiwan, J. L.; McCoy, C. P.; Rice, T. E.; Soumillion, J. P. *Angew. Chem. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1728-1731.
- (38) de Silva, A. P.; Gunaratne, N.; Maguire, J. *Chem. Soc., Chem. Comm.* **1994**, 1213-1214.
- (39) Fages, F.; Desvergnés, J. P.; Bouas-Laurent, H.; Marsau, P.; Lehn, J. M.; Kotzbyba-Hilbert, F.; Albrecht-Gary, A.-M.; Al-Joubbeh, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8672-8680.
- (40) de Silva, A. P.; de Silva, S. A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 1709-1710.
- (41) Huston, M. E.; Akkaya, E. U.; Czarnik, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8735-8737.
- (42) Lakowicz, J. R.; Szmaciński, H.; Karakelle, M. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *272*, 179-186.
- (43) Chang, Q.; Sipiør, J.; Lakowicz, J. R.; Rao, G. *Anal. Biochem.* **1995**, *232*, 92-97.
- (44) Song, X.; Swanson, B. I. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2097-2107.
- (45) Nakashima, K.; Duhamel, J.; Winnik, M. A. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10702-10707.
- (46) Pekcan, O.; Winnik, M. A. *Phys. Rev. Lett.* **1988**, *61*, 641-644.
- (47) Miyawaki, A.; Llopis, J.; Heim, R.; McCaffery, J. M.; Adams, J. A.; Ikura, M.; Tsien, R. Y. *Nature* **1997**, *388*, 882-887.
- (48) Hunter, R. J. *Foundations of Colloid Science*; Second ed.; Clarendon Press: Oxford, **1989**; Vol. 1.
- (49) Swager, T. M. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 201-207.
- (50) Hsiao, J.-S.; Webber, S. E. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8296-8303.
- (51) Hsiao, J.-S.; Webber, S. E. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8289-8295.
- (52) Nakashima, K.; Yasuda, S. *J. Photochem. Photobiol. A* **1997**, *111*, 249-252.

- (53) Nakashima, K.; Kido, N.; Yekta, A.; Winnik, M. A. *J. Photochem. Photobiol. A* **1997**, *110*, 207-212.
- (54) Nakashima, K.; Tanida, S.; Miyamoto, T.; Hashimoto, S. *J. Photochem. Photobiol. A* **1998**, *117*, 111-117.
- (55) Elaïssari, A.; Pichot, C.; Delair, T.; Cros, P.; Kürfurst, R. *Langmuir* **1995**, *11*, 1261-1267.
- (56) Elaïssari, A.; Chauvet, J. P.; Halle, M. A.; Decavallas, O.; Pichot, C.; Cros, P. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *202*, 251-260.
- (57) Quesada, M.; Puig, J.; Delgado, J. M.; Peula, J. M.; Molina, J. A.; Hidalgo-Alvarez, R. *Colloids Surf. B* **1997**, *8*, 303-309.
- (58) Charreyre, M.-T.; Yekta, A.; Winnik, M. A.; Delair, T.; Pichot, C. *Langmuir* **1995**, *11*, 2423-2428.
- (59) Charreyre, M.-T.; Tcherkasskaya, O.; Winnik, M. A.; Hiver, A.; Delair, T.; Cros, P.; Pichot, C.; Mandrand, B. *Langmuir* **1997**, *13*, 3103-3110.
- (60) Imai, T.; Sumi, Y.; Hatakeyama, M.; Fujimoto, K.; Kawaguchi, H.; Hayashida, N.; Shiozaki, K.; Terada, K.; Yajima, H.; Handa, H. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *177*, 245-249.
- (61) Hara, E.; Yamaguchi, T.; Tahara, H.; Tsuyama, N.; Tsurui, H.; Ide, T.; Oda, K. *Anal. Biochem.* **1993**, *214*, 58-64.
- (62) Hakala, H.; Lönnberg, H. *Bioconj. Chem.* **1997**, *8*, 232-237.
- (63) Fritz, H.; Maier, M.; Bayer, E. *J. Colloid and Interface Sci.* **1997**, *195*, 272-288.
- (64) Couvreur, P.; Dubernet, C.; Puisieux, F. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, *41*, 2-13.
- (65) Menei, P.; Croué, A.; Daniel, V.; Pouplard-Barthelaix, A.; Benoît, J. P. *J. Biomed. Mat. Res.* **1994**, *28*, 1079 - 1085.
- (66) Chavany, C.; Doan, T. L.; Couvreur, P.; Puisieux, P.; Hélène, C. *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 441-449.
- (67) Schwab, G.; Chavany, C.; Duroux, C.; Goubin, I.; Lebau, J.; Hélène, C. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 10460-10464.
- (68) Gibbs, E. M.; Groscurth, P.; Kreuter, J.; Speiser, P. P. *Int. J. Pharm.* **1987**, *40*, 23.
- (69) Senda, H.; Sakuma, E.; Wada, I.; Wang, H. J.; Maruyama, H.; Matsui, N. *Kaibogaku Zasshi* **1999**, *7*, 525-535.
- (70) Katz, L. C.; Burkhalter, A.; Dreyer, W. J. *Nature* **1984**, *310*, 498.
- (71) Divac, I.; Mogensen, J. *Brain Research* **1990**, *524*, 339-341.
- (72) Rahn, M. D.; King, T. A. *Appl. Opt.* **1995**, *34*, 8260-8271.
- (73) Haugland, R. P.; Haugland, R. P.; Brinkley, J. M.; Kang, H. C.; Kuhn, M.; Wells, K. S.; Zhang, Y. Z.; Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon: U.S.A., Patent Number 4,774,339 **1998**.
- (74) Canva, M.; Georges, P.; Perelgritz, J.-F.; Brum, A.; Chaput, F.; Boilot, J.-P. *Appl. Opt.* **1995**, *34*, 428-431.
- (75) Dubois, A.; Canva, M.; Brun, A.; Chaput, F.; Boilot, J.-P. *Appl. Opt.* **1996**, *35*, 3193-3199.

- (76) He, H.; Li, H.; Mohr, G.; Kovacs, B.; Werner, T.; Wolfbeis, O. S. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 123-127.
- (77) Robertson, H. T.; Glenny, R. W.; Stanford, D.; L.M., M.; Luchtel, D. L.; Covert, D. *J. Appl. Phys.* **1997**, *82*, 943-953.
- (78) Glenny, R. W.; Bernard, S.; Brinkley, M. *J. Appl. Phys.* **1993**, *74*, 2585-2597.
- (79) Divac, I.; Mogensen, J. *Brain Res.* **1990**, *524*, 339-41.
- (80) Szöllösi, J.; Damjanovich, S.; Matyus, L. *Cytometry* **1998**, *34*, 159-179.
- (81) Keij, J. F.; Steinkamp, J. A. *Cytometry* **1998**, *33*, 318-323.
- (82) Fatigati, V.; Peach, M. *Am. J. Physiol.* **1998**, *255*, C452-8.
- (83) Haugland, R. P.; Kang, H. C. ; Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon: U.S.A., Patent Number 4,774,339 **1988**.
- (84) Haugland, R. P.; Kang, H. C. ; Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon: U.S.A., Patent Number 5,248,782 **1993**.
- (85) Kang, H. C.; Haugland, R. P. ; Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon: U.S.A., Patent Number 5,274,113 **1993**.
- (86) *Product Information Sheet* Molecular Probes **1999**, N°05000.
- (87) *Product Information* Molecular Probes **1999**, N°05001.
- (88) Charreyre, M.-T.; Zhang, P.; Winnik, M. A.; Pichot, C.; Graillat, C. *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *170*, 374-382.
- (89) Bangs Laboratory , *Bangs Laboratory Quaterly Global Newsletter*, **1999**, vol.12.
- (90) Falk, H.; Grubmayr, K.; Neufingerl, F. *Monatshefte für Chemie* **1977**, *108*, 1185-1188.
- (91) Pardoën, J. A.; Lugtenburg, J.; Canters, G. W. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 4272-4277.
- (92) Vos de Wael, E.; Pardoën, J. A.; van Koeveeringe, J. A.; Lugtenburg, J. *Rec. J. Royal Netherlands Chem. Soc.* **1977**, *96*, 306-308.
- (93) Treibs, A.; Kreuzer, F. H. *Liebigs Annalen Chemie* **1968**, *718*, 203.
- (94) Falk, H.; Hofer, O.; Lehner, H. *Monatshefte Chem.* **1974**, *105*, 169-178.
- (95) Worries, H. J.; Koek, J. H.; Lodder, G.; Lugtenburg, J.; Fokkens, R.; Driessen, O.; Mohn, G. R. *Rec.Trav.Chim. Pays-Bas* **1985**, *104*, 288-291.
- (96) Kang, H. C.; Haugland, R. P. ; Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon: U.S.A., Patent Number 5,433,896 **1995**.
- (97) Kang, H. C.; Haugland, R. P. ; Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon: U.S.A., Patent Number 5,187,288 **1993**.
- (98) Johnson, I. D.; Kang, H. C.; Haugland, R. P. *Analytical Biochemistry* **1991**, *198*, 228-237.
- (99) Johnson, I. D.; Kang, H. C.; Haugland, R. P. *Biophysical Journal* **1991**, *59*, 628a, Th-Pos203.
- (100) Karolin, J.; Johansson, L. B.-A.; Strandberg, L.; Ny, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801-7806.

- (101) Werner, T.; Huber, C.; Heintl, S.; Kollmannsberger, M.; Daub, J.; Wolfbeis, O. S. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *359*, 150-154.
- (102) Hermes, R. E.; Allik, T. A.; Chandra, S.; Hutchinson, J. A. *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *63*, 877-897.
- (103) Faloss, M.; Canva, M.; Georges, P.; Brun, A.; Chaput, F.; Boilot, J.-P. *Appl. Opt.* **1997**, *36*, 6760-6763.
- (104) Kang, H. C.; Haugland, R. P.; Fisher, P. J.; Prendergast, F. G. *SPIE New Tech. Cytometry* **1989**, *1063*, 68-73.
- (105) Coste, N. "Microscopie de fluorescence résolue en temps pour l'étude de la diffusion de molécules dans la cuticule des feuilles" Thèse de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan, **1999**.
- (106) Pavlopoulos, T. G.; Shah, M.; Boyer, J. H. *Opt. Comm.* **1989**, *70*, 425-427.
- (107) Pavlopoulos, T. G.; Boyer, J. H.; Sathyamoorthi, G. *Appl. Opt.* **1998**, *37*, 7797-7800.
- (108) Pavlopoulos, T. G.; Shah, M.; Boyer, J. H. *Appl. Opt.* **1988**, *27*, 4998-4999.
- (109) Pavlopoulos, T. G.; Boyer, J. H.; Shah, M.; Thangaraj, K.; Soong, M.-L. *Appl. Opt.* **1990**, *29*, 3885-3886.
- (110) Boyer, J. H.; Haag, A.; Soong, M.-L.; Thangaraj, K.; Pavlopoulos, T. G. *Appl. Opt.* **1991**, *30*, 3788-3789.
- (111) Boyer, J. H.; Morgan, L. R. : U.S.A., Patent Number 4,916,711 **1990**.
- (112) Rahn, M. D.; King, T. A.; Gorman, A. A.; Hamblett, I. *Appl. Opt.* **1997**, *36*, 5862-5871.
- (113) Kollmannsberg, M.; Gareis, T.; Heintl, S.; Breu, J.; Daub, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1333-1335.
- (114) Wagner, R. W.; Lindsey, J. S.; Seth, J.; Palaniappan, V.; Bocian, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3996-3997.
- (115) Wagner, R. W.; Lindsey, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9759-9760.
- (116) Wagner, R. W.; Lindsey, J. S. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1373-1380.
- (117) Debreczeny, M. P.; Svec, W. A.; Wasielewski, M. R. *Science* **1996**, *274*, 584-586.
- (118) Kollmannsberg, M.; Rurack, K.; Resch-Genger, U.; Daub, J. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 10211-10220.
- (119) Bangs *ChapVII : Working with the particles in Uniform Latex Particles*: Fishers, USA, **1984**.
- (120) Jeuris, K.; Vanoppen, P.; De Schryver, F. C. *Macromol.* **1998**, *31*, 8579-8584.
- (121) Berberan-Santos, M. N.; Canceill, J.; Brochon, J. C.; Jullien, L.; Lehn, J.-M.; Pouget, J.; Tauc, P.; Valeur, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6427-6435.
- (122) Tyndall *Phil. Mag.* **1869**, *37*, 384.
- (123) Förster, T. *Light and Organic Crystals : delocalized excitation and excitation transfer*; Academic Press: New York, **1965**.
- (124) Levenberg, K. *Quart. Appl. Math.* **1944**, *2*, 164.

- (125) Marquardt, D. W. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **1963**, *11*, 431.
- (126) Nakashima, K.; Winnik, M. A. *Macromol.* **1992**, *25*, 6866-6870.
- (127) Guillet, J. *Polymer photophysics and photochemistry : an introduction to the study of photoprocesses in macromolecules*; Cambridge University Press: Cambridge, **1985**.
- (128) Nakashima, K.; Fujimoto, Y.; Kido, N. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 674-679.
- (129) Shriver, D. F.; Atkins, P. W.; Langford, C. H. *Inorganic Chemistry*; Second ed.; Oxford University Press: Oxford, **1994**.
- (130) Johnson, G. E. *Macromol.* **1980**, *13*, 145-152.
- (131) Greens, F. J. *The Sigma-Aldrich Handbook of Stain, Dyes and Indicators*, **1990**.
- (132) Sarrazin, J.; Verdaguer, M. *L'oxydoréduction : concepts et expériences*: Ellipses, Paris, **1991**.
- (133) Ohno, T.; Lichtin, N. N. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 354-360.
- (134) Enescu, M. , "Photophysique des complexes Bleu de Méthylène-nucléotide : une étude par spectroscopie d'absorption transitoire dans le domaine des picosecondes," Thèse de l'Université Paris XI, **1994**.
- (135) Neumann, M. G.; Hioka, N. *J. Appl. Polym. Sci.* **1987**, *34*, 2829-2836.
- (136) Spencer, W.; Sutter, J. R. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 1573-1576.
- (137) Bergman, K.; O'Konski, C. T. *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 2169.
- (138) Nakashima, K.; Kido, N. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 296-302.
- (139) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. *Chimie analytique*; De Boeck: Paris, **1997**.
- (140) Atkins, P. W. *Physical Chemistry*, 5th ed.; Oxford University Press: Oxford, **1994**.
- (141) Rücker, M.; Vanoppen, P.; De Schryver, F. C.; Ter Horst, J. J.; Hotta, J.; Masuhara, H. *Macromol.* **1995**, *28*, 7530-7535.
- (142) Sengupta, A.; Jiang, B.; K.C., M.; Zhang, J. Z. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3128-3137.
- (143) Garvey, M. J.; Tadros, T. F.; Vincent, B. *J. Colloid Interface Sci.* **1976**, *55*, 440.
- (144) Garvey, M. J.; Tadros, T. F.; Vincent, B. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, *41*, 57.
- (145) Durliat, G. *Biochimie structurale*; Diderot Editeur: Paris, **1997**.
- (146) Moss, D.; Nabedryk, E.; Breton, J.; Mäntele, W. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *187*, 565-572.
- (147) Barker, S. L. R.; Kopelman, R. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 971-976.
- (148) Luft, R. *Eléments, atomes et Molécules. Dictionnaire des corps purs simples de la chimie*; Cultures et Techniques: Nantes, **1996**.
- (149) Rodier, J. *Analyse de l'eau*; Dunod: Paris, 1996.
- (150) Tabata, M.; Nishimoto, J.; Ogata, A.; Kusano, T.; Nahar, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 673-677.
- (151) Azim, S. A.; El-Kemary, M. A.; El-Daly, S. A.; El-Daly, H. A.; El-Khouly, M. E.; Ebeid, E. *M. J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92*, 747-751.

- (152) Schneider, J. A.; Hornig, J. F. *Analyst* **1993**, *118*.
- (153) Giovannetti, R.; Bartocci, V. *Talanta* **1998**, *46*.
- (154) Czolk, R.; Reichert, J.; Ache, H. J. *Sensors and Actuators B* **1992**, *7*, 540-543.
- (155) Morales-Bahnik, A.; Czolk, R.; Reichert, J.; Ache, H. J. *Sensors and Actuators B* **1993**, *13-14*, 424-426.
- (156) Plaschke, M.; Czolk, R.; Ache, H. J. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *304*, 107-113.
- (157) Delmarre, D.; Méallet, R.; Bied-Charreton, C.; Pansu, R. B. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* **1999**, *124*, 23-28.
- (158) Delmarre, D.; Méallet-Renault, R.; Bied-Charreton, C.; Pasternack, R. F. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *401*, 125-128.
- (159) Gouterman, M. *Optical spectra and electronic structures of porphyrins and related rings*; Academic Press, 1978; Vol. III.
- (160) Birks, J. B. *Photophysics of Aromatic Molecules*; Wiley: London, 1970.
- (161) Weast, R. C.; Astle, M. J.; Beyer, W. H. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; 64th ed.; CRC Prsess, Inc. Florida (USA), 1984.
- (162) Coch Frugoni, J. A. *Gazzetta Chimica Italiana* **1957**, *87*, 403.
- (163) Méallet-Renault, R.; Yoshikawa, H.; Tamaki, Y.; Asahi, T.; Pansu, R. B.; Masuhara, H. *Polymer of Advanced Technology* **1999**, Accepted for publication.
- (164) Legget, D. J.; Kelly, S. L.; Shiue, L. R.; Wu, Y. T.; Chang, D.; Kadish, K. M. *Talanta* **1983**, *30*, 579-586.
- (165) Förster, T. *Z. Naturforsch. A* **1949**, *4*, 321.
- (166) Förster, T. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1959**, *27*, 7.
- (167) Even, U.; Rademann, K.; Jortner, J.; Manor, N.; Reisfeld, R. *Phys. Rev. Lett.* **1984**, *52*, 2164.
- (168) Dozier, W. D.; Drake, J. M.; Klafter, J. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 197-201.
- (169) Levitz, P.; Drake, J. M. *Phys. Rev. Lett.* **1987**, *58*, 686-689.
- (170) Turro, N. J.; Zimmt, M. B.; Gould, I. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5826.
- (171) Rojanski, D.; Huppert, D.; Bale, H. D.; Dacai, X.; Schmidt, P. W.; Fain, D.; Seri-Levy, A.; Avnir, D. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 2505-2508.
- (172) Kopelman, R.; Parus, S.; Prasad, J. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 1742.
- (173) Berberan-Santos, M. N.; Prieto, M. J. E. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1987**, *2*, 1391-1409.
- (174) Yokota, M.; Tanimoto, O. *J. Phys. Soc. Jpn* **1967**, *22*, 779.
- (175) Gösele, U.; Hauser, M.; Klein, U. K. A.; Frey, R. *Chem. Phys. Lett.* **1975**, *34*, 519.
- (176) Gösele, U. *Spectr. Lett.* **1978**, *11*, 445.
- (177) Klein, U. K. A.; Frey, R.; Hauser, M.; Gösele, U. *Chem. Phys. Lett.* **1976**, *41*, 139.
- (178) Gochanour, C. R.; Andersen, H. C.; Fayer, M. D. *J. Phys. Chem.* **1979**, *70*, 4254.

- (179) Tamaï, N.; Yamazaki, T.; Yamazaki, I.; Muzma, A.; Mataga, N. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3503-3508.
- (180) Tamaï, N.; Yamazaki, T.; Yamazaki, I. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 841-845.
- (181) Webber, S. E. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1469-1482.
- (182) Reis e Sousa, A. T.; Castanheira, E. M. S.; Martinho, J. M. G.; Saghbini, S.; Baros, F.; André, J. C.; Winnik, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *213*, 333-337.
- (183) Kumacheva, E.; Rharbi, Y.; Winnik, M. A.; Guo, L.; Tam, K. C.; Jenkins, R. D. *Langmuir* **1997**, *13*, 182-186.
- (184) Farinha, J. P. S.; Martinho, J. M. G.; Kawaguchi, S.; Yekta, A.; Winnik, M. A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 12552-12558.
- (185) Tcherkasskaya, O.; Spiro, J. G.; Ni, S.; Winnik, M. A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 7114-7121.
- (186) Pérez, E.; Lang, J. *Langmuir* **1996**, *12*, 3180-3187.
- (187) Pérez, E.; Lang, J. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2072-2084.
- (188) Nakashima, K.; Liu, Y. S.; Zhang, P.; Duhamel, J.; Feng, J.; Winnik, M. A. *Langmuir* **1993**, *9*, 2825-2831.
- (189) Yekta, A.; Winnik, M. A.; Farinha, J. P. S.; Martinho, J. M. G. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 1787-1792.