



HAL
open science

Thermographie multi-échelle par méthodes optiques sur gouttelettes et bulles micrométriques : applications aux nanoparticules irradiées par laser ultra-intense et aux édifices biomoléculaires en cours de déshydratation

Antonin Soleilhac

► To cite this version:

Antonin Soleilhac. Thermographie multi-échelle par méthodes optiques sur gouttelettes et bulles micrométriques : applications aux nanoparticules irradiées par laser ultra-intense et aux édifices biomoléculaires en cours de déshydratation. Optique [physics.optics]. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1192 . tel-01688828

HAL Id: tel-01688828

<https://theses.hal.science/tel-01688828v1>

Submitted on 19 Jan 2018

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.



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1192

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 52
Physique et Astrophysique de Lyon

Spécialité de doctorat : Physique
Discipline : Physique

Soutenue publiquement le 10/10/2017, par :
Antonin SOLEILHAC

Thermographie multi-échelle par méthodes optiques sur gouttelettes et bulles micrométriques. Applications aux nanoparticules irradiées par laser ultra-intense et aux édifices biomoléculaires en cours de déshydratation.

Devant le jury composé de :

MEALLET-RENAULT Rachel, Professeure, Université Paris-Sud 11	Rapporteur
PALPANT Bruno, Professeur, CentraleSupélec	Rapporteur
DUJARDIN Christophe, Professeur, Université Lyon 1	Examineur
GAIGEOT Marie-Pierre, Professeure, Université d'Evry val d'Essonne	Examinatrice
GIROD Marion, Chargée de Recherche, Université Lyon 1	Examinatrice
STOIAN Razvan, Directeur de Recherche, Université Jean Monnet	Examineur
ANTOINE Rodolphe, Directeur de Recherche, Université Lyon 1	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Il m'a fallu du temps pour écrire ces remerciements. Je ne savais pas où commencer, ni quelles personnes remercier, ni même la manière de le faire. J'ai alors demandé conseil ; on m'a dit que les remerciements étaient faits pour être soi-même, pour montrer un autre visage des sciences et pour prouver qu'un doctorat n'était pas un travail solitaire. Et c'est vrai.

Lorsque j'ai débuté mon stage de recherche en fin de Master 2 à l'Institut Lumière Matière, j'avais déjà pu me rendre compte de la chance qui m'était offerte de pouvoir travailler dans un environnement de grande qualité avec des personnes de toute aussi haute qualité. C'est la raison principale pour laquelle j'ai entrepris de ce travail de thèse. C'est également la raison pour laquelle je souhaite ici tous vous remercier.

A Rodolphe ANTOINE, mon directeur de thèse, tu as su me donner le goût de l'aventure dans ce projet ambitieux par ton enthousiasme scientifique et ta motivation sans faille. Merci pour toute l'aide apportée, pour ta présence et ton soutien inconditionnel.

A Marion GIROD, merci de m'avoir donné la chance de poursuivre ton travail sur le dispositif expérimental que tu avais commencé à monter. Merci également pour ta patience et ton implication.

Merci à Franck BERTORELLE, tu as toujours été là pour m'aider ou pour me donner tes conseils avisés. Merci à Xavier DAGANY pour toutes les heures que tu as passé à mes côtés pour faire en sorte que tout fonctionne enfin. Merci aussi à Clothilde COMBY-ZERBINO, Christian CLAVIER et Jacques MAURELLI qui ont de près ou de loin veillé à ce que tout tourne correctement et sans qui, rien n'aurait pu être fait.

Merci à toute l'équipe Spectrométrie des Biomolécules et agrégats pour vos conseils et votre sympathie, à Philippe DUGOURD, Luke MACALEESE, Vincent MOTTO-ROS, Driss RAYANE, Fabien CHIROT, sans oublier les Doctorants et Post-Doctorants de l'équipe qui ont toujours été là, merci à Florian TRICHARD, Alexander KULESZA, Steven DALY, ChangMin CHOI, Anne-Laure SIMON, Marin VOJKOVIC, Mohammad HALIM, Geoffrey KNIGHT, Mathilde BOUAKIL, Marine LEPRINCE.

Merci aux Stéphanois qui m'ont accueilli au sein du Laboratoire Hubert Curien. En particulier, merci à Razvan STOIAN pour ta persévérance dans ce projet et ta volonté de faire avancer les choses, même si ça n'a pas toujours été simple, à Tatiana ITINA pour son intérêt et son implication et enfin à Manoj KUMAR BHUYAN, sans qui nous n'aurions jamais pu espérer atteindre notre objectif.

Merci aux Bordelais, à Jean-Éric DUCRET et Guillaume BOUTOUX avec qui nous avons entamé un chemin sur des terres inconnues au CELIA, avec seulement trois bouts de ficelle, le laser ECLIPSE et une idée ambitieuse à explorer.

Je n'oublierai pas non plus nos nombreuses collaborations, avec les chimistes ou physico-chimistes lyonnais qui nous ont permis d'avancer rapidement et efficacement. Merci à Elodie BOURGEAT-LAMI, Julien PARVOLE, François BAYARD, Pierre-Yves DUGAS, Laure COHENDET, Mathilde GHAFAR et Béatrice BURDIN.

Je voulais également remercier les membres de mon Jury de thèse. Merci à Bruno PALPANT et à Rachel MEALLET-RENAULT, pour avoir accepté de relire mon manuscrit et pour toutes vos critiques et vos remarques positives. Merci également à Christophe DUJARDIN et à Marie-Pierre GAIGEOT, et à nouveau merci à Marion GIROD, Razvan STOIAN et Rodolphe ANTOINE, grâce à vous, ma soutenance de thèse a été agréable à vivre par vos questions aussi intéressantes que constructives et par nos discussions scientifiques fournies.

Enfin, merci à tout mon entourage qui a toujours été bienveillant. La liste est bien trop longue pour n'oublier personne, mais je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien, leur présence et leurs conseils.

Vous avez tous rendu ces quatre dernières années parfaites, et c'est avec beaucoup de gratitude et une pointe de tristesse que je tourne cette page et que j'entame la suivante.

Mille mercis.

Tables des matières

Introduction Générale	1
Chapitre 1 : La fluorescence comme sonde optique de température	7
Introduction.....	11
1.1 Thermométrie par Fluorescence Induite par Laser.....	12
1.1.1 Principe de la Fluorescence.....	13
1.1.2 Thermométrie par Fluorescence.....	16
1.1.3 Anisotropie de Fluorescence.....	21
1.2 Montages expérimentaux.....	25
1.2.1 Mesure du spectre d'absorption.....	25
1.2.2 Spectrophotomètre Fluoromax-4 Horiba fluorescence.....	26
1.2.3 Régulation de la température en solution.....	28
1.2.4 Collection de la fluorescence.....	29
1.2.5 Détection de la fluorescence.....	30
Conclusion.....	35
Références.....	36
Chapitre 2 : Des colorants en solution et dans des nanoparticules : Vers une thermographie multi-échelle	39
Introduction.....	43
2.1 La Rhodamine B et Nanoparticules fonctionnalisées : Nano-thermomètres.....	44
2.1.1 La Rhodamine B : un chromophore thermosensible.....	45
2.1.2 Synthèse des nanoparticules fonctionnalisées.....	48

2.2	Caractérisation des nanoparticules.....	52
2.2.1	Analyse par Microscopie Electronique en Transmission (TEM).....	52
2.2.2	Analyse par Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL).....	53
2.2.3	Analyse par Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL).....	54
2.2.4	Résultats.....	56
2.3	De la solution vers la nanoparticule unique.....	58
2.3.1	Réponse en température des nanoparticules dispersées en solution.....	59
2.3.2	Vers une approche « nano-thermomètre » unique.....	63
	Conclusion.....	66
	Références.....	67

Chapitre 3 : Mesure de taille et de température de microgouttelettes chargées générées par électrospray. Vers une thermodynamique de l'électrospray..... 71

	Introduction.....	75
3.1	L'ionisation par électrospray.....	76
3.1.1	Principe d'ionisation par ElectroSpray.....	78
3.1.2	Propriétés de l'électrospray.....	80
3.2	Dispositif expérimental.....	82
3.2.1	Source ESI.....	84
3.2.2	Dispositif pour la mesure de la taille des gouttelettes.....	86
3.2.3	Dispositif pour la thermométrie des gouttelettes.....	89
3.2.4	Profil du spray et acquisition.....	93
3.3	Corrélation entre la taille et la température de microgouttelette en cours d'évaporation.....	94
3.3.1	Résultats.....	95
3.3.2	Influence des paramètres de la source.....	105
3.3.3	Modèle théorique.....	113
	Conclusion.....	124
	Références.....	125

Chapitre 4 : Anisotropie de fluorescence : De la température aux mesures de forme sur protéines.....	131
Introduction.....	135
4.1 Des édifices biomoléculaires complexes : Les Protéines.....	137
4.1.1 Structures et Conformations des protéines.....	138
4.1.2 Diagnostic de la conformation d'une protéine par spectrométrie de masse..	140
4.1.3 Couplage entre spectrométrie de masse et mobilité ionique : vers la spectrométrie de masse native.....	142
4.1.3 Couplage entre spectroscopie optique, plume électrospray et spectrométrie de masse.....	144
4.2 L'anisotropie de fluorescence comme sonde conformationnelle. L'influence du Méthanol.....	146
4.2.1 Synthèse de la Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate...	149
4.2.2 Caractérisation du système Chromophore – Protéine.....	150
4.2.3 Influence des différents paramètres sur l'anisotropie de fluorescence.....	155
4.2.4 Déplieement de la protéine sondée par anisotropie de fluorescence.....	157
Conclusion et perspectives.....	162
Références.....	164

Chapitre 5 : ERTIGO : vers des mesures de température en conditions extrêmes..... 171

Préambule.....	175
Introduction.....	176
5.1 Fusion nucléaire initiée par absorption laser.....	180
5.1.1 Explosion coulombienne.....	182
5.1.2 Nanoparticules fonctionnalisées pour des réactions nucléaires.....	185
5.2 Lyon - Bordeaux : Développement d'une source spray de nanoparticule.....	188
5.2.1 Montage expérimental.....	189
5.2.2 Premiers résultats.....	192
5.2.3 Conclusion.....	195

5.3	Lyon – Saint-Etienne : Nanoparticule et cavitation.....	196
5.3.1	Montage expérimental.....	198
5.3.2	Dynamique Ultra-rapide : la formation d’une microbulle par nano-cavitation.....	201
5.3.3	Les limites de l’imagerie optique pompe-sonde.....	206
5.3.4	Le laser Aléatoire.....	207
5.3.5	Dynamique de la microbulle en présence de nanoparticules.....	217
5.3.7	Discussion.....	234
	Conclusion.....	236
	Références.....	237

Conclusion Générale	241
----------------------------------	-----

Annexes et Publications	247
--------------------------------------	-----

Liste des acronymes et abréviations

4-VPBA	4-vinylphenylboronic
4-VPBAPin	Acide pinacol ester 4-vinylphenylboronic
ADIBA	2,2'-azobis(N,N'-diméthylèneisobutyramidine) dihydrochloride
DDL	Diffusion Dynamique de la Lumière
ESI	Ionisation par ElectroSpray
FRET	Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster
GSH	Génération de Seconde Harmonique
<i>IPD</i>	L'indice de polydispersité
KPS	Potassium persulfate
MCBL	Microscopie Confocale à Balayage Laser
PBS	Tampon Phosphate Salin
RhB	Rhodamine B
SFEP	Polymérisation par émulsion sans tensio-actif
TEM	Microscopie Electronique en Transmission
C_n	<i>Nozzle Voltage</i> , (Potentiel à l'embout de la source)
C_v	<i>Capillary Voltage</i> , (Potentiel au capillaire d'entrée du spectromètre de masse)
F	Débit d'injection
NGP	Pression du gaz nébulisant
SGF	Débit du gaz confinant
SGT	Température du gaz confinant

Liste des paramètres physiques par chapitre

Chapitre 1

A_λ	Absorption d'un échantillon
c	Concentration molaire
$\Delta E,$	Ecart en énergie entre le plus bas niveau de l'état électronique excité et le point de recouvrement à un possible état vibrationnel excité
D	Taux de diffusion rotationnelle
d	Longueur caractéristique de pénétration dans le milieu fluorescent
\vec{E}	Champ électrique
G	Facteur de correction
I	Intensité du signal de fluorescence
I_0	Intensité de fluorescence au temps $t = 0$
I_{VV}	Intensité de fluorescence d'une excitation polarisée verticalement (V) et d'une émission polarisée verticalement (V)
I_{VH}	Intensité de fluorescence d'une excitation polarisée verticalement (V) et d'une émission polarisée horizontalement (H).
I_{HV}	Intensité de fluorescence d'une excitation polarisée horizontalement (H) et d'une émission polarisée verticalement (V)
I_{HH}	Intensité de fluorescence d'une excitation polarisée horizontalement (H) et d'une émission polarisée horizontalement (H).
$I_{\lambda,l}$	Intensité transmise
I_{λ_0}	Intensité d'émission de la lampe à une longueur d'onde donnée
k	Paramètre géométrique lié à la méthode de détection
k_r	Taux de désexcitation par transition radiative
k_{nr}	Taux de désexcitation par transition non-radiative
k_b	Constante de Boltzmann

P_{abs}	Probabilité d'absorption
r	Anisotropie de fluorescence statique
$r(t)$	Anisotropie de fluorescence résolue en temps
r_0	Anisotropie limite au temps $t = 0$,
T	Température
V	Volume de la sphère en rotation
ε_λ	Coefficient d'absorption molaire
η	Viscosité du solvant
φ	Rendement quantique
λ	Longueur d'onde
$\vec{\mu}$	Moment dipolaire
θ	Temps de corrélation rotationnel
τ	Durée de vie de fluorescence d'un chromophore
ϑ	Angle entre les vecteurs \vec{E} et $\vec{\mu}$,

Chapitre 2

d_{poly}	Densité du polymère
D_n	Diamètre moyen d'une particule
D_w	Diamètre moyen en mass
IPD	Indice de polydispersité
n_i	Nombre de particules de diamètre D_i
N_p	Nombre de particule par unité de volume
Z_{moy}	Diamètre hydrodynamique mesuré par DDL
λ	Longueur d'onde
λ_{abs}	Longueur d'onde d'absorption
λ_{ex}	Longueur d'onde d'excitation
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission

Chapitre 3

c	Concentration massique du solvant en phase gazeuse dans le milieu environnement
c_a	Concentration massique du solvant en phase gazeuse dans le milieu environnement à la surface de la gouttelette
c_∞	Concentration massique du solvant en phase gazeuse dans le milieu environnement à une distance infinie du centre de la gouttelette
c_m	Capacité thermique massique du gaz environnement
c_m'	Capacité thermique massique du solvant liquide
D	Coefficient de diffusion du solvant en phase gazeuse dans le milieu environnement
j_{cond}	Densité de flux de chaleur par conduction
j_{mass}	Densité de flux massique
k	Conductivité thermique du gaz environnement
l	Chaleur latente du solvant
M	Masse molaire du solvant
m	Masse de la gouttelette
n	Indice de réfraction
P	Pression partielle du solvant en phase gaz dans le milieu environnement
P_a	Pression partielle du solvant en phase gaz dans le milieu environnement à la surface de la gouttelette
P_∞	Pression partielle du solvant en phase gaz dans le milieu environnement à une distance infinie du centre de la gouttelette
$q_{Rayleigh}$	Charge de Rayleigh
Q_{cond}	Transfert thermique par conduction
Q_{evap}	Transfert thermique par évaporation
r	Rayon de la gouttelette
R_m	Constante des gaz parfait
S	Surface de la gouttelette de rayon a
dT_a	Evolution de la température à la surface de la gouttelette de rayon a
T_a	Température à la surface de la gouttelette de rayon a
T_∞	Température à une distance infinie du centre de la gouttelette

v	Vitesse d'une gouttelette
v_{gaz}	Vitesse d'écoulement du gaz confinant
γ	Tension superficielle du liquide
δX	Distance parcourue pendant le temps δt
ϵ_0	Constante de permittivité du vide
λ	Longueur d'onde
ρ	Masse volumique du gaz environnement
ρ'	Masse volumique du solvant

Chapitre 4

A_λ	Absorption d'un échantillon
k_b	Constante de Boltzmann
r	Anisotropie de fluorescence statique
r_0	Anisotropie de fluorescence limite
T	Température
V	Volume de la sphère équivalente en rotation
r_h	Rayon hydrodynamique
ϵ_λ	Coefficient d'absorption molaire
θ	Temps de corrélation rotationnel
η	Viscosité du solvant
λ	Longueur d'onde
τ	Durée de vie de fluorescence

Chapitre 5

\vec{B}	Champ magnétique
D	Distance entre l'aimant et la plaque
\vec{E}	Champ électrique
E_M	Energie cinétique du centre de masse des produits de l'explosion coulombienne
E_p	Energie de l'impulsion laser

\vec{F}	Force de Lorentz
l	Longueur de l'aimant
m	Masse de la particule
P_B	Pression interne de la bulle
P_l	Pression environnante
P_{sat}	Pression de vapeur saturante du solvant
q	Charge d'une particule
R	Rayon de la bulle avec \dot{R} et \ddot{R} ses dérivées première et seconde en fonction du temps
R_0	Rayon de l'objet qui subit l'explosion coulombienne
\vec{v}	Vitesse d'une particule
y	Déviation de la particule
γ	Indice adiabatique du gaz parfait
η	Viscosité dynamique du solvant
θ	Paramètre géométrique de l'axicon
σ	Tension superficielle du solvant
τ_p	Enveloppe temporelle de l'impulsion laser
ρ	Masse volumique du solvant

Introduction Générale

La lumière a toujours apporté aux hommes surprises, et questionnements. Certains l'ont vénérée, d'autres l'ont étudiée. La lumière a longtemps été considérée d'origine divine puisqu'elle illumine, réchauffe et autorise la vie. Dans la mythologie égyptienne, ce serait la puissance de la lumière qui aurait fait pleurer le dieu Rê, dont les larmes sont à l'origine des hommes. « L'illumination » Bouddhiste est l'état de perception claire de la réalité et de perfection. « Et la lumière fut. », maxime biblique dans la genèse, est l'opposition de la lumière aux ténèbres. Les exemples sont nombreux si bien qu'il est indéniable que la lumière a toujours été présente dans nos cultures.

Bien au-delà d'un simple concept immatériel, la lumière a aussi pris forme par son interaction avec la matière. Par l'éclat d'étoiles lointaines, la beauté d'un arc-en-ciel ou le scintillement de lucioles dans la nuit, la lumière et la matière sont intimement liées. Cette interaction intervient à toutes les échelles, astronomiques ou microscopiques, et a toujours stimulé notre émerveillement.

C'est notre besoin de connaître le monde qui a poussé les grecs à considérer la lumière comme objet d'étude scientifique pour la première fois. Et même si les civilisations se perdent, le savoir reste. Euclide, pour qui la lumière est étroitement liée à la vision, puis Alhazen, qui a été l'un des premiers à expérimenter dans le domaine de l'optique, jusqu'aux grands noms de la Physique comme que Descartes, Huygens, Maxwell, ou Einstein. Tous ont participé à comprendre les propriétés physiques de la lumière et son interaction avec la matière.

Il est du propre de l'homme de vouloir profiter de ce qui est à sa portée. D'objet d'étude, la lumière est alors naturellement devenue un outil. Celle qui était synonyme de divin devient aujourd'hui asservie. Malgré sa nature incroyablement complexe, nous sommes capables d'asservir la lumière et d'exploiter ses propriétés pour explorer la matière. C'est dans ce contexte que s'inscrit le travail effectué lors de cette thèse. Comment exploiter la lumière pour sonder notre monde matériel et pour enfin, le comprendre ?

Mon projet de thèse se situe entre deux projets « phare » dans l'équipe SpectroBio de l'Institut Lumière Matière : (1) « Spray profiling by optical methods » Agilent's Application and Core Technology University Research Program (Grant ID 2243), sur lequel Marion Girod a effectué son travail postdoctoral entre 2011 et 2012 et (2) le projet PALSE « ERTIGO » financé sur l'axe Lyon-Saint-Etienne dans le cadre d'un projet « émergent » entre 2013 et 2015. Le premier projet a permis donner à l'équipe une expertise sur les mesures de fluorescence en utilisant des colorants

« chromiques » permettant de rendre compte des propriétés physico-chimiques de sources aérosols. Le deuxième projet devait donner les moyens d'exploiter cette expertise pour des problématiques de thermographie « multi-échelles ». Le dénominateur commun de ces deux projets est la mesure de température par méthodes optiques.

Ce travail a pour but d'étudier la thermodynamique de petits objets (nanoparticules ou édifices biomoléculaires) dans des milieux fortement hors-équilibre. Forts de ces deux projets, deux milieux miroirs ont été explorés, à savoir des gouttelettes micrométriques chargées et des microbulles générées sous irradiation laser intense. Ces deux systèmes sont par nature difficiles à sonder par des méthodes traditionnelles, c'est pourquoi, une thermographie innovante multi-échelle par méthodes optiques a été développée. Ainsi, une thermographie locale (au sein des nano-objets) et globale (dans le milieu environnant) a été réalisée. Cette thermographie utilise la fluorescence induite par laser – méthode simple, non invasive et efficace pour fournir une mesure de température avec une bonne résolution spatiale, temporelle et thermique – grâce à des colorants thermochromiques directement en solution dans le milieu ou bien incorporés dans les nano-objets. Cette thermographie est également complétée avec d'autres mesures physiques, notamment la taille des gouttelettes et des bulles micrométriques pour aller vers une étude thermodynamique exhaustive de ces systèmes hors-équilibre. Ces études thermodynamiques ont été menées autour des deux thématiques :

- **Edifices biomoléculaires dans des gouttelettes micrométriques chargées en cours de déshydratation.** Il s'agit ici de poursuivre une thématique centrale de l'équipe SpectroBio, reconnue dans le domaine de la spectroscopie laser des ions biomoléculaires en phase gazeuse. Les sources électrospray, devenues un outil incontournable en spectrométrie de masse, présentent une thermodynamique riche et encore mal comprise. Une thermographie par méthodes optiques permettant de mesurer la température des gouttelettes en cours d'évaporation grâce à l'émission de colorants thermochromiques a été réalisée. De cette façon, des mesures de taille et de température de gouttelettes micrométriques chargées en cours d'évaporation ont pu être confrontées dans le but d'avoir une description thermodynamique complète d'une source électrospray. De plus, afin de pouvoir suivre la conformation des édifices biomoléculaires (protéines) en cours de déshydratation, le concept d'anisotropie de fluorescence comme sonde

conformationnelle a été validé en solution et pourra être transposé pour une analyse *in situ* dans la plume de l'électrospray.

- **Nanoparticules dans des microbulles générées sous irradiation laser intense.** Il s'agit ici d'étendre notre expertise pour étudier l'influence de nanoparticules lors de la génération de microbulles par nano-cavitation induite par irradiation laser intense. C'est le cœur du projet « ERTIGO », mené en collaboration entre l'Institut Lumière Matière (ILM, Lyon), le Laboratoire Hubert Curien (LHC, Saint Etienne), le Centre Intense Lasers and Applications (CELIA, Bordeaux) et le laboratoire de Chimie Catalyse Polymères et Procédés (C2P2, Lyon). Le principal objectif scientifique de ce projet sera d'obtenir une compréhension des mécanismes d'absorption d'une solution contenant des nanoparticules irradiées. A cet effet, une source lumineuse atypique (laser aléatoire) a été employée afin d'être en mesure d'illustrer ce système complexe hors-équilibre en fonction du temps par microscopie optique. En parallèle, une mesure locale de la température des nanoparticules est envisagée. C'est la raison pour laquelle des nanoparticules fonctionnalisées pour la thermographie ont également été synthétisées et caractérisées pour aller vers une mesure thermographique sur particules uniques.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré aux techniques employées pour la mesure de température par méthodes optiques. Trois concepts seront explicités : la fluorescence statique et la fluorescence résolue en temps pour la thermométrie, et l'anisotropie de fluorescence. C'est également dans cette partie que les méthodes expérimentales pour la thermométrie seront décrites.

Le second chapitre est un chapitre d'application : des particules nanométriques ont été fonctionnalisées par un chromophore thermosensible : la Rhodamine B, pour la mesure température. Grâce à une caractérisation approfondie de ces nanoparticules, nous verrons comment aller de la solution vers la particule unique pour une thermographie multi-échelle par des mesures de fluorescence statique.

Le troisième chapitre couvre l'étude thermodynamique d'un système hors-équilibre physiquement pertinent : les sources électrospray. Ce sont des sources aérosols utilisées pour générer des ions en phase gazeuse. Une caractérisation en taille - par diffusion de Mie - et en

température - par fluorescence résolue en temps d'un complexe de Ruthénium - nous permettra de décrire les transferts thermiques impliqués lors de l'évaporation de gouttelettes micrométriques et de confronter ces résultats à un modèle théorique simple.

Ensuite, le chapitre 4 apportera les éléments nécessaires à une analyse conformationnelle des édifices biomoléculaires. En particulier, un système protéine-chromophore nous permettra de valider en solution l'approche anisotropie de fluorescence pour le suivi de l'évolution structurale des protéines.

Enfin, le chapitre 5 sera entièrement concentré sur le projet ERTIGO, projet ambitieux qui s'inscrit dans une problématique nouvelle : comment générer des nanoparticules en milieu contrôlé afin de mettre en œuvre une interaction efficace entre un faisceau laser ultra-court, ultra-intense-et des nanoparticules fonctionnalisées dans le but d'initier des événements de réaction de fusion nucléaire. Les motivations, le développement expérimental conséquent, ainsi que les résultats obtenus seront détaillés.

Une conclusion sur les résultats obtenus, ainsi que les perspectives pour de futures expériences termineront ce mémoire de thèse.

Chapitre 1 : La fluorescence comme sonde optique de température

Table des matières

Introduction	11
1.1 Thermométrie par Fluorescence Induite par Laser	12
1.1.1 Principe de la Fluorescence	13
1.1.2 Thermométrie par Fluorescence.....	16
Fluorescence statique pour la thermométrie	18
Fluorescence résolue en temps pour la thermométrie.....	20
1.1.3 Anisotropie de Fluorescence.....	21
1.2 Montages expérimentaux	25
1.2.1 Mesure du spectre d'absorption	25
1.2.2 Spectrophotomètre Fluoromax-4 Horiba fluorescence.....	26
1.2.3 Régulation de la température en solution.....	28
1.2.4 Collection de la fluorescence	29
1.2.5 Détection de la fluorescence	30
Fluorescence statique	32
Fluorescence résolue en temps.....	32
Anisotropie de fluorescence.....	33
Conclusion.....	35
Références	36

Introduction

La température est une propriété fondamentale de la matière et est probablement le paramètre le plus important en science. Des sondes thermométriques adaptées à la fois sur une gamme de température (des très basses températures aux très hautes températures) et sur une gamme de dimension spatiale (du microscopique au macroscopique) faisant appel à des phénomènes physiques de transfert de chaleur sont proposées depuis plusieurs siècles. Les méthodes de mesure de température classiques tels que les thermomètres exploitant des propriétés macroscopiques de la matière comme la dilatation thermique d'un matériel, ou les thermocouples utilisant des propriétés thermoélectriques comme l'effet Seebeck ne sont plus adaptées pour ce type de problématique. En effet, malgré leur efficacité et leur grande gamme d'analyse (de quelques degrés Kelvin à plusieurs milliers de degré), ces technologies sont essentiellement basées sur une mesure par contact. Elles requièrent en général un transfert de chaleur convectif entre le système et la sonde de température. Ce transfert de chaleur peut altérer la température du système, d'autant plus si celui-ci est petit devant la taille du capteur. De plus, l'équilibre thermodynamique entre la sonde et le système doit être atteint. Notons que le besoin d'une thermométrie à l'échelle sub-micrométrique a été fortement stimulé par la demande technologique actuelle dans des domaines très vastes tel que la micro-électronique, la micro-fluidique et la nano-médecine [1], [2]. Les avantages d'une thermométrie par méthode optique, qui bénéficie du caractère non-invasif sur la mesure, viennent donc de façon naturelle.

Effectivement, l'étude et l'utilisation de la sensibilité thermique de certains matériaux luminescents ont récemment permis de développer des outils pour une mesure de température non-invasive et avec une résolution spatiale très grande pouvant aller jusqu'à l'échelle nanométrique. Parmi les outils pour la nano-thermométrie basés sur des méthodes optiques, on peut citer l'utilisation de colorants organiques thermosensibles dispersés en solution [3] ou en poudre [4], l'approche par boîte quantique de polymères semi-conducteurs [5], [6], [7], de micro-diamants dopés [8] ou encore des nanoparticules dopées en lanthanide [9], [10], [11]. Dans ce chapitre, nous détaillerons ce qu'est un objet luminescent et comment les propriétés de ces espèces peuvent être exploitées pour la thermométrie. Ensuite, nous introduirons l'ensemble des dispositifs expérimentaux indispensables à cette étude.

1.1 Thermométrie par Fluorescence Induite par Laser

L'émission de lumière par un corps sans émettre de chaleur, ou photoluminescence, a été une énigme pendant plusieurs siècles. Depuis le XVI^e siècle, de nombreuses observations de luminescence sont restées incomprises, on parlait alors de couleurs anormales de substances naturelles. En 1792, Sir John Frederick William Herschel remarqua qu'une solution de quinine, substance extraite d'un arbuste, apparaissait transparente et incolore mais qu'elle pouvait exhiber « un bleu céleste magnifique » lorsque illuminée d'une certaine façon. Il aura fallu attendre Sir George Gabriel Stokes pour qu'en 1852, un nom soit donné à ce phénomène optique : la fluorescence [12].

Cette émission de lumière « froide » va devenir alors un pan entier de la recherche scientifique. Aujourd'hui, ce phénomène est très bien décrit par la photo-physique moléculaire. La lumière émise par photoluminescence possède des caractéristiques uniques que nous allons détailler ici. Ce ne sont que quelques éléments indispensables pour une bonne compréhension des outils utilisant la photoluminescence pour une application bien précise : la thermométrie.

1.1.1 Principe de la Fluorescence

L'émission de lumière par luminescence provient de l'émission d'un photon provoquée par une transition électronique d'un état excité vers l'état fondamental d'une molécule [13]. Formellement, le phénomène de luminescence peut être divisé en deux catégories : la fluorescence et la phosphorescence. Cette différence s'appuie sur la nature de l'état excité.

- Si l'état excité est un état singulet (spins opposés), la transition vers l'état fondamental est autorisée et l'électron retourne rapidement - quelques nanosecondes [14] - dans son état fondamental en émettant un photon : c'est la fluorescence.
- Si l'état excité est un état triplet (spins parallèles), la transition vers l'état fondamental est interdite et donc le retour à l'état fondamental en émettant un photon se fait sur un temps beaucoup plus long - quelques micro ou millisecondes [15] : c'est la phosphorescence.

L'état excité peut être peuplé grâce à l'absorption d'un photon d'énergie correspondant à la transition de l'état fondamental vers l'état excité. Une espèce est alors caractérisée par son spectre d'absorption et son spectre d'émission. Ils décrivent respectivement sa bande d'absorption – l'énergie des photons que l'espèce peut absorber efficacement pour passer dans état électronique excité - et sa bande d'émission spectrale – l'énergie des photons émis par luminescence.

Ces processus d'émission et d'absorption sont généralement illustrés par un diagramme dit de Jablonski explicité en **Figure 1.1**. On représente alors les états excités d'une molécule comme des niveaux d'énergie en différenciant les états électroniques des états vibrationnels. Généralement, l'état vibrationnel fondamental de chaque état électronique est représenté par une ligne plus épaisse que les autres états vibrationnels. Les transitions électroniques qui décrivent le passage d'un électron d'un niveau d'énergie à un autre par émission ou absorption d'un photon sont représentées par une flèche droite et pleine. On parle de transitions radiatives. Les autres transitions sont représentées par une flèche ondulée. Il existe plusieurs types de transitions dites « non-radiatives » :

- Les Relaxations Vibrationnelles (RV). Elles correspondent à une transition d'un état vibrationnel à un autre dans une même configuration électronique. Ces transitions permettent, par exemple, une équilibration thermique du système.

- Les Conversions Inter-Système (CIS). Elles caractérisent une transition électronique sans émission de photon mais faisant intervenir un changement d'orientation de spin (d'un état singulet excité vers un état triplet excité)
- Les Conversions Internes (CI). Ce sont des relaxations électroniques d'un état électronique à un autre sans émission de photon.
- Tout type d'interaction avec une autre espèce proche induisant une désexcitation sans émission radiative comme des phénomènes de *quenching*, FRET, ... (non représentés).

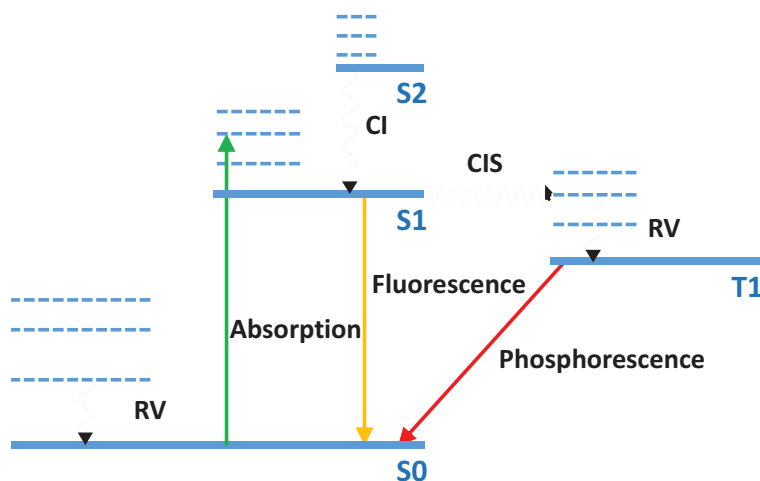


Figure 1.1: Diagramme simplifié de Jablonski montrant les différents mécanismes impliqués lors du processus de photoluminescence. Différents états électroniques singulets sont représentés par les notations « S0 » (état fondamental), « S1 » et « S2 » (états supérieurs excités). Un état triplet excité est représenté par la notation « T1 ».

Pour la suite, nous parlerons indifféremment de « fluorescence » dès lors qu'un processus de relaxation par émission de lumière est mis en jeu suite à l'absorption d'un photon. On appelle alors fluorophore, chromophore ou encore fluorochrome toutes espèces montrant des propriétés de fluorescence. De plus, si l'excitation est une excitation laser, on parle de Fluorescence Induite par Laser (LIF).

Le processus d'émission d'un photon par fluorescence est un phénomène physique aléatoire. Cependant, le temps moyen durant lequel une espèce reste dans son état excité peut être défini par un temps caractéristique : la durée de vie τ . Dans le cas particulier où l'état excité est dépeuplé de façon exponentielle, la durée de vie correspond au temps où 63% des molécules sont retournées

dans leur état fondamental (i.e. le temps t où $e^{-t/\tau} = \frac{1}{e}$). De façon plus générale, la durée de vie est définie comme

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (1.1)$$

Où k_r est le taux de désexcitation par transition radiative et k_{nr} le taux de désexcitation par transition non-radiative.

Intimement lié à la durée de vie, le rendement quantique d'une espèce est aussi un paramètre clé de la fluorescence. Le rendement quantique φ est défini comme étant le ratio du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Autrement dit, le rendement quantique reflète la capacité d'une espèce excitée à retourner dans son état fondamental grâce à l'émission d'un photon. On donne alors

$$\varphi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1.2)$$

En pratique, le spectre d'absorption, le spectre d'émission, la durée de vie et le rendement quantique sont les paramètres essentiels à la caractérisation d'un chromophore.

- Le spectre d'absorption peut être obtenu lorsqu'une lumière blanche (continue) traverse l'échantillon. Le passage dans l'échantillon provoque l'extinction de certaines bandes sur le spectre initialement continu. Ces bandes d'absorption correspondent alors au spectre d'absorption de l'espèce.
- Le spectre de fluorescence est quant à lui obtenu en excitant l'échantillon avec une lumière qui se trouve dans sa bande d'absorption pour une excitation efficace. La lumière émise par fluorescence est alors recueillie puis dispersée spatialement en fonction de la longueur d'onde.
- La durée de vie peut être mesurée de nombreuses façons. Par exemple, l'échantillon peut être excité de façon très ponctuelle - typiquement avec une lumière pulsée dont la durée du pulse est petite devant la durée de vie de l'état excité de l'espèce. La lumière émise par fluorescence est ensuite collectée et analysée en fonction du temps, la décroissance du

signal de fluorescence en fonction du temps nous donne alors une information sur la durée de vie observée.

- Enfin, le rendement quantique peut être mesuré et calculé de façon absolue par une sphère intégrante, ou de façon relative à partir des spectres d'absorption et d'émission de l'échantillon en comparaison avec ceux d'une seconde espèce (ayant des propriétés optiques proches) dont le rendement quantique est connu.

1.1.2 Thermométrie par Fluorescence

Sur le principe, tous les chromophores ont des propriétés d'émission dépendant de la température : c'est le « thermochromisme ». Cela est dû au fait que la structure électronique de l'espèce est fonction de la dépendance en température de la distribution de Boltzmann [16].

Pour montrer que l'émission de lumière par fluorescence est fonction de la température, on peut naïvement supposer qu'à basse température, seules les transitions radiatives sont autorisées. Cette hypothèse se traduit par un rendement quantique égal à 1 à basse température. Lorsque l'énergie thermique du système augmente, les états vibrationnels d'énergie élevée recouvrant partiellement des états électroniques supérieurs sont alors potentiellement accessibles. Ces recouvrements augmenteraient les probabilités de transition par conversions internes (CI) entre un état électronique excité et l'état électronique fondamental. Le retour à l'état fondamental peut donc se produire par relaxations vibrationnelles. Une désexcitation par transitions non-radiatives devient alors possible ($\varphi < 1$) comme illustré par un diagramme de Jablonski en [Figure 1.2](#). La dépendance du taux de transitions non-radiatives avec la température définit le caractère thermochromique d'une espèce. On relie alors le taux de transitions non-radiatives k_{nr} à la température par l'équation d'Arrhenius [17] :

$$k_{nr} \propto e^{\left(\frac{-\Delta E}{k_b T}\right)} \quad (1.3)$$

Où k_b est la constante de Boltzmann, T la température et ΔE , l'écart en énergie entre le plus bas niveau de l'état électronique excité et le point de recouvrement à un possible état vibrationnel excité.

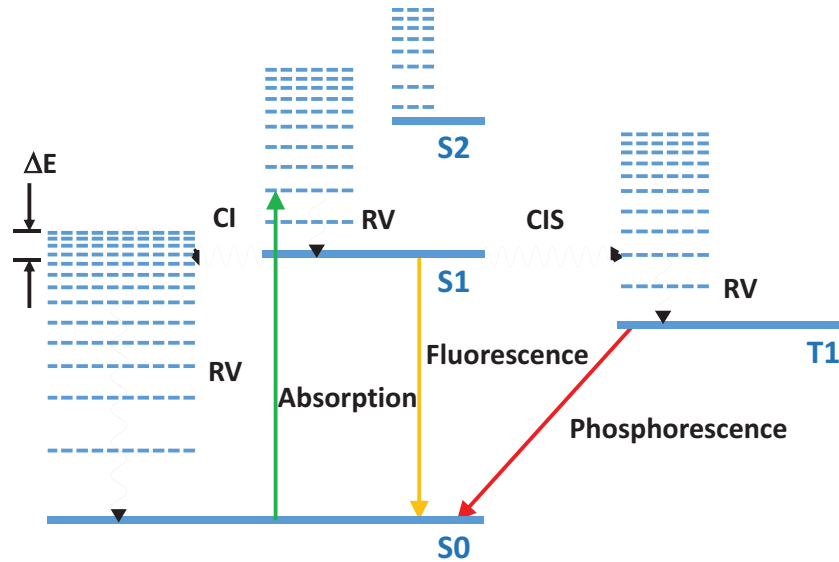


Figure 1.2 : Diagramme simplifié de Jablonski montrant les différents mécanismes impliqués lors du processus de photoluminescence dépendant de la température. ΔE représente l'écart en énergie entre le plus bas niveau de l'état électronique excité et le point de recouvrement à un possible état vibrationnel excité.

Plus simplement, l'augmentation du taux de transitions non-radiatives avec la température peut s'expliquer en admettant qu'une augmentation de la température va modifier les états rotationnels, vibrationnels ou translationnels des molécules favorisant une désexcitation par collision (non-radiative) ou des couplages non-radiatifs supplémentaires avec l'état fondamental.

La température a donc une influence sur le rendement quantique à travers le taux de désexcitation par transition non-radiative. Plus la température augmente, plus le nombre de transitions non-radiatives est important et plus le rendement quantique diminue. Cela se traduit par une diminution de l'intensité de fluorescence - moins de photons sont émis par fluorescence - et par une diminution de la durée de vie – les processus de désexcitation sont plus nombreux et le chromophore reste donc dans un état excité moins longtemps.

Dans cette partie, nous verrons comment utiliser les propriétés physiques intrinsèques au phénomène de fluorescence décrit précédemment pour mesurer une température : les chromophores servent alors de sonde de température.

Fluorescence statique pour la thermométrie

Idéalement, la seule mesure de l'intensité du signal de fluorescence d'une espèce devrait nous permettre d'établir la réponse en température d'un chromophore à travers son rendement quantique. Cependant, l'intensité du signal de fluorescence I est fonction de plusieurs paramètres. On donne

$$I = I_0 \varphi k \varepsilon_\lambda d c \quad (1.4)$$

Où I_0 est l'intensité d'excitation, k un paramètre géométrique lié à la méthode de détection, d une longueur caractéristique de pénétration dans le milieu fluorescent, φ le rendement quantique du chromophore, ε_λ son absorbance molaire et c , sa concentration molaire. Ici, l'intensité d'excitation est indépendante du temps (et continue). Le signal de fluorescence est donc collecté de façon continue, c'est pourquoi on parle de fluorescence statique.

Une augmentation de la température induit une diminution du rendement quantique et donc une diminution du signal de fluorescence total [17]. Il est clair que pour une méthode de détection identique, une variation de l'intensité d'excitation ou de la concentration du chromophore induit une variation de l'intensité du signal de fluorescence indépendamment de la température. Une mesure stable et précise ainsi qu'un environnement contrôlé sont alors nécessaires pour une mesure de température directe.

Cependant, une mesure par ratiométrie « deux couleurs » permet de nous défaire simplement de ces variations. En effet, si deux chromophores dont les réponses en température sont différentes, le ratio des intensités de fluorescence des deux espèces est alors indépendant de l'intensité d'excitation et de leur concentration. Classiquement, un chromophore est utilisé comme sonde de température (généralement un chromophore fortement thermosensible) et le second chromophore sert de référence. [18], [19].

Le couple de chromophore Rhodamine B et Rhodamine 110 a ainsi largement été exploité pour des mesures de thermométrie à deux couleurs (**Figure 1.3– Non disponible dans la version expurgée**). La Rhodamine 110 ayant une sensibilité à la température bien inférieure à la Rhodamine B, son émission sert alors de référence pour une mesure de température par ratiométrie.

Figure 1.3: Exemple d'émission "deux couleurs". Deux colorants organiques ont été utilisés : la Rhodamine 110 sert de référence et la Rhodamine B comme chromophore thermochromique.

Cette technique est efficace mais nécessite de prendre de nombreuses précautions. En effet, cette approche n'est valable que si les concentrations respectives des chromophores varient de la même façon ou que si leur stabilité dans le temps sont équivalentes pendant une illumination de longue durée (photo-blanchiment). De plus, certains mécanismes d'interaction entre les deux espèces peuvent mettre en défaut cette technique. On peut citer par exemple des effets de désactivation (*quenching*) – une espèce va désexciter la seconde de façon non radiative – ou de Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster (*Förster Resonance Energy Transfer* – FRET) – processus de transfert d'énergie non-radiatif résultant d'une interaction dipôle – dipôle entre une molécule *donneur* et une molécule *accepteur* – qui viennent modifier la réponse optique du système indépendamment de la température.

Enfin, une dernière approche consiste à avoir un chromophore dont la forme du spectre d'émission dépend de la température [20]. Ces objets dit d'« émission duale » ont généralement deux bandes d'émission distinctes, indépendantes et qui ont une réponse en température différente [21], [22]. On se retrouve alors dans le cas d'une mesure de température par ratiométrie en évitant les problématiques d'interaction. Ainsi, des nano-cristaux de semi-conducteurs dopés en Magnésium ont été développés pour exhiber des propriétés d'émission duale (**Figure 1.4– Non disponible dans la version expurgée**).

Ces nano-cristaux de $Zn_{1-x}Mn_xSe/ZnCdSe$ de type cœur-coquille sont synthétisés chimiquement de façon très précise et permet d'optimiser la proportion de dopage en magnésium et/ou la dimension

de la coquille du nano-cristal afin de contrôler leurs propriétés d'émission [23]. Il faut souligner que ces objets, bien que performants pour la thermométrie sont rares et souvent complexes en terme de synthèse en chimie des matériaux.

Figure 1.4: Exemple d'« émission duale ». Intensité de la photoluminescence (PL) d'une solution de colloïdes nano-cristaux de $Zn_{1-x}Mn_xSe/ZnCdSe$ collectée à différentes températures. En insert, une photographie couleur de ces mêmes objets à deux températures extrêmes sous excitation UV [23].

Fluorescence résolue en temps pour la thermométrie

La fluorescence résolue en temps s'oppose à la fluorescence statique. Ici, l'excitation est ponctuelle. Le chromophore reste dans son état excité pendant un temps fini et retourne dans son état fondamental après un temps aléatoire. Collectivement, le nombre de molécules dans un état excité diminue en fonction du temps et donc, le signal de fluorescence $I(t)$ diminue lui aussi en fonction du temps. Typiquement, on a :

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \tag{1.5}$$

Où I_0 correspond à l'intensité de fluorescence au temps $t = 0$, et τ la durée de vie. La durée de vie mesurée est directement fonction de la température. Les équations (1) et (3) donnent :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}(T)} = \frac{1}{k_r + k e^{\left(\frac{-\Delta E}{k_b T}\right)}} \quad (1.6)$$

Une augmentation de la température induit une diminution de la durée de vie [24], [25]. L'utilisation de la durée de vie comme sonde thermométrique surmonte alors la plupart des problèmes rencontrés par la fluorescence statique. En effet, l'information donnée par le signal de fluorescence résolu en temps ne dépend plus de l'intensité de l'excitation si cette dernière est suffisamment courte devant la dynamique du système étudié ni de la concentration puisque la durée de vie est un paramètre intrinsèque du chromophore dans un solvant donné. Cependant, une étude résolue en temps nécessite une méthode de détection plus avancée ; la durée de vie de nombreux chromophores est de l'ordre de la nanoseconde, il faut donc une bonne résolution temporelle (typiquement picoseconde) pour observer les variations de la durée de vie en fonction de la température.

Quelle que soit la méthode utilisée, la thermométrie par fluorescence statique ou par fluorescence dynamique n'est pas une mesure absolue de la température. Il est nécessaire d'établir des courbes de calibration : dans un cas, l'intensité (un ratio d'intensité, ou un paramètre de forme) en fonction de la température, et dans l'autre, la durée de vie en fonction de la température.

1.1.3 Anisotropie de Fluorescence

Une autre technique de thermométrie s'appuyant sur le caractère fluorescent d'une sonde est développée. Contrairement à ce qui a été discuté plus tôt, la mesure de température par anisotropie de fluorescence n'est pas une propriété intrinsèque de la fluorescence, mais plutôt une mesure s'appuyant sur la dépendance en température du mouvement Brownien (mouvement aléatoire d'une particule dans un fluide) et sur des propriétés de polarisation de la lumière.

En effet, on rappelle alors que la lumière est une onde électromagnétique qui peut être polarisée. L'absorption d'un photon par un chromophore se fait par un couplage entre une onde électromagnétique et le moment dipolaire d'une molécule. Ce couplage n'est efficace que si la polarisation de la lumière excitatrice, autrement dit si l'orientation du champ électrique de l'onde électromagnétique \vec{E} , coïncide avec l'orientation du moment dipolaire du chromophore

correspondant à sa transition dipolaire électrique vers son état excité $\vec{\mu}$ (Figure 1.5). Autrement dit, si on appelle ϑ l'angle entre les vecteurs \vec{E} et $\vec{\mu}$, cette probabilité d'absorption peut être donnée par

$$P_{abs} = (\vec{\mu} \cdot \vec{E})^2 \propto \cos^2(\vartheta) \quad (1.7)$$

De plus, la lumière émise par fluorescence est elle aussi polarisée selon la direction du moment dipolaire du chromophore correspondant à sa transition dipolaire électrique vers son état fondamental. On notera que les orientations des moments dipolaires d'absorption et d'émission ne sont pas identiques en général.

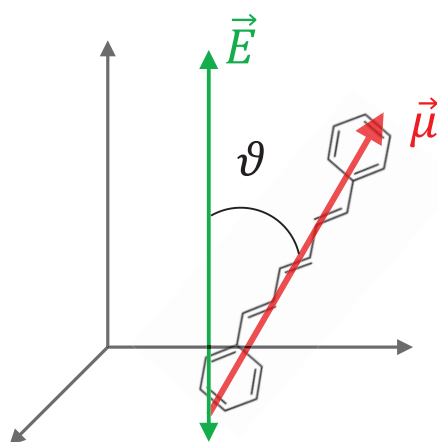


Figure 1.5: Exemple d'une configuration d'absorption pour une unique molécule de 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene dont les moments dipolaires d'absorption et d'émission sont quasi-identiques [13].

Considérons une solution de chromophores à température ambiante dont les moments dipolaires d'absorption et d'émission sont alignés. Les molécules sont aléatoirement orientées dans le fluide (Figure 1.6.a). Si la lumière excitatrice est polarisée linéairement, seules les molécules dont le moment dipolaire est aligné avec la direction de polarisation seront excitées efficacement, on parle alors de photo-sélection (Figure 1.6.b). Si les molécules bougent pendant la période durant laquelle elles se trouvent dans leur état excité (Figure 1.6.c), la polarisation de lumière émise par fluorescence sera modifiée (Figure 1.6.d). La dépolarisation de la lumière émise est intimement liée à la vitesse de rotation des chromophores. Cette rotation est causée par le mouvement Brownien des molécules qui est, entre autre, fonction de la température.

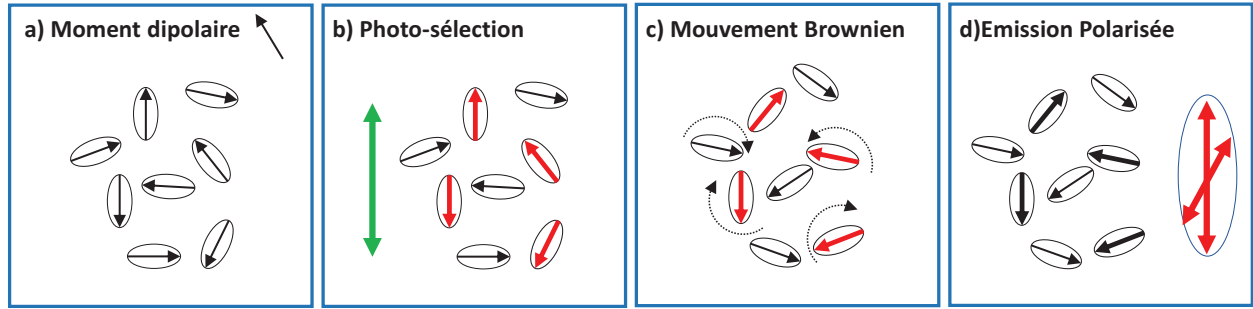


Figure 1.6: Schéma de principe de l'anisotropie de fluorescence.

Expérimentalement, pour quantifier cette perte de polarisation, on définit l'anisotropie de fluorescence statique r par

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}} \quad (1.8)$$

ou résolue en temps par

$$r(t) = \frac{I_{VV}(t) - I_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + 2I_{VH}(t)} \quad (1.9)$$

Où I_{VV} représente l'intensité de fluorescence d'une excitation polarisée verticalement (V) et d'une émission polarisée verticalement (V), et I_{VH} l'intensité de fluorescence d'une excitation polarisée verticalement (V) et d'une émission polarisée horizontalement (H).

Si on suppose qu'en majorité seuls les effets de diffusion rotationnelle conduisent à une modification de la polarisation, on peut écrire une description résolue en temps de la décroissance d'anisotropie de fluorescence pour un objet sphérique comme

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta} = r_0 e^{-6Dt} \quad (1.10)$$

Où r_0 est défini comme l'anisotropie limite au temps $t = 0$, ce qui correspond à l'anisotropie de fluorescence des molécules si on les supposait immobiles dans l'espace (en réalité, cette valeur est différente de 1 compte tenu de la distribution aléatoire des molécules et de l'existence possible d'un angle entre les moments dipolaire d'absorption et d'émission) et où $\theta = (6D)^{-1}$ est le temps de corrélation rotationnel et D le taux de diffusion rotationnelle. Il est donné par la relation de Stokes-Einstein :

$$\theta = \frac{\eta V}{k_b T} \quad (1.11)$$

Où η est la viscosité du solvant, k_b la constante de Boltzmann, T la température et V le volume de la sphère en rotation. L'anisotropie de fluorescence statique peut alors être calculée depuis la moyenne de la décroissance d'anisotropie de fluorescence sur l'intensité du signal de fluorescence :

$$r = \frac{\int_0^\infty I(t)r(t)dt}{\int_0^\infty I(t)dt} \quad (1.12)$$

Si toutes les décroissances sont considérées mono-exponentielles, il vient alors

$$r = \frac{\int_0^\infty I_0 e^{-t/\tau} \cdot r_0 e^{-t/\theta} dt}{\int_0^\infty I_0 e^{-t/\tau} dt} \quad (1.13)$$

D'où

$$r = \frac{r_0}{1 + \tau/\theta} \quad (1.14)$$

Ces équations, dites de Perrin, donnent une expression de l'anisotropie de fluorescence avec une dépendance en température absolue à travers une mesure θ du moment où tous les autres paramètres physico-chimiques sont connus puisque

$$T = \frac{\eta V}{k\tau} \left(\frac{r_0}{r} - 1 \right) \quad (1.15)$$

Cependant, il est bon de remarquer qu'en pratique, une mesure de température par anisotropie de fluorescence se fait après calibration du système compte tenu du nombre de paramètres en jeu [26], [27]. On notera également que pour avoir une mesure précise de l'anisotropie de fluorescence, le temps de corrélation rotationnel θ d'une molécule doit être du même ordre de grandeur que la durée de vie de son état excité τ . Si $\theta \ll \tau$, on perd l'information de la polarisation initiale (on se retrouve avec une population dans un état excité aléatoirement orienté).

1.2 Montages expérimentaux

1.2.1 Mesure du spectre d'absorption

Une lampe halogène couplée à une lampe au deutérium AvaLight-DH-S-DUV (Avantes) permet une illumination blanche de l'échantillon avec un spectre continu (Figure 1.7). La lumière transmise à travers l'échantillon est alors collectée et analysée par un spectrophotomètre AvaSpec 2048FT (Avantes, Table 1.1). Les spectres d'absorption d'une solution de chromophore sont alors obtenus en analysant cette lumière (Figure 1.8).

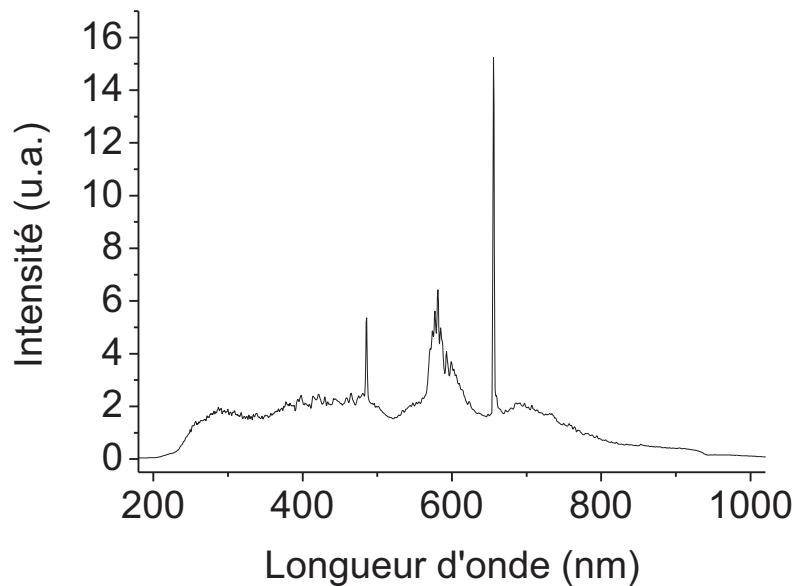


Figure 1.7: Spectre de l'illumination utilisée pour les mesures d'absorption

Table 1.1: Caractéristiques du spectrophotomètre AvaSpec 2048FT (Avantes)

Banc Optique	Czerny-Turner symétrique, distance focale 75 mm
Gamme de longueur d'onde	200-1100 nm
Résolution	1-2 nm,
Lumière parasite	0.05%,
Sensitivité	310,000 coups/ μ W par temps d'intégration
Détecteur	CCD Linéaire, 2048 pixels
Signal/Bruit	200:1
Convertisseur AD	16 bit, 2 MHz
Temps d'intégration	1.11 ms - 10 minutes
Interface	USB 2.0 high speed, 480 Mbps, RS-232, 115.200 bps
Vitesse maximum de balayage	1.1 ms/scan

L'absorption d'un échantillon A_λ est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$I_{\lambda,l} = I_{\lambda 0} e^{-\varepsilon_\lambda l c} = I_{\lambda 0} e^{-A_\lambda} \quad (1.16)$$

Où $I_{\lambda,l}$ est l'intensité transmise à une longueur d'onde λ et de chemin optique dans l'échantillon l (pénétration dans l'échantillon), $I_{\lambda 0}$ l'intensité d'émission de la lampe à une longueur d'onde donnée, ε_λ est le coefficient d'absorption molaire de l'échantillon à la longueur d'onde λ et c la concentration de l'échantillon. Le tracé de A_λ par rapport à la longueur d'onde est alors communément appelé spectre d'absorption. Pour une mesure typique du spectre d'absorption, la concentration de l'échantillon est ajustée afin que l'absorption maximale ne dépasse pas 1 (afin de rester dans le régime de détection linéaire du spectrophotomètre). Des cuvettes en quartz de trajet optique 10 mm (101-QS, 101-10-40, Hellma Analytics) ont été utilisées.

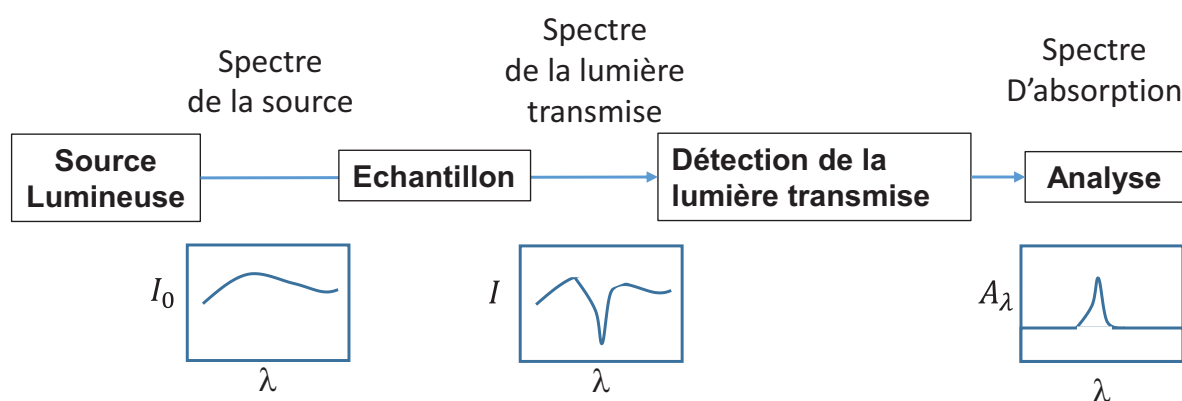


Figure 1.8 : Principe de mesure d'un spectre d'absorption.

1.2.2 Spectrophotomètre Fluoromax-4 Horiba fluorescence

Le spectrophotomètre Fluoromax 4 (Table 1.2, Figure 1.9) est un spectrofluoromètre commercial de chez Horiba Jobin Yvon piloté par son logiciel FluorEssence. Ce dispositif permet l'acquisition de spectres de fluorescence en émission (excitation à une longueur d'onde donnée et observation sur tout le spectre visible), et en excitation (observation à une longueur d'onde donnée et excitation sur tout le spectre visible). La source lumineuse est une lampe à arc au Xénon. Un monochromateur d'excitation permet la sélection de la longueur d'onde d'excitation. Un second

monochromateur permet la sélection de la longueur d'onde en émission. La détection de l'émission est assurée par un compteur de photon calibré pour optimiser le ratio signal sur bruit. Enfin, un module complémentaire permet l'acquisition de courbe de décroissance de fluorescence. Une excitation nano-LED à 370 nm est utilisée pour l'excitation pulsée d'une durée de l'ordre de la dizaine de picosecondes. La détection par comptage de photon unique corrélé temporellement (*Time Correlated Single Photon Counting*) avec une résolution de 7 ps/canal permet la mesure de durées de vie de 200 ps à 0.1 ms.

Table 1.2: Caractéristiques du spectrofluoromètre Fluoromax 4

Source	Lampe Xénon Continue, 150 W
Monochromateurs	Czerny-Turner, réseaux plan 1200 traits/mm
Excitation	Angle de blaze 330 nm
Emission	Angle de blaze 500nm
Bande passante	Entre 0 et 30 nm (pilotable par le logiciel)
Précision du déplacement	± 0.5 nm
Taille du pas	0.0625 – 100 nm
Vitesse maximum de balayage	160 nm/s
Temps d'intégration	De 1 ms à 160 secondes
Détecteur	Photomultiplicateur R928 en mode comptage de photons, gamme de mesure 200-850 nm
Détecteur de référence	Photodiode
Sensibilité	Le rapport signal sur bruit du Raman de l'eau est de 2500 :1

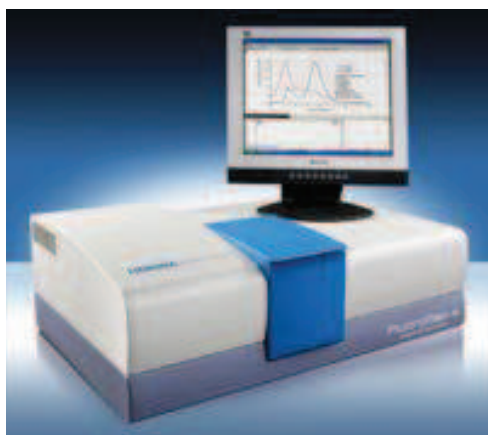


Figure 1.9: A gauche, photographie du spectrofluoromètre Fluoromax 4 en configuration statique et à droite, en configuration résolue en temps.

Cet instrument autorise une mesure de fluorescence précise et calibrée, cependant la chambre de l'échantillon est faite pour accueillir des cuvettes en quartz de trajet optique 10 mm et n'est pas adaptée pour un contrôle de la température de l'échantillon. J'ai donc développé en parallèle de cet instrument commercial, un montage «ad hoc» durant ma thèse, permettant des mesures de températures de la température ambiante à $\sim 150^{\circ}\text{C}$, en configuration statique et dynamique, comme décrit ci-après.

1.2.3 Régulation de la température en solution

Une cellule en aluminium régulée en température (**Figure 1.10**) a été fabriquée sur-mesure pour les mesure de fluorescence en fonction de la température. Elle comporte trois fenêtres en quartz scellées par des joints toriques. Deux fenêtres dans l'axe de la cellule permettent l'injection et l'éjection laser. La collection de la fluorescence peut être faite soit par épi-fluorescence (voir plus loin), soit par la troisième fenêtre à 90° couplée avec une fibre optique via un connecteur SMA. Un doigt chauffant (Thermocoax, Redring) et un thermocouple PT100 ont été insérés dans la structure en aluminium autorisant un contrôle précis de la température (de la température ambiante à $\sim 150^{\circ}\text{C}$) de l'échantillon après équilibration thermique de la cellule grâce à un thermorégulateur KS 40-1 Universal (PMA Prozeß- und Maschinen-Automation GmbH). Le volume de l'échantillon est de 3 mL et est fermé hermétiquement afin de pouvoir effectuer des mesures à concentration constante (la concentration de l'échantillon pouvant varier par évaporation) et à des températures supérieures au point d'ébullition du solvant.

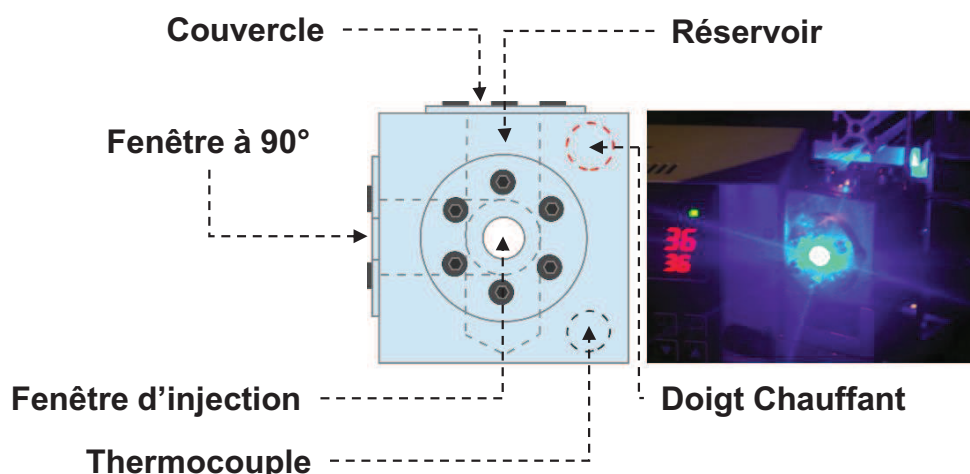


Figure 1.10 Schéma de la cellule thermo-régulée accompagné d'une photographie en cours de mesure

1.2.4 Collection de la fluorescence

Un cube de fluorescence est placé à l'intérieur d'un objectif Optem 125C (Thales Optem Inc., Fairport, NY, U.S.A.) comme décrit en [Figure 1.11](#). La combinaison de cet objectif et du cube de fluorescence est utilisée pour la collection du signal de fluorescence et pour l'injection du laser continue d'excitation avec une distance de travail d'environ 100 mm. Cette configuration s'avère obligatoire pour des mesures « longues distances » de profil de spray (vide infra). Ainsi, seul le signal de fluorescence issu du plan focal de l'objectif est collecté. Le cube de fluorescence est constitué d'un filtre d'excitation à 473 ± 5 nm ou 532 ± 5 nm selon le laser d'excitation utilisé, d'un miroir dichroïque à 473 ou 532 nm et d'un filtre optique passe-haut dont la longueur d'onde de coupure est de 473 ou 540 nm. Ce système permet une collection en épi-fluorescence : le signal de fluorescence est collecté selon le même axe que l'axe d'excitation. La composante du laser est alors filtrée grâce au miroir dichroïque et aux différents filtres passe haut coupant l'excitation laser.

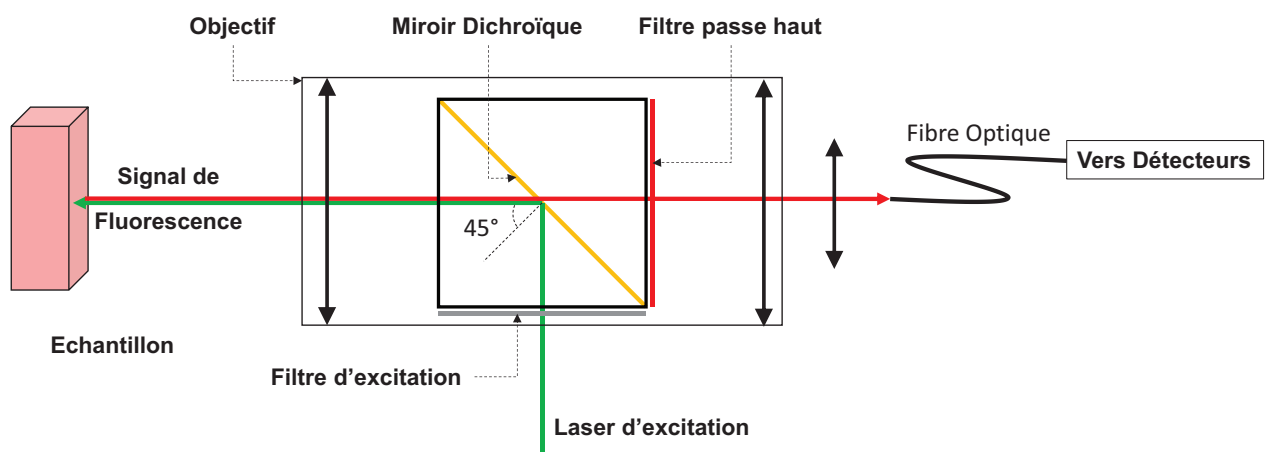


Figure 1.11 : Schéma d'un cube de fluorescence pour une mesure en configuration "épi-fluorescence"

Le signal collecté est injecté dans une fibre optique de 600 μm de diamètre via un objectif de microscope d'ouverture numérique 0.25 et de distance focale 2.5 mm ([Figure 1.12](#)).

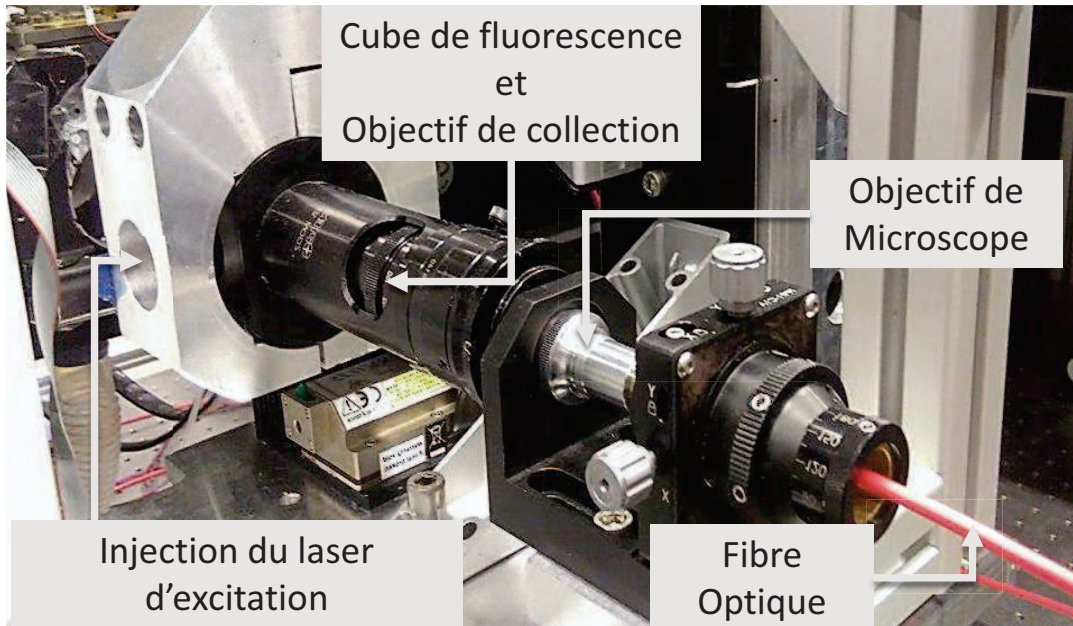


Figure 1.12: Photographie mettant en évidence le couplage entre l'objectif de collection et la fibre optique

1.2.5 Détection de la fluorescence

Trois dispositifs de détection de fluorescence seront utilisés dans ce travail. Chacun de ses systèmes comprenant une source d'illumination laser, le système de collection décrit précédemment et une instrumentation de détection adaptée. Une représentation de ces trois configurations est donnée en [Figure 1.13](#).

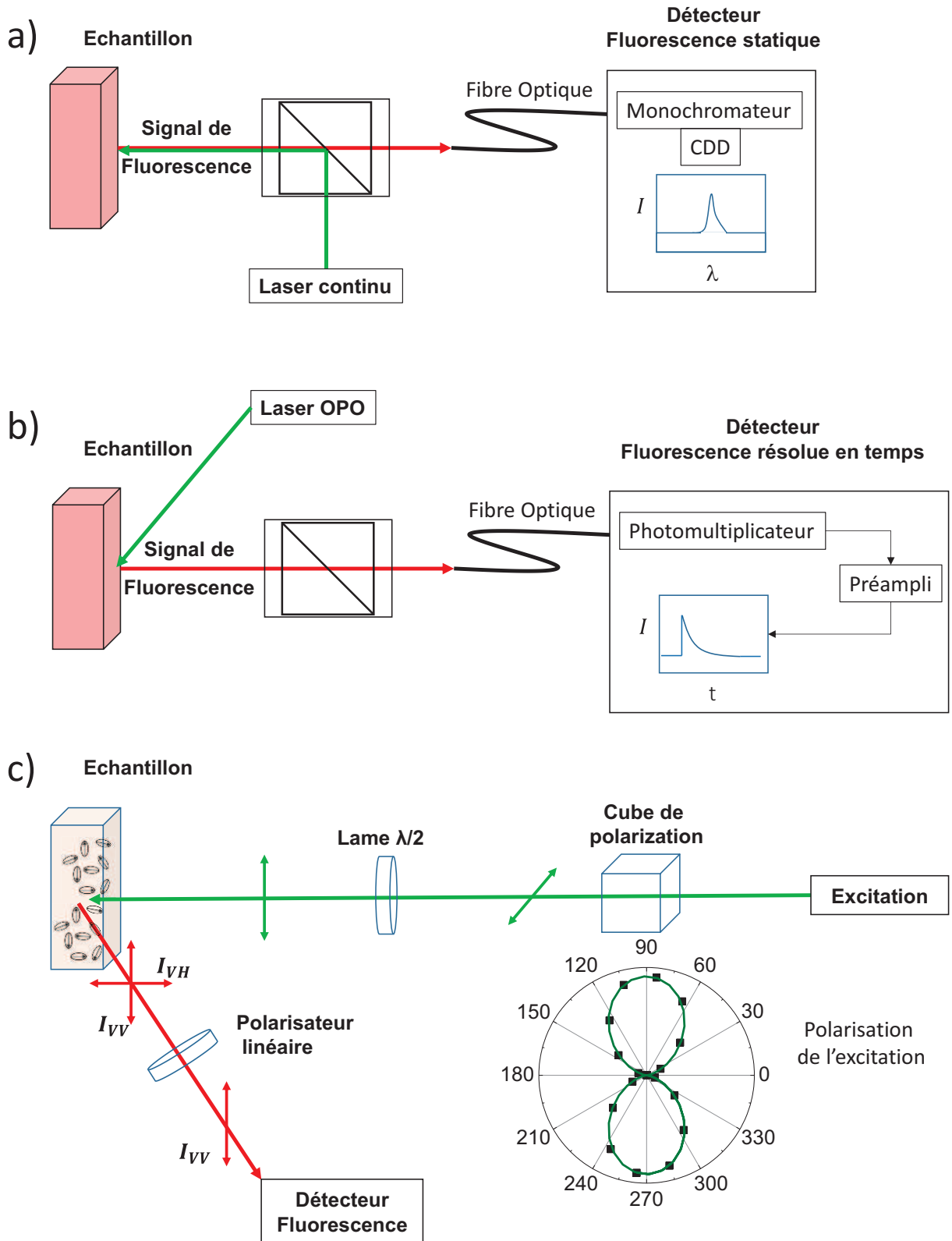


Figure 1.13: Représentation schématique de la détection de fluorescence
 a) statique, b) résolue en temps et c) de l'anisotropie de fluorescence

Fluorescence statique

La détection de la fluorescence statique se fait en configuration d'épi-fluorescence. L'excitation est réalisée soit par un laser continu A MBL-F-473–500 laser (Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co., Ltd.) d'énergie 500 mW à 473 nm et dont le diamètre du faisceau est de 3 mm (avec une divergence de 1.5 mrad) soit par un laser continu Oxxius Slim 532-300 (Oxxius Inc., Santa Clara, CA, U.S.A.) d'énergie 300 mW à 532 nm et dont le diamètre du faisceau est de 1.05 mm (divergence : 1.02 mrad). Le laser est injecté dans l'objectif par deux miroirs (M) plans en aluminium protégé ($R > 90\%$). Le signal de fluorescence statique est enregistré par un spectrofluoromètre Ultracompact Econic (B&W Tek Inc., Newark, DE, U.S.A.) avec une résolution de 1.5 nm. Le spectrophotomètre est refroidi à 5°C environ grâce à un système de circulation externe (Haake Phoenix II P1, Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany) afin d'optimiser le ratio signal sur bruit électronique.

Fluorescence résolue en temps

Un faisceau laser picoseconde de longueur d'onde accordable (Oscillateur paramétrique optique (OPO) PGx03 series, EKSPLA) pompé par un laser mode-lock de fréquence 1 kHz a été utilisé pour l'excitation. Le système optique est optimisé pour générer un pulse laser de durée d'environ 20 ps avec une divergence faible. Le signal de fluorescence est collecté par le même objectif et est ensuite détecté par un tube photomultiplicateur (PMT – R1463, Hamamatsu) alimenté par une boîte d'alimentation haut tension. Le signal de décroissance de fluorescence est amplifié par un préamplificateur rapide (350 MHz Preamplifier SR445A, Stanford Research) et enregistré en fonction du temps par un oscilloscope digital (Lecroy LT 322) déclenché par un photo-détecteur ultra-rapide (DET 10A/M, Thorlabs). En général, pour l'acquisition d'une courbe de décroissance de fluorescence, 400 balayages sont moyennés. Même si la durée de l'excitation laser permet sur le principe des mesures de durée de vie de fluorescence de l'ordre de la nanoseconde (la durée de l'impulsion est petite devant la durée de vie de l'état excité du chromophore), l'instrumentation ne permet pas de mesurer avec précision des durées de vie proche de la nanoseconde. Le traitement du signal de décroissance de fluorescence par déconvolution de la fonction de l'appareil permet d'extraire la durée de vie de fluorescence, cependant cette

procédure est entachée d'une faible précision lorsque l'échantillonnage temporel de l'instrument n'est pas suffisamment résolu.

Anisotropie de fluorescence

La mesure d'anisotropie de fluorescence peut être statique ou résolue en temps. Seuls les outils de détection (détection statique ou détection résolue en temps) changeront selon le mode d'acquisition.

L'excitation polarisée (du laser continue ou du laser pulsé) est réalisé par un cube de polarisation large bande couplé à une lame à retard $\lambda/2$ afin d'obtenir un faisceau laser d'excitation linéairement polarisé selon la verticale ou l'horizontale. La collection du signal de fluorescence (statique ou résolue en temps) se fait à travers un polariseur linéaire large bande (500 nm – 720 nm). En régime statique, l'intensité de fluorescence est déterminée par le maximum du spectre de fluorescence collecté à une longueur d'onde donnée. En régime résolue en temps, l'intensité de fluorescence est déterminée directement par le signal total collecté en fonction du temps. L'orientation de la polarisation de l'excitation est contrôlée en effectuant une rotation de 45° de la lame à retard $\lambda/2$ selon la configuration désirée (verticale ou horizontale). De même, la collection du signal verticalement ou horizontalement polarisé se fait par la rotation du polariseur linéaire d'un angle de 90° .

En pratique, la sensibilité de détection d'un signal peut dépendre de sa polarisation. En effet, la transmission du monochromateur du spectrofluoromètre peut être plus ou moins efficace selon l'axe de polarisation du signal. De plus, même les filtres d'émission n'ont pas d'effet sur la sensibilité de détection, la rotation du polariseur peut altérer légèrement la détection du signal suivant l'axe choisi. On introduit alors un facteur de correction G qui correspond au ratio des sensibilités de détection du système pour une lumière polarisée horizontalement et verticalement. En d'autre terme, on définit G tel que

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (1.17)$$

Où I_{HV} représente l'intensité de fluorescence d'une excitation polarisée horizontalement (H) et d'une émission polarisée verticalement (V), et I_{HH} l'intensité de fluorescence d'une excitation polarisée horizontalement (H) et d'une émission polarisée horizontalement (H). L'anisotropie de fluorescence mesurée est alors donné par

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (1.18)$$

Pour chaque mesure de r , le facteur de correction est alors réévalué (en pratique, G est très proche de 1). L'alignement du montage expérimental (i.e. l'alignement entre l'axe de polarisation de l'excitation avec l'axe de polarisation du polariseur de collection) est assuré en utilisant la diffusion de nanoparticule de latex en suspension dans de l'eau. Si l'échantillon est suffisamment dilué, c'est-à-dire dans le cas où il n'y a pas de diffusion multiple, le signal diffusé est polarisé et conserve la polarisation de l'excitation. Ainsi, r doit être égale à 1. Nous considérerons que notre montage est convenablement aligné pour $r > 0.98$.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons discuté des origines théoriques nécessaires à la compréhension des phénomènes mis en jeu pour la mesure de température par fluorescence induite par laser. En particulier, trois techniques majeures ont été décrites : la fluorescence statique, la fluorescence résolue en temps, et l'anisotropie de fluorescence. Des montages expérimentaux permettant la détection et la mesure de signaux de fluorescence en fonction de la température ont également été détaillés. Dans les travaux décrits dans la suite de ce manuscrit, nous nous emploierons à développer des méthodes expérimentales pour aller vers une mesure de thermographie multi-échelle. Nous verrons qu'à travers ces grands principes, des outils performants peuvent être développés et appliqués à la caractérisation de systèmes thermodynamiques aussi divers que complexes.

Références

- [1] J. Lee and N. A. Kotov, “Thermometer design at the nanoscale,” *Nano Today*, vol. 2, no. 1, pp. 48–51, Feb. 2007.
- [2] C. D. S. Brites *et al.*, “Thermometry at the nanoscale,” *Nanoscale*, vol. 4, no. 16, pp. 4799–4829, 2012.
- [3] P. ChamCarthy, S. V Garimella, and S. T. Wereley, “Measurement of the temperature non-uniformity in a microchannel heat sink using microscale laser-induced fluorescence,” *Int. J. Heat Mass Transf.*, vol. 53, no. 15–16, pp. 3275–3283, Jul. 2010.
- [4] P. Löw, B. Kim, N. Takama, and C. Bergaud, “High-Spatial-Resolution Surface-Temperature Mapping Using Fluorescent Thermometry,” *Small*, vol. 4, no. 7, pp. 908–914, 2008.
- [5] L. M. Maestro *et al.*, “CdSe Quantum Dots for Two-Photon Fluorescence Thermal Imaging,” *Nano Lett.*, vol. 10, no. 12, pp. 5109–5115, Dec. 2010.
- [6] K. Zhang, H. Chang, A. Fu, A. P. Alivisatos, and H. Yang, “Continuous Distribution of Emission States from Single CdSe/ZnS Quantum Dots,” *Nano Lett.*, vol. 6, no. 4, pp. 843–847, Apr. 2006.
- [7] F. Ye, C. Wu, Y. Jin, Y.-H. Chan, X. Zhang, and D. T. Chiu, “Ratiometric Temperature Sensing with Semiconducting Polymer Dots,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 21, pp. 8146–8149, Jun. 2011.
- [8] E. Homeyer, S. Pailhès, R. Debord, V. Jary, and C. Dujardin, “Diamond contact-less micrometric temperature sensors,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 106, no. 24, p. 243502, Jun. 2015.
- [9] F. Vetrone *et al.*, “Temperature Sensing Using Fluorescent Nanothermometers,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 6, pp. 3254–3258, Jun. 2010.
- [10] S. M. Borisov and O. S. Wolfbeis, “Temperature-Sensitive Europium(III) Probes and Their Use for Simultaneous Luminescent Sensing of Temperature and Oxygen,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 14, pp. 5094–5101, Jul. 2006.

- [11] H. Peng, M. I. J. Stich, J. Yu, L. Sun, L. H. Fischer, and O. S. Wolfbeis, “Luminescent Europium(III) Nanoparticles for Sensing and Imaging of Temperature in the Physiological Range,” *Adv. Mater.*, vol. 22, no. 6, pp. 716–719, 2010.
- [12] G. G. Stokes, “On the Change of Refrangibility of Light,” *Philos. Trans. R. Soc. London*, vol. 142, pp. 463–562, Jan. 1852.
- [13] J. R. Lakowicz, Ed., *Introduction to Fluorescence*. Boston, MA: Springer US, 2006.
- [14] R. F. Chen, “Fluorescence lifetime reference standards for the range 0.189 to 115 nanoseconds,” *Anal. Biochem.*, vol. 57, no. 2, pp. 593–604, 1974.
- [15] P. Yuster and S. I. Weissman, “Effects of Perturbations on Phosphorescence: Luminescence of Metal Organic Complexes,” *J. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 12, pp. 1182–1188, Dec. 1949.
- [16] Q. Feng, H. Zhao, C. Wei, Z. Zhang, and C. Wenwu, “A precise Boltzmann distribution law for the fluorescence intensity ratio of two thermally coupled levels,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 108, no. 24, p. 241907, Jun. 2016.
- [17] X. Wang, O. S. Wolfbeis, and R. J. Meier, “Luminescent probes and sensors for temperature,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 19, pp. 7834–7869, 2013.
- [18] J. Sakakibara and R. J. Adrian, “Whole field measurement of temperature in water using two-color laser induced fluorescence,” *Exp. Fluids*, vol. 26, no. 1, pp. 7–15, 1999.
- [19] D. Fogg, M. David, and K. Goodson, “Non-invasive measurement of void fraction and liquid temperature in microchannel flow boiling,” *Exp. Fluids*, vol. 46, no. 4, pp. 725–736, 2009.
- [20] R. J. Hopkins, C. R. Howle, and J. P. Reid, “Measuring temperature gradients in evaporating multicomponent alcohol/water droplets,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 8, no. 24, pp. 2879–2888, 2006.
- [21] E. J. McLaurin, L. R. Bradshaw, and D. R. Gamelin, “Dual-Emitting Nanoscale Temperature Sensors,” *Chem. Mater.*, vol. 25, no. 8, pp. 1283–1292, Apr. 2013.
- [22] J. Dong and J. I. Zink, “Taking the Temperature of the Interiors of Magnetically Heated Nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 5, pp. 5199–5207, May 2014.
- [23] V. A. Vlaskin, N. Janssen, J. van Rijssel, R. Beaulac, and D. R. Gamelin, “Tunable Dual

- Emission in Doped Semiconductor Nanocrystals,” *Nano Lett.*, vol. 10, no. 9, pp. 3670–3674, Sep. 2010.
- [24] E. M. Graham, K. Iwai, S. Uchiyama, A. de Silva, S. W. Magennis, and A. C. Jones, “Quantitative mapping of aqueous microfluidic temperature with sub-degree resolution using fluorescence lifetime imaging microscopy,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 10, pp. 1267–1273, 2010.
- [25] J. R. Lakowicz, H. Szymanski, K. Nowaczyk, K. W. Berndt, and M. Johnson, “Fluorescence lifetime imaging,” *Anal. Biochem.*, vol. 202, no. 2, pp. 316–330, 1992.
- [26] J. S. Donner, S. A. Thompson, M. P. Kreuzer, G. Baffou, and R. Quidant, “Mapping Intracellular Temperature Using Green Fluorescent Protein,” *Nano Lett.*, vol. 12, no. 4, pp. 2107–2111, Apr. 2012.
- [27] M. Kumbhakar, T. Mukherjee, and H. Pal, “Temperature Effect on the Fluorescence Anisotropy Decay Dynamics of Coumarin-153 Dye in Triton-X-100 and Brij-35 Micellar Solutions,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 81, no. 3, pp. 588–594, May 2005.

Chapitre 2: Des colorants en solution et dans des nanoparticules : Vers une thermographie multi-échelle

Table des matières

Introduction	43
2.1 La Rhodamine B et Nanoparticules fonctionnalisées : Nano-thermomètres	44
2.1.1 La Rhodamine B : un chromophore thermosensible.....	45
2.1.2 Synthèse des nanoparticules fonctionnalisées.....	48
Approche in situ	49
Approche ex situ	50
2.2 Caractérisation des nanoparticules	52
2.2.1 Analyse par Microscopie Electronique en Transmission (TEM).....	52
2.2.2 Analyse par Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL)	53
2.2.3 Analyse par Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)	54
2.2.4 Résultats.....	56
2.3 De la solution vers la nanoparticule unique	58
2.3.1 Réponse en température des nanoparticules dispersées en solution	59
Réponse en température des nanoparticules fonctionnalisées	59
Influence de la localisation du chromophore : chromophore libre, adsorbé ou incorporé.....	60
Réversibilité	61
2.3.2 Vers une approche « nano-thermomètre » unique	63
Conclusion.....	66
Références	67

Introduction

On se propose dans ce chapitre de définir un nouvel objet performant pour des études de thermographie multi-échelle. Le thermochromisme d'un colorant en solution ou déposé en surface donne lieu à une résolution spatiale limitée par les caractéristiques de l'outil de microscopie (généralement quelques dizaine de microns). L'incorporation d'un chromophore organique dans une nanoparticule de polymère de taille sub-micrométrique est alors un système idéal pour des études de nanothermométrie [1]. En effet la résolution de la mesure de température sera « limitée » par la taille de la nanoparticule (quelques centaines de nm). Cette technique de fonctionnalisation de nanoparticule de polymère a déjà un champ d'application remarquable. Par exemple, de nombreux types de nanoparticules polymériques ont été développés pour le marquage cellulaire [2], [3], pour l'utilisation de marqueurs optiques complexes codés pour la lutte contre la contrefaçon [4] ou encore pour l'élaboration d'encre électroniques [5]. La combinaison de chromophores avec des nanoparticules de polymère peut être réalisée par deux stratégies différentes : l'incorporation des chromophores pendant la formation de la nanoparticule [6] ou par adsorption sur la surface d'une nanoparticule déjà formée [7].

Nous nous intéresserons alors à un chromophore thermosensible bien connu : la Rhodamine B. Nous regarderons comment utiliser ses propriétés de fluorescence pour une étude thermométrique par méthodes optiques. Ensuite, une synthèse de nanoparticules fonctionnalisées ainsi qu'une caractérisation avancée de ces objets seront décrites pour enfin aller vers une thermographie sub-micrométrique sur objet unique. Une importante question à laquelle ce chapitre essaiera de répondre concerne l'effet « preserve and protect » de la matrice nanoparticule sur les propriétés thermochromiques du chromophore organique.

2.1 La Rhodamine B et Nanoparticules fonctionnalisées : Nanothermomètres

La Rhodamine B et ses dérivés sont connus pour leurs propriétés de fluorescence remarquables. Ce sont des colorants fluorescents qui ont longtemps été utilisés comme traceurs hydrologiques, [8] marqueurs de tissus biologiques [9] ou encore comme milieu amplificateur pour les lasers à colorant [10]. En particulier, la sensibilité à la température de la Rhodamine B a été vastement étudiée [1], [11], [12]. La Rhodamine B est un candidat idéal pour le développement d'outils nanothermométriques. La synthèse de nanoparticules de polymère fonctionnalisées par incorporation ou adsorption de Rhodamines B est alors reportée. Cette synthèse a été effectuée par le laboratoire de Chimie Catalyse Polymères et Procédés (C2P2, Université de Claude Bernard, Villeurbanne, France) dans le cadre du projet PALSE : «ERTIGO » (Chapitre 5).

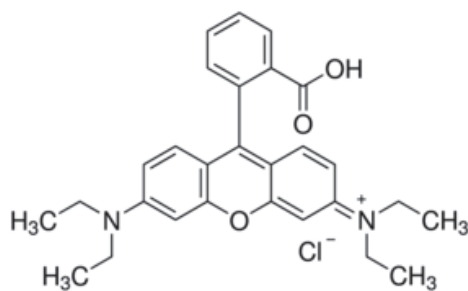


Figure 2.1: Structure moléculaire de la Rhodamine B.

2.1.1 La Rhodamine B : un chromophore thermosensible

A température ambiante, le rendement quantique de la Rhodamine B est très proche de 1 ce qui rend ce chromophore naturellement très fluorescent [13]. Cependant, son rendement quantique chute drastiquement avec une augmentation de la température. Cela est une conséquence directe de la rotation de ses deux groupes diéthylamines sur l'anneau xanthène (Figure 2.1) [14] [15]. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, des rotations intramoléculaires peuvent augmenter le couplage entre les états excités et l'état fondamental ce qui a tendance à augmenter le taux de désexcitations par transitions non-radiatives et donc à faire diminuer le rendement quantique de l'espèce.

La bande d'absorption et la bande d'émission de la Rhodamine B sont dans le visible rendant la détection de ce chromophore possible avec l'instrumentation disponible. Les spectres d'absorption et le spectre d'émission de la Rhodamine B en solution dans le Méthanol sont donnés en Figure 2.2.a. A température ambiante, la durée de vie de la Rhodamine B dans le Méthanol est de 2.55 ± 0.05 ns (Figure 2.2.b), valeur compatible avec la littérature [16].

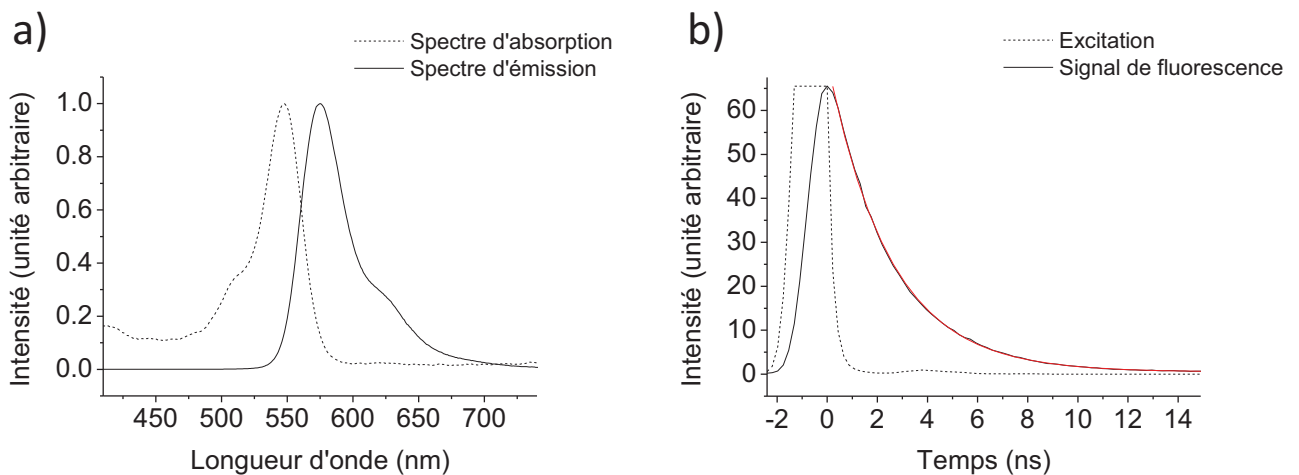


Figure 2.2 : a) Spectre d'absorption (pointillé) et spectre d'émission (continu) de la Rhodamine B dans le Méthanol ($\lambda_{ex} = 473$ nm) et b) décroissance du signal de fluorescence de la Rhodamine B dans le Méthanol en fonction du temps mesurée avec le Fluoromax-4 avec $\lambda_{ex} = 370$ nm et $\lambda_{em} = 570$ nm. Le signal d'excitation est donné en pointillé. En rouge, on donne la régression exponentielle simple de la décroissance du signal. On trouve alors $\tau = 2.55$ ns.

Les spectres d'émission de la Rhodamine B en solution dans le Méthanol pour différentes températures sont donnés en [Figure 2.3](#). La décroissance significative du signal de fluorescence lorsque la température augmente reflète très clairement le caractère thermochromique de la Rhodamine B. En effet, sur une gamme de température allant de 30 à 100°C, l'intensité de fluorescence d'une solution de Rhodamine B a été divisée par un facteur 5.

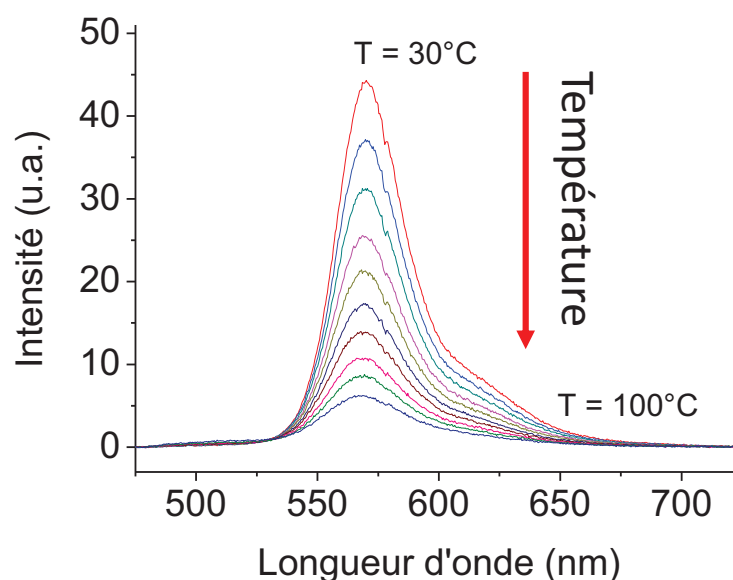


Figure 2.3: Spectre d'émission de la Rhodamine B dans le Méthanol pour différentes températures.

De la même façon, la durée de vie de fluorescence de la Rhodamine B dépend de la température et peut être utilisée comme sonde de température. Elle est donnée en fonction de la température en [Figure 2.4](#).

On notera cependant que l'instrumentation disponible dans notre laboratoire ne possède pas la résolution temporelle suffisante pour pouvoir effectuer des mesures de durée de vie de la Rhodamine B en fonction de la température avec une précision nécessaire pour des applications de thermométrie.

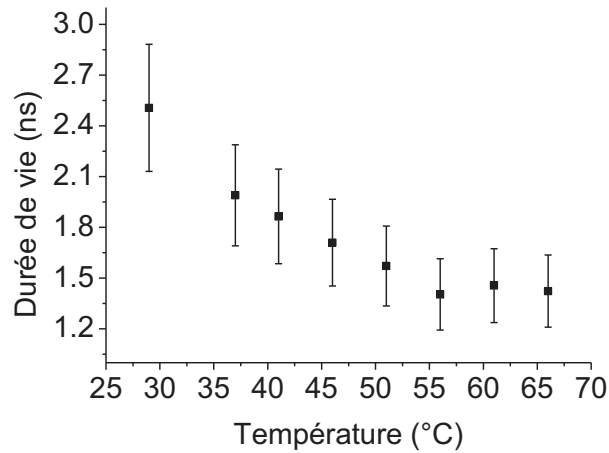


Figure 2.4: Durée de vie de fluorescence de la Rhodamine B en fonction de la température.

Enfin, le temps de corrélation rotationnel de la Rhodamine B dans le Méthanol à température ambiante est de l'ordre de la centaine de picosecondes. La Rhodamine B est une petite molécule organique (479 Da), si bien que son mouvement brownien dans un solvant peu visqueux et à température ambiante est très rapide. Donc de la même façon, les instruments de mesure disponibles au laboratoire n'ont pas la résolution temporelle suffisante. De même pour l'anisotropie de fluorescence en régime statique : dans ces conditions, l'anisotropie de fluorescence statique est détectable, mais est très proche du seuil de détection de notre montage expérimental ($r \sim 0.01$). Des mesures d'anisotropie de fluorescence sur ce système ne sont donc pas envisageables pour des mesures de température.

2.1.2 Synthèse des nanoparticules fonctionnalisées

Une méthode de polymérisation par émulsion sans tensio-actif (*surfactant-free emulsion polymerization* – SFEP) du styrène a été développée. Cette méthode nécessite des temps de réactions longs (supérieurs à 6 heures) puisque sans agents tensio-actifs il n’y a pas de micelles pour alimenter la croissance des particules : celles-ci grossissent seules dans le milieu. Le principe de la polymérisation en émulsion sans tensio-actif est décrit schématiquement en **Figure 2.5** :

- La nucléation débute par la formation de radicaux qui se fait par décomposition thermique de l’initiateur. Ensuite a lieu l’amorçage et la propagation du monomère dissous dans la phase aqueuse pour former des oligoradicaux. La terminaison des oligoradicaux conduit à des oligomères qui ont un caractère de tensioactif. Ainsi ils peuvent s’adsorber aux interfaces et contribuer à la stabilisation des gouttelettes.
- La croissance des particules est assurée par la propagation du monomère présent dans le mélange. Les gouttelettes servent de réservoir de ce monomère. Afin que la propagation ait lieu, un apport continu de radicaux (assuré par la décomposition lente de l’initiateur) est nécessaire.
- La fin de la polymérisation est atteinte lorsque le monomère est entièrement consommé. De ce fait, les gouttelettes disparaissent et laissent place aux particules.

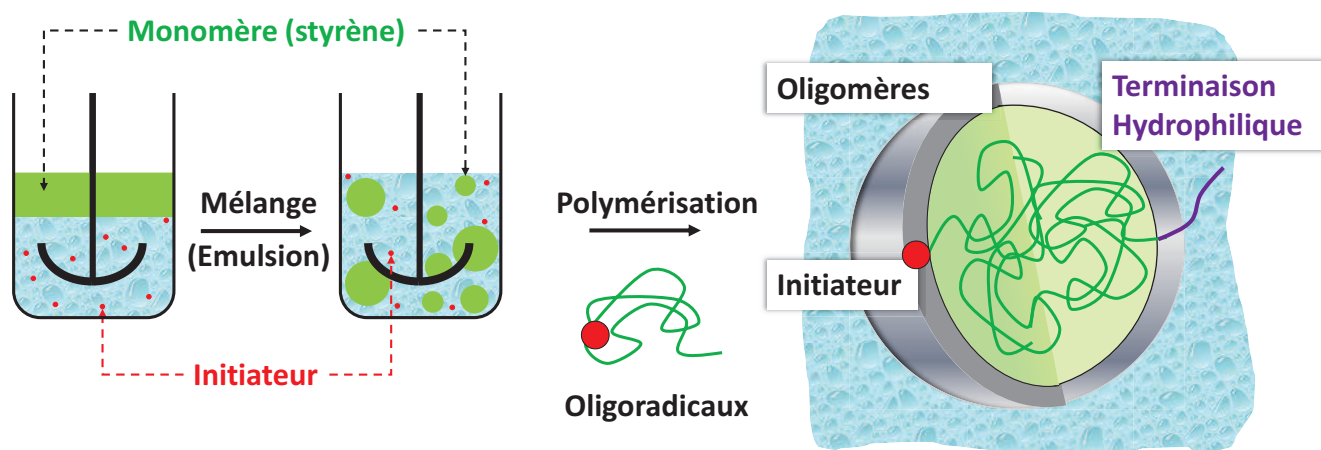


Figure 2.5 : Principe de la polymérisation en émulsion sans tensio-actif.

Deux approches, respectivement *in situ* ou *ex situ*, ont été étudiées pour la synthèse de particules de polystyrène (latex) dopées en Rhodamines B, situées respectivement dans le cœur de la particule ou à sa surface. Ces types de polymérisation de monomères hydrophobes en présence d'initiateurs ioniques sont de bons exemples de systèmes d'auto-régulation vis-à-vis de leur stabilité colloïdale. Durant le processus de polymérisation, l'essentiel des propriétés du système (densité de charge surfacique, taille des particules, distribution en taille, morphologie) se développent de sorte que l'énergie libre du système soit minimisée afin d'assurer sa stabilité [17], [18].

Approche *in situ*

Les particules de latex dopées en Rhodamines B incorporées ont été produites par polymérisation par émulsion sans tensio-actif en utilisant le potassium persulfate (KPS, Figure 2.6) comme initiateur anionique.

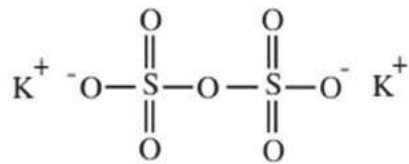


Figure 2.6 : Structure moléculaire du potassium persulfate.

La polymérisation en émulsion a été menée à 70 °C sous atmosphère inerte d'azote dans un réacteur en verre de 300 mL équipé d'un condenseur et une entrée d'azote gazeux. Le dégazage de la solution aqueuse de l'initiateur a été mené durant 30 min. Pendant ce temps, la Rhodamine B est dissoute dans l'eau puis mélangée au styrène, dégazée, puis ajoutée en une seule fois à la phase aqueuse de l'initiateur sous agitation forcée intense avant d'augmenter la température afin de commencer la polymérisation.

Avant utilisation, les particules de latex ont été dialysées dans de l'eau deionisée avec une membrane de cellulose de 23 mm ayant un point de coupure supérieur à 6 kDa (Spectra/Por1, 6K-8K MWCO). Une analyse spectrofluorométrique du surnageant de la dialyse indique que l'incorporation des colorants dans les latex a été faite de façon efficace. En effet le surnageant montre un signal de fluorescence extrêmement faible. En d'autres termes, aucune molécule libre

de Rhodamine B n'a pu être détectée en solution indiquant un taux d'encapsulation des chromophores proche de 100%.

En solution, la Rhodamine B existe sous forme neutre ou ionique suivant le pH [19]. Pour les particules de latex dopées en Rhodamines B par incorporation, la réaction se fait en milieu acide (à cause de la décomposition du persulfate). La Rhodamine B est donc chargée positivement et a tendance à interagir avec le KPS ou avec les particules chargées négativement formées dans les premiers instants du processus de polymérisation, favorisant leur incorporation dans la particule de latex par interaction électrostatique. Ces interactions n'affectent pas la stabilité colloïdale des particules de latex qui est assurée par les charges négatives des fragments de l'initiateur qui sont en large excès devant la quantité de molécule de Rhodamine B introduite.

Approche ex situ

Une procédure similaire a été utilisée pour la synthèse de particule de latex pur excepté que les chromophores n'étaient pas présents et que la réaction s'est faite en présence de NaCl afin de contrôler la taille de la particule. Ce dernier a été dissout en solution aqueuse en même temps que le KPS avec une concentration de 40 mM. Les particules de latex dopées en Rhodamines B adsorbées ont été obtenues en ajoutant 0.06 g d'une solution aqueuse de Rhodamine B à 50 g/L dans 5 g de solution dialysée de latex en suspension gardé sous agitation continue (la concentration finale de Rhodamine B est de 1.25 mM). Elles ont ensuite été lavées par des cycles de centrifugation et de redispersion successifs dans de l'eau deionisée jusqu'à ce que le surnageant ne présente plus de signal de fluorescence détectable. L'interaction entre les molécules de Rhodamine B (chargées positivement) et les particules de latex pur (chargées négativement) se fait uniquement par interaction électrostatique avec les charges surfaciques de la nanoparticule de latex.

Que ce soit pour l'approche *in situ* ou *ex situ* (Figure 2.7), la taille des nanoparticules peut facilement être ajustée de quelques centaines de nanomètres à quelques micromètres en modifiant la concentration de l'initiateur, la force ionique (par l'addition de sels) et/ou la concentration et composition du monomère initiale. Une seule gamme de taille de nanoparticules a été utilisée pour la suite.

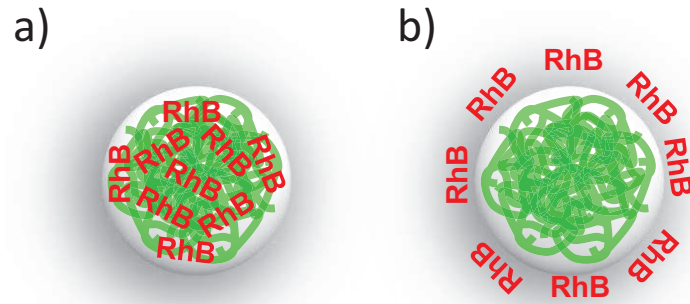


Figure 2.7: Image conceptuelle de (a) l'approche in situ et b) l'approche ex situ. Le polymère de latex est représenté en vert et forme le corps de la nanoparticule. Les molécules de Rhodamine sont représentées par l'acronyme RhB et se situent soit incorporées dans la matrice de latex, soit adsorbées à la surface de la particule.

2.2 Caractérisation des nanoparticules

Plusieurs techniques d'analyse ont été effectuées afin de caractériser complètement les nanoparticules synthétisées selon le protocole précédant. On se propose dans ce paragraphe de décrire les méthodes et les principaux résultats pour la caractérisation de nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées et adsorbées, issues des approches *in situ* et *ex situ* respectivement

2.2.1 Analyse par Microscopie Electronique en Transmission (TEM)

Cette caractérisation en taille a été réalisée par Microscopie Electronique en Transmission au Centre Technologique des Microstructures (CT μ , Université de Claude Bernard, Villeurbanne, France). Une goutte de nanoparticule de latex en suspension préalablement diluée est déposée sur une grille de cuivre enduite de Formvar (résine thermoplastique) et laissée évaporée avant analyse. L'observation est faite avec un microscope Philips CM120 opérant à 80 kV. Une image typique de nanoparticule fonctionnalisée est donnée en [Figure 2.8](#). La valeur du diamètre moyen D_n est défini par

$$D_n = \frac{\sum_i n_i D_i}{\sum_i n_i} \quad (2.1)$$

Où n_i est le nombre de particules de diamètre D_i , a été déterminé en comptant plus de 500 particules. L'indice de polydispersité IPD a été calculé selon l'équation

$$IPD = D_w/D_n \quad (2.2)$$

Avec D_w , diamètre moyen en mass défini par

$$D_w = \frac{\sum_i n_i D_i^4}{\sum_i n_i D_i^3} \quad (2.3)$$

D'après l'analyse Microscopie Electronique en Transmission, le nombre de particules par unité de volume N_p peut être déterminé selon l'équation :

$$N_p(L^{-1}) = \frac{6 \times c \times 10^3}{\pi \times D_n \times d_{poly} \times 10^{-21}} \quad (2.4)$$

Où c est la concentration du polymère déterminée par gravimétrie (en $g.L^{-1}$), D_n le diamètre moyen (en nm) et d_{poly} la densité du polymère. Ici $d_{poly} = 1.05$ ce qui correspond à la densité du polystyrène.

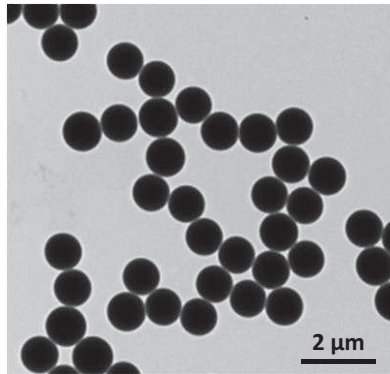


Figure 2.8 : Image par Microscopie Electronique en Transmission des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées.

2.2.2 Analyse par Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL)

Le diamètre hydrodynamique noté Z_{moy} des particules a été mesuré par Diffusion Dynamique de la Lumière au laboratoire de Chimie Catalyse Polymères et Procédés (C2P2, Université de Claude Bernard, Villeurbanne, France) sur un Zetasizer Nano ZS de Malvern. Une solution infiniment diluée de nanoparticules en suspension est illuminée par un laser de longueur d'onde 633 nm, hors de la bande d'absorption des particules de latex dopées en Rhodamines B. L'intensité du signal diffusé est collectée à un angle 173° puis analysée en fonction du temps. Un calcul d'autocorrélation de ce signal basé sur une méthode d'analyse par Cumulants (paramètres statistiques) donne accès à la taille des particules et à leur dispersion en taille. En effet, connaissant les paramètres physico-chimiques du solvant dans lequel les particules sont dispersées – ici, dans de l'eau à $25^\circ C$ – l'intensité du signal diffusé par rapport au temps est fonction du mouvement Brownien des particules, lui-même fonction de leur taille. De façon

simpliste, si les variations du signal diffusé évoluent rapidement dans le temps, la fonction d'autocorrélation atteint rapidement 0 traduisant un mouvement rapide des particules, donc à des particules de petite taille. Inversement, si les variations du signal sont plus lentes, interprétées par un mouvement lent des particules, cela signifie que les particules sont plus grosses. La distribution en taille des particules est donnée par un coefficient calculé depuis les paramètres utilisés dans la méthode d'analyse par Cumulants. En pratique, si cet indice est inférieur à 0.07, l'échantillon est considéré comme très « mono-dispersé », s'il est compris entre 0.07 et 0.12, la distribution en taille de l'échantillon est modérément dispersée, mais s'il est supérieur à 0.12, l'échantillon est dit très « poly-dispersé » et la mesure par Diffusion Dynamique de la Lumière est difficilement interprétable.

2.2.3 Analyse par Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)

Afin d'étudier le caractère fluorescent de ces nanoparticules, une technique d'analyse par Microscopie Confocale à Balayage Laser a été effectuée au Centre Technologique des Microstructures (CT μ , Université de Claude Bernard, Villeurbanne, France) sur un microscope LSM510META de Zeiss. La microscopie confocale est une technique de microscopie optique où l'objet n'est pas visualisé directement par l'observateur, mais où l'image est recomposée numériquement en scannant l'échantillon en fonction du signal de fluorescence émis par celui-ci. Un laser d'excitation est focalisé dans un plan de l'échantillon. Le signal de fluorescence est recueilli en positionnant le plan focal de l'objectif dans le plan focal de l'excitation (Figure 2.9).

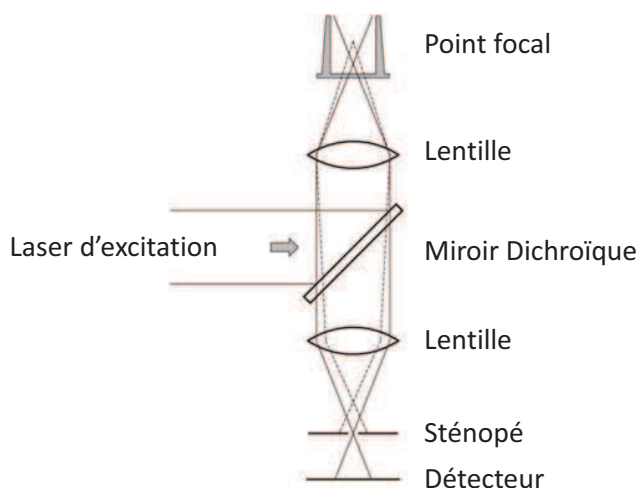


Figure 2.9: Schéma de principe du fonctionnement d'un microscope confocal.

L'utilisation d'un sténopé (ou diaphragme) dans le plan focal conjugué de l'objectif permet alors de ne sélectionner que la lumière émise au sein de ce plan en bloquant le reste.

Typiquement, cette technique permet de ne détecter que les éléments fluorescents d'un échantillon et d'augmenter la résolution latérale ainsi que la résolution axiale. En effet, quel que soit le système utilisé en imagerie optique, l'image d'un point n'est jamais un point, mais la figure de diffraction du point. Cette figure est représentée par la fonction d'étalement du point: elle décrit la réponse d'un système d'imagerie optique (dans le plan latéral, cette figure est bien connue et est appelée tâche d'Airy - **Figure 2.10.a– Non disponible dans la version expurgée**). C'est la présence du sténopé qui va limiter cette fonction d'étalement en bloquant une partie du signal diffracté augmentant ainsi la résolution latérale et axiale [20]. L'épaisseur de la tranche optique varie ainsi en fonction de l'ouverture du diaphragme confocal. On peut noter qu'en dessous d'une certaine valeur (limite de la résolution axiale du système), la fermeture du diaphragme n'entraîne plus d'amélioration de la qualité de l'image, mais produit une perte d'intensité lumineuse. Pour un objectif de très bonne ouverture numérique (1,4), l'épaisseur minimale d'une coupe optique par microscopie confocale est d'environ $0.5 \mu\text{m}$ (**Figure 2.10.c– Non disponible dans la version expurgée**)

Figure 2.10: Images a) latérale et b) axiale d'un point à travers un système optique. Le disque central est appelé tâche d'Airy, son rayon définit l'unité d'Airy. c) Dépendance de l'épaisseur d'une tranche optique en fonction de l'ouverture du sténopé pour un système de microscopie confocale. (référence [20])

Ici, une excitation laser de 543 nm a été utilisée pour avoir une excitation efficace de la Rhodamine B. Le signal d'émission est collecté entre 558 et 708 nm. Les images sont recueillies grâce à un objectif apochromatique x63/1.4 NA et une ouverture du sténopé égale à 1 Unité d'Airy (Figure 2.11). Dans ces conditions, l'observation pour la microscopie confocale est optimale ; nous ne collectons que la lumière émise par fluorescence provenant du plan focal, permettant d'observer des sections optiques d'épaisseur 0.8 μm (résolution axiale) et de résolution latérale de 0.25 μm . Les paramètres d'excitation et de collection tels que la puissance laser, l'ouverture du sténopé, le gain des détecteurs et la limite de détection (composante continue des détecteur) ont été ajustés afin d'obtenir une image optimale. En tant que référence, des nanoparticules de latex non-dopées en Rhodamines B (avant adsorption des chromophores) ont été utilisées.

2.2.4 Résultats

Les valeurs de tailles mesurées par Microscopie Electronique en Transmission et par Diffusion Dynamique de la Lumière sont résumées en Table 2.1. Ces deux techniques d'analyses donnent des résultats équivalents. Les nanoparticules ainsi synthétisées ont en moyenne des tailles de l'ordre de 900 nm avec une distribution uniforme.

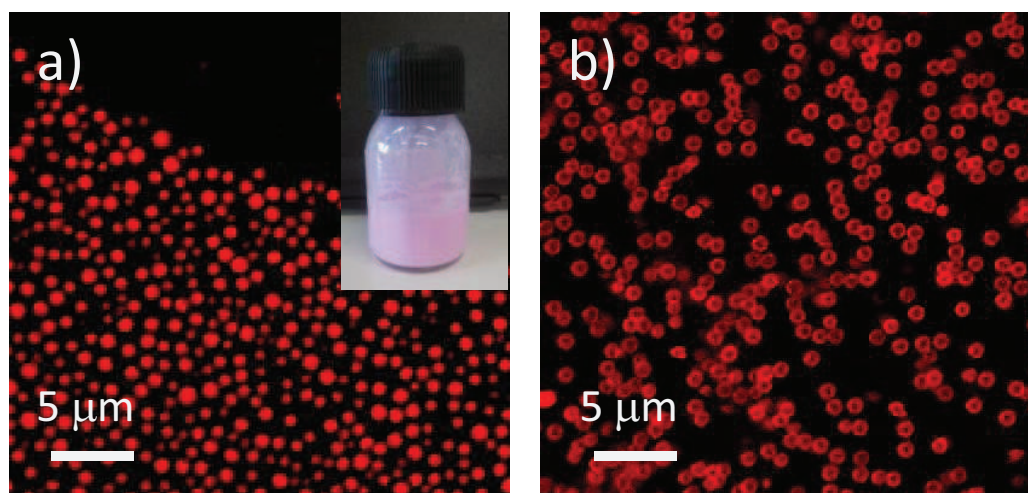


Figure 2.11 : Image par MCBL (fausses couleurs) a) des nanoparticules de latex dopées en Rhodamine B incorporées, b) des nanoparticules de latex dopées en Rhodamine B adsorbées. En insert, une photographie couleur d'une solution de nanoparticules dopées en Rhodamine B incorporées en suspension.

Table 2.1: Tailles et distributions mesurées par TEM et DDL

	D_n -TEM- (nm)	IPD -TEM-	Z_{moy} -DDL - (nm)	Poly - DDL
Latex RhB-incorporées	930	1.2	890	0.09
Latex RhB-adsorbées	900	1.01	1050	0.07

De plus, les images confocales montrent un caractère très fluorescent des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées et adsorbées alors qu'aucun signal n'a pu être détecté pour l'échantillon de référence (latex purs) avec les mêmes paramètres d'observation. De plus, il est montré que l'incorporation des Rhodamines B à l'intérieur des latex a été menée de façon efficace et uniforme sur tout le volume de la nanoparticule en opposition à l'adsorption des chromophores sur la surface des nanoparticules de latex. En effet, les résolutions latérale et axiale inhérentes à l'analyse par MCBL permettent d'observer un anneau fluorescent à la périphérie des particules de latex dopées en Rhodamines B adsorbées (Figure 2.11 b). Un calcul basé sur la proportion des réactifs utilisés pour la synthèse des particules et sur leur taille nous indique qu'en moyenne, environ 2×10^3 molécules de Rhodamine B sont incorporées par particule. Enfin, une comparaison entre les images confocales et les images obtenues par microscopie par transmission optique (Figure 2.12) montre que la totalité des nanoparticules de latex sont fluorescentes.

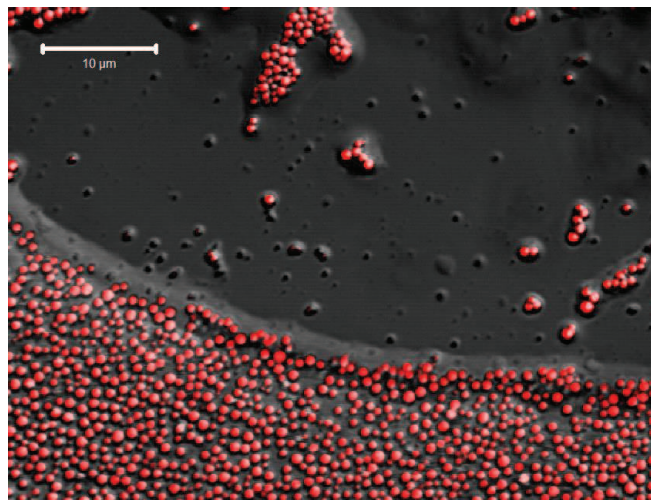


Figure 2.12 : Superposition d'une image par MCBL et de la même image prise par microscopie en transmission optique. On observe quelques traces de solvant évaporées non-uniformément, mais toutes les nanoparticules de latex émettent un signal de fluorescence.

2.3 De la solution vers la nanoparticule unique

Dans ce paragraphe, une étude des propriétés thermochromiques des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées et adsorbées a été menée. Il est montré que les propriétés thermochromiques des Rhodamines B ont été préservées et que ces objets peuvent être utilisés pour une thermographie multi-échelle : d'une thermographie macroscopique grâce aux nanoparticules fonctionnalisées dispersées en solution vers une mesure thermographique sur une nanoparticule unique permettant une résolution spatiale sub-micrométrique.

2.3.1 Réponse en température des nanoparticules dispersées en solution

Réponse en température des nanoparticules fonctionnalisées

La **Figure 2.13.a** montre le signal de fluorescence des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées dispersées en solution aqueuse en fonction de la température lorsqu'elles sont excitées à 473 nm. L'émission des nanoparticules subit une modification significative de l'intensité du signal de fluorescence, de la position de la bande d'émission et de la largeur de la bande d'émission lorsque la température augmente. La position de la flèche indique l'évolution de la position du maximum de fluorescence qui est fonction de la température. L'intensité du pic de fluorescence a une réponse linéaire en température pour une variation de température entre 30 et 100°C avec une grande sensibilité : -0.93% par °C (**Figure 2.13.b**). De façon concomitante, la position du pic présente un décalage vers le bleu avec une sensibilité de -0.019 nm par °C et avec une réponse linéaire entre 30 et 100°C (**Figure 2.13.c**).

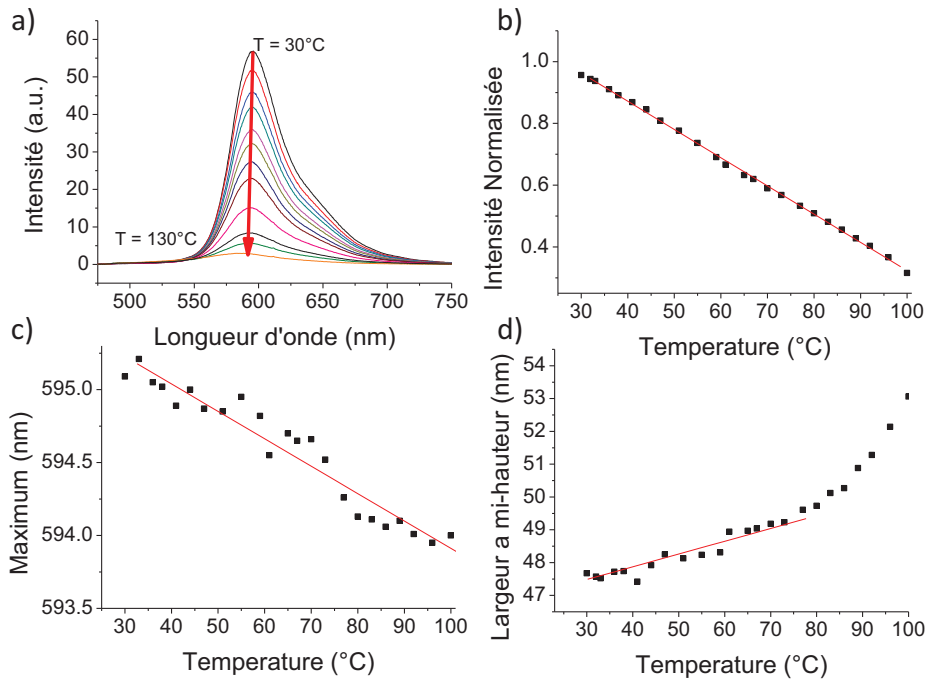


Figure 2.13 : a) Spectre d'émission des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées pour des températures allant de 30 à 130°C. b) Intensité du signal de fluorescence en fonction de la température. c) Position du maximum d'émission en fonction de la température. d) Largeur à mi-hauteur de la bande d'émission en fonction de la température. Une régression linéaire de chaque courbe est donnée en rouge.

De plus, la diminution en intensité est non uniforme sur la bande d'émission avec une diminution plus faible pour la partie rouge du spectre. Cette non-uniformité induit alors une modification notable de la forme du spectre traduite par un élargissement de la bande d'émission. Cet élargissement peut être caractérisé par la largeur à mi-hauteur du signal (Figure 2.13.d). Même si cet effet reste modéré (+0.067 nm par °C de 30 à 70°C pour la partie linéaire) c'est une alternative possible pour une thermométrie par ratiométrie (ratio bande bleu sur bande rouge).

Influence de la localisation du chromophore : chromophore libre, adsorbé ou incorporé

Afin d'évaluer l'effet de la localisation du chromophore dans la particule de polymère, nous avons comparé la réponse en température de la Rhodamine B en solution aqueuse avec celle des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées et adsorbées (Figure 2.14.a).

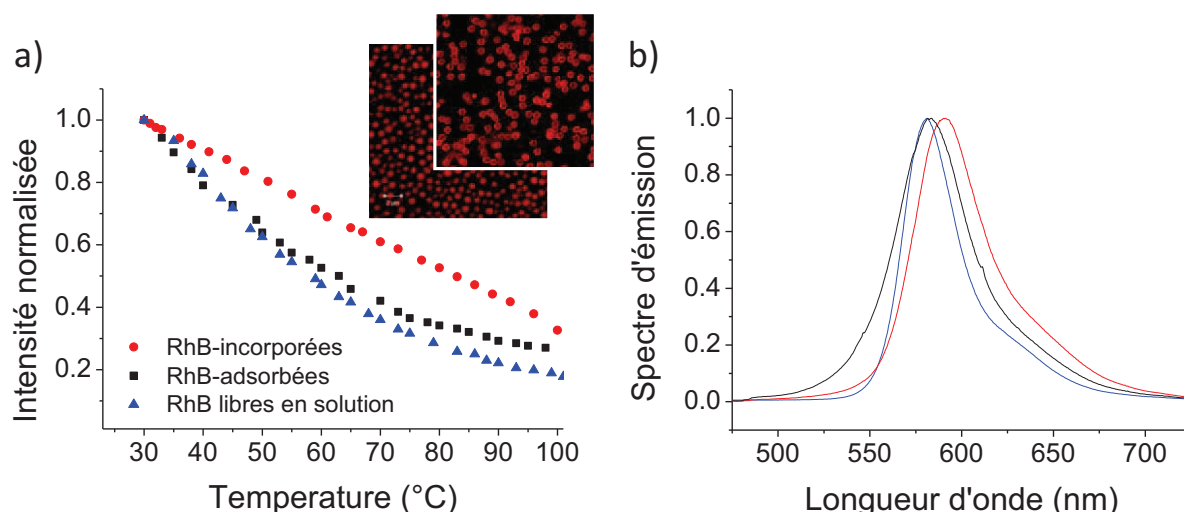


Figure 2.14 : a) Intensité du signal de fluorescence en fonction de la température normalisée à 30°C et b) spectre d'émission pour les nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées (rouge) et adsorbées (noir) ainsi que pour les Rhodamines B libre (bleu) en solution aqueuse à 30°C.

Il est montré que les nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées ont une dépendance linéaire en température jusqu'à 100°C. En opposition, il est montré que les nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B adsorbées ont une sensibilité en température plus élevée mais non linéaire, similairement aux Rhodamines B libres en solution. Ceci semble indiquer que la modification de l'environnement local des Rhodamines B lorsqu'elles sont incorporées dans la particule semble avoir un effet sur la distribution en niveau d'énergie de ses

états excités. Autrement dit, les rotations des groupes diéthylamines sur l'anneau xanthène apparaissent affectées par la matrice de latex. Tout comme les Rhodamines B libres en solution, les chromophores adsorbés en surface de la particule ne sont que très peu affectés par la matrice de latex polymère ; ils montrent donc les mêmes caractéristiques thermochromiques.

De la même façon, le spectre de fluorescence des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées est légèrement modifiée de ceux où les Rhodamines ne sont pas en contact direct avec la matrice de latex (Figure 2.14.b) : un décalage notable vers le rouge du maximum d'émission des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées est observé (~7 nm).

Réversibilité

Une problématique importante pour cette étude et pour l'utilisation de particules thermosensibles est la question de la réversibilité de leurs propriétés d'émission. Une fois chauffées à des températures supérieures à 100°C, les nanoparticules montrent une altération irréversible de leurs propriétés de fluorescence après refroidissement contrairement à la solution de Rhodamine B (Figure 2.15).

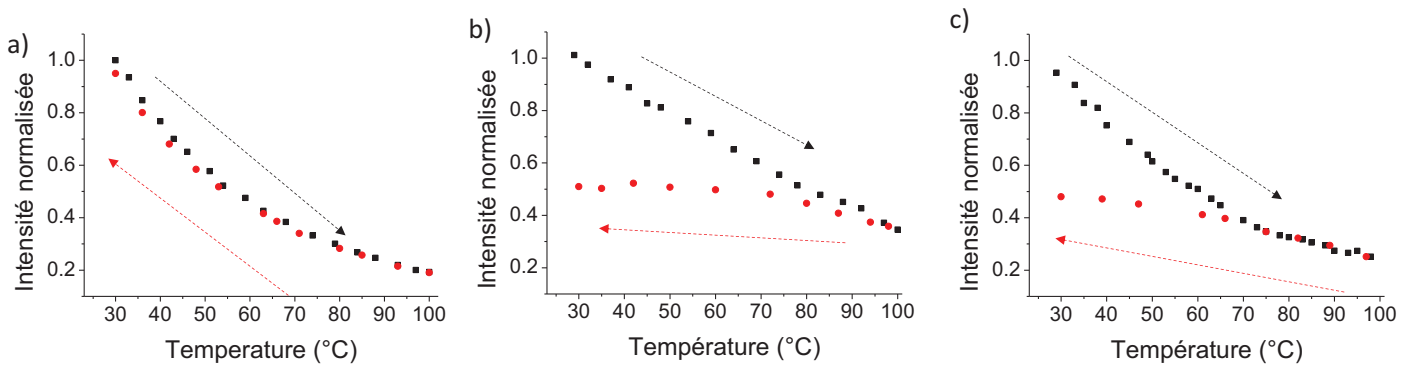


Figure 2.15: Intensité du signal de fluorescence a) de la Rhodamine B en solution, b) des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées et c) des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B adsorbées lorsque (noir) la température augmente et (rouge) lorsque la température diminue pour une gamme de température allant de 30 à 100°C.

Des mesures par Diffusion Dynamique de la Lumière sur ces échantillons chauffés à très haute température montrent une modification significative de la distribution en taille des particules. En effet, avant chauffage, la taille des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées est de 890 nm avec un indice de polydispersité 0.086. La courbe d'autocorrélation correspondante prend comme valeur 0.96 aux temps courts et possède un unique plateau bien défini aux temps longs indiquant une mesure précise et reproductible (Figure 2.16.a).

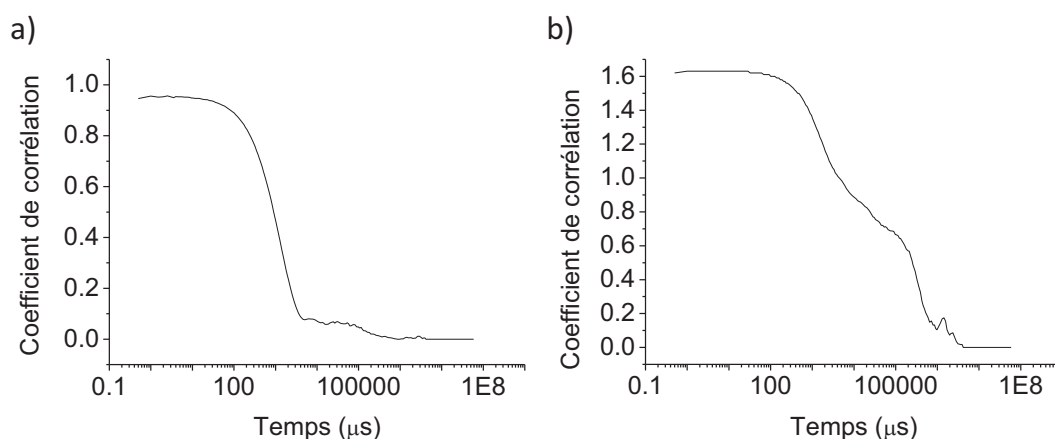


Figure 2.16: Fonction d'autocorrélation de la mesure de Diffusion Dynamique de la Lumière des nanoparticules dopées en Rhodamines B incorporées a) avant chauffage et b) après chauffage

Après chauffage, ce même échantillon révèle une taille de 2200 nm avec un indice de polydispersité de 0.96. La courbe d'autocorrélation correspondante prend comme valeur 1.63 aux temps courts et possède deux plateaux aux temps longs caractéristiques d'une mesure non reproductible et d'un échantillon très hétérogène mettant en évidence un phénomène d'agglomération des nanoparticules très important (Figure 2.16.b). C'est cette agglomération qui serait la cause de l'irréversibilité de la réponse en température des nanoparticules.

Cependant, une étude sur des cycles de chauffage / refroidissement (Figure 2.17) dans une gamme de température allant de 30 à 50°C a été menée pour les trois systèmes (Rhodamines B libres, incorporées et adsorbées). Cette étude montre que sur la gamme 30-50°C les Rhodamines B libres et les nanoparticules dopées en Rhodamines B incorporées présentent une bonne réversibilité de leurs propriétés de fluorescence sur au moins quatre cycle de chauffage / refroidissement alors que les nanoparticules dopées en Rhodamines B adsorbées montrent un caractère irréversible de leurs propriétés de fluorescence avec la température dès le premier cycle.

Effectivement, après le premier cycle de chauffage / refroidissement, nous avons centrifugé les échantillons afin d'étudier leur surnageant. Le signal de fluorescence du surnageant des nanoparticules dopées en Rhodamines B incorporées est resté inchangé après chauffage ce qui confirme une bonne incorporation des chromophores dans la matrice de latex. Cependant, l'intensité du signal du surnageant des nanoparticules dopées en Rhodamines B adsorbées a augmentée d'un facteur ~ 3.5 indiquant un relargage des chromophores initialement en interaction électrostatique à la surface des nanoparticules par une augmentation de la température.

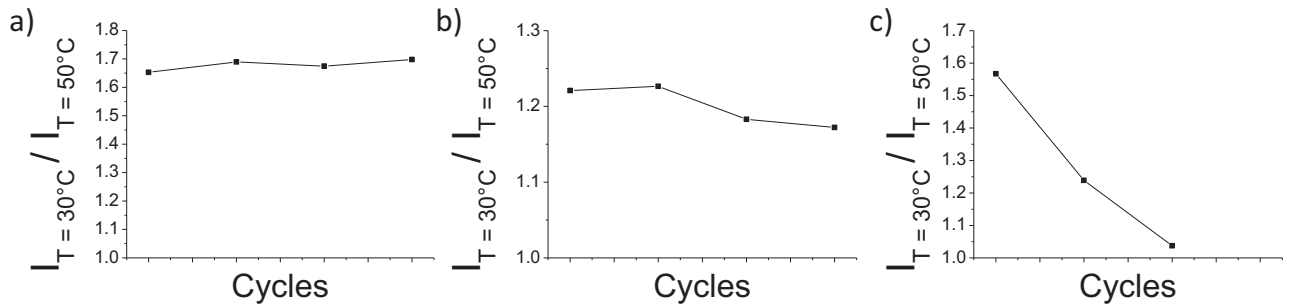


Figure 2.17 : Ratio des intensités du signal de fluorescence à 30 et 50°C en fonction du nombre de cycle de chauffage / refroidissement pour a) des Rhodamines libre en solution aqueuse, b) des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées et c) adsorbées.

2.3.2 Vers une approche « nano-thermomètre » unique

Afin d'évaluer la réponse d'une nanoparticule unique, une nouvelle série d'expérience par Microscopie Confocale à Balayage Laser a été effectuée en mode d'acquisition spectrale et en fonction de la température. L'excitation laser est faite à 543 nm comme précédemment, cependant le signal d'émission est collecté entre 558 et 708 nm et redispersé sur 15 capteurs différents par pas de 10 nm environ. Les images sont recueillies grâce au même objectif que précédemment, mais l'ouverture du sténopé est maintenant égale à 2.5 Unité d'Airy. Dans ces conditions d'observation, nous ne sommes plus en configuration confocale optimale : l'ouverture du sténopé traduit une forte baisse de la résolution cependant, tout le signal de fluorescence des nanoparticules est collecté ce qui permet une comparaison relative de l'intensité de fluorescence totale d'une particule indifféremment du plan focal d'observation. Afin d'être certain que tout le signal soit recueilli, une intégration toute la fonction d'étalement du point a été effectuée. En d'autres termes, nous avons fait la somme du signal de fluorescence sur des sections optiques

successives selon la profondeur de l'échantillon (tous les 2 μm sur 10 μm). Le détail des images selon la longueur d'onde de détection et la section optique de l'échantillon est donné en [Figure 2.18](#).

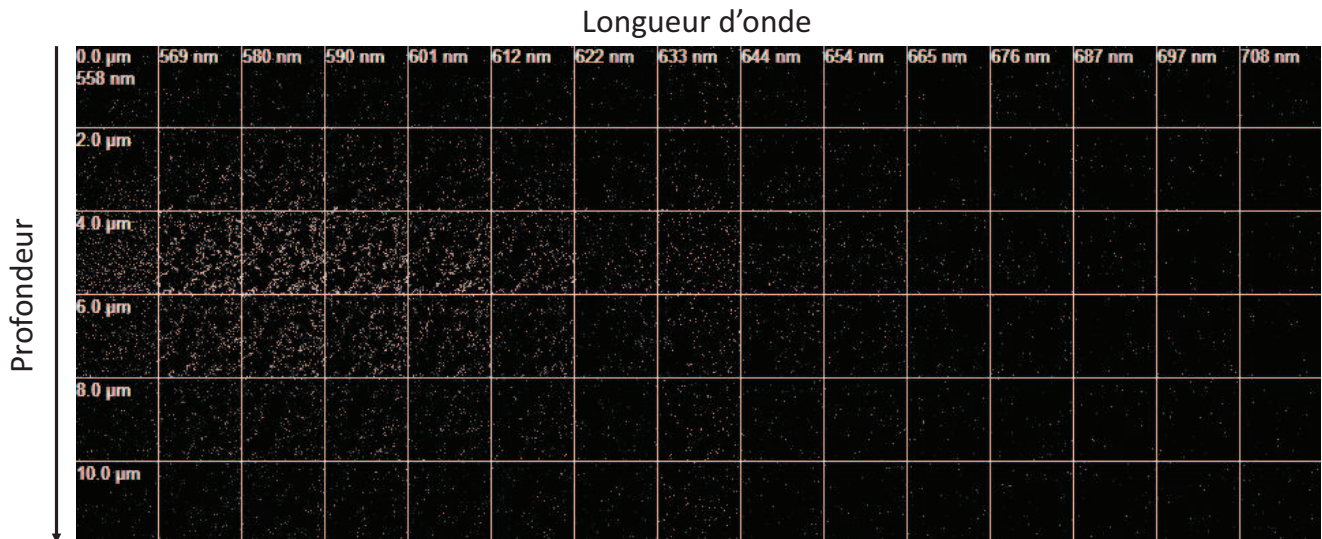


Figure 2.18 : Panel des images collectées en mode d'acquisitions spectral pour l'analyse par MCBL des nanoparticules de latex dopées en Rhodamines B incorporées. De gauche à droite la longueur d'onde de collection et de haut en bas, la profondeur.

De plus le microscope LSM510META de Zeiss a été équipé d'une chambre réglée en température ([Figure 2.19](#)) permettant de contrôler la température de l'échantillon sur une gamme allant de 30 à 50°C. Les spectres d'émission d'une nanoparticule unique pour plusieurs températures sont donnés en [Figure 2.20.a](#). Comme en solution, on note une diminution important de l'intensité du signal de fluorescence lorsque la température de la chambre du microscope augmente. On montre également que la réponse en température de l'intensité de fluorescence normalisée à 30°C des nanoparticules uniques (individuelle : insert [Figure 2.20.a](#) et moyennée sur 7 nanoparticules distinctes : [Figure 2.20.b](#)) est statistiquement identique à la réponse en température des nanoparticules dispersées en solution pour la gamme de température explorée ([Figure 2.20.b](#)). De la même façon, la réponse individuelle des nanoparticules montre une bonne réversibilité sur un cycle de chauffage / refroidissement entre 30 et 50°C.

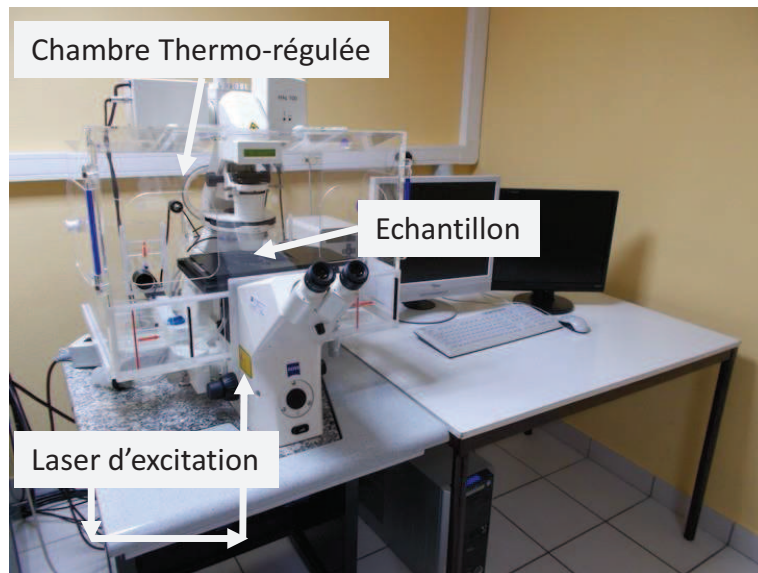


Figure 2.20 : Photographie du dispositif expérimental pour la MCBL résolue en température. On distingue la chambre régulée en température en plexiglass qui permet le contrôle en température de l'échantillon.

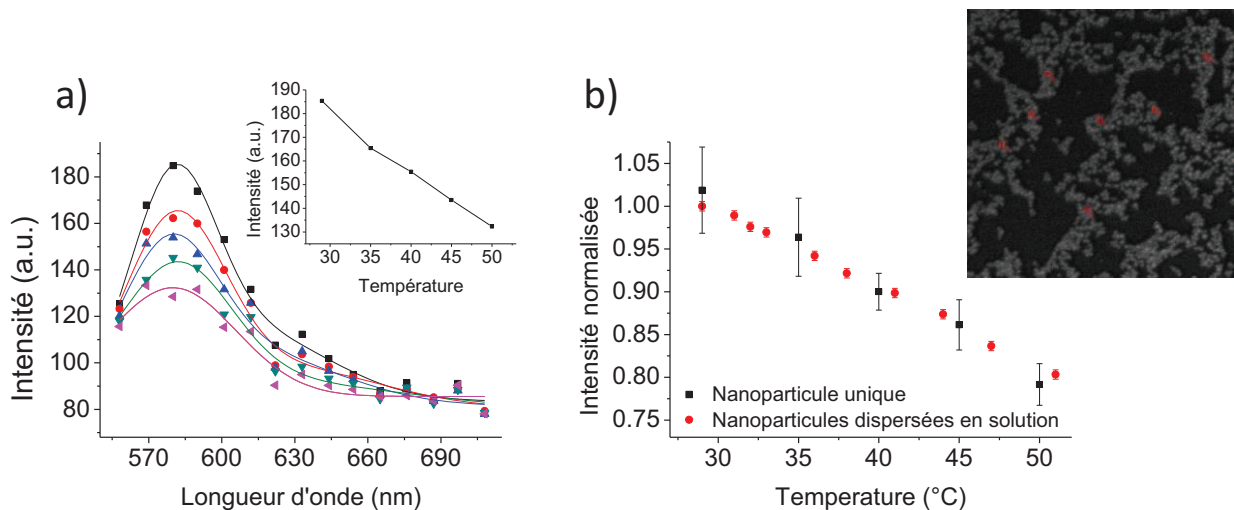


Figure 2.19 : a) Spectres d'émission d'une particule unique collectés par Microscopie Confocale à Balayage Laser en mode d'acquisition spectrale pour différentes températures. En insert, l'intensité d'une nanoparticule unique en fonction de la température. b) Intensité du signal de fluorescence issue d'une particule unique (noir) et intensité du signal de fluorescence issue ces mêmes nanoparticules dispersées en solution en fonction de la température. Les barres d'erreurs correspondent à la déviation standard des mesures effectuées sur 7 nanoparticules distinctes (marquées en rouge en insert).

Conclusion

Une synthèse polyvalente, efficace et à faible coût de nanoparticules fonctionnalisées pour la nanothermométrie est proposée. Des protocoles simples pour produire des nanoparticules de polystyrène dopées en Rhodamines B incorporées et adsorbées ont été présentés. Nous avons montré que les nanoparticules de polystyrène dopées en Rhodamines B incorporées étaient des candidats idéaux comme outils thermométriques avec une réponse en température très sensible, linéaire sur une vaste gamme de température (de 30°C à 100°C) et réversible pour des températures comprises entre 30 et 50°C. Ces outils sont également directement utilisables pour des mesures de température à l'échelle macroscopique jusqu'à l'échelle sub-micrométrique par Microscopie Confocale à Balayage Laser [21]. A travers des modifications mineures du protocole de synthèse (changement de concentration de l'initiateur, de la force ionique et/ou de la concentration initiale de monomère) et le développement de la Microscopie Confocale Super-Résolue [22], une thermographie sub-100nm serait alors envisageable.

Références

- [1] V. M. Chauhan *et al.*, “Thermo-optical characterization of fluorescent rhodamine B based temperature-sensitive nanosensors using a CMOS MEMS micro-hotplate(),” *Sens. Actuators. B. Chem.*, vol. 192, pp. 126–133, Mar. 2014.
- [2] M. K. Bhargat, R. P. Haugland, J. S. Pollack, S. Swan, and R. P. Haugland, “Green- and red-fluorescent nanospheres for the detection of cell surface receptors by flow cytometry,” *J. Immunol. Methods*, vol. 219, no. 1–2, pp. 57–68, Oct. 1998.
- [3] K. L. Kellar and M. A. Iannone, “Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays,” *Exp. Hematol.*, vol. 30, no. 11, pp. 1227–1237, Nov. 2002.
- [4] N. Wartenberg, O. Raccurt, D. Imbert, M. Mazzanti, and E. Bourgeat-Lami, “Luminescent latex particles loaded with anionic lanthanide complexes: a versatile platform for multicolour optical coding,” *J. Mater. Chem. C*, vol. 1, no. 10, pp. 2061–2068, 2013.
- [5] D.-G. Yu *et al.*, “Preparation and Characterization of Acrylic-Based Electronic Inks by In Situ Emulsifier-Free Emulsion Polymerization for Electrophoretic Displays,” *Chem. Mater.*, vol. 16, no. 23, pp. 4693–4698, Nov. 2004.
- [6] T. Behnke, C. Würth, K. Hoffmann, M. Hübner, U. Panne, and U. Resch-Genger, “Encapsulation of Hydrophobic Dyes in Polystyrene Micro- and Nanoparticles via Swelling Procedures,” *J. Fluoresc.*, vol. 21, no. 3, pp. 937–944, 2011.
- [7] X. Wang, S. Xu, and W. Xu, “Luminescent properties of dye-PMMA composite nanospheres,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 13, no. 4, pp. 1560–1567, 2011.
- [8] P. L. Smart and I. M. S. Laidlaw, “An evaluation of some fluorescent dyes for water tracing,” *Water Resour. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 15–33, 1977.
- [9] E. A. te Velde, T. Veerman, V. Subramaniam, and T. Ruers, “The use of fluorescent dyes and probes in surgical oncology,” *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 36, no. 1, pp. 6–15, Jan. 2010.
- [10] O. G. Peterson, S. A. Tuccio, and B. B. Snively, “cw OPERATION OF AN ORGANIC DYE SOLUTION LASER,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 17, no. 6, pp. 245–247, Sep. 1970.

- [11] J. Sakakibara and R. J. Adrian, “Whole field measurement of temperature in water using two-color laser induced fluorescence,” *Exp. Fluids*, vol. 26, no. 1, pp. 7–15, 1999.
- [12] D. Fogg, M. David, and K. Goodson, “Non-invasive measurement of void fraction and liquid temperature in microchannel flow boiling,” *Exp. Fluids*, vol. 46, no. 4, pp. 725–736, 2009.
- [13] I. Rosenthal, P. Peretz, and K. A. Muszkat, “Thermochromic and hyperchromic effects in Rhodamine B solutions,” *J. Phys. Chem.*, vol. 83, no. 3, pp. 350–353, Feb. 1979.
- [14] Y. Onganer and E. L. Quitevis, “Effect of solvent on nonradiative processes in xanthene dyes: pyronin B in alcohols and alcohol-water mixtures,” *J. Phys. Chem.*, vol. 96, no. 20, pp. 7996–8001, Oct. 1992.
- [15] M. J. Snare, F. E. Treloar, K. P. Ghiggino, and P. J. Thistlethwaite, “The photophysics of rhodamine B,” *J. Photochem.*, vol. 18, no. 4, pp. 335–346, 1982.
- [16] N. Boens *et al.*, “Fluorescence Lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy,” *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 5, pp. 2137–2149, Mar. 2007.
- [17] K. Tauer, R. Deckwer, I. Kühn, and C. Schellenberg, “A comprehensive experimental study of surfactant-free emulsion polymerization of styrene,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 277, no. 7, pp. 607–626, 1999.
- [18] J.-L. Ou, J.-K. Yang, and H. Chen, “Styrene/potassium persulfate/water systems: effects of hydrophilic comonomers and solvent additives on the nucleation mechanism and the particle size,” *Eur. Polym. J.*, vol. 37, no. 4, pp. 789–799, Apr. 2001.
- [19] R. W. Ramette and E. B. Sandell, “Rhodamine B Equilibria,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 78, no. 19, pp. 4872–4878, Oct. 1956.
- [20] R. W. Cole, T. Jinadasa, and C. M. Brown, “Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control,” *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 12, pp. 1929–1941, Dec. 2011.
- [21] A. Soleilhac *et al.*, “Temperature Response of Rhodamine B-Doped Latex Particles. From Solution to Single Particles,” *Langmuir*, vol. 32, no. 16, pp. 4052–4058, Apr. 2016.

- [22] B. Huang, M. Bates, and X. Zhuang, “Super resolution fluorescence microscopy,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, pp. 993–1016, 2009.

Chapitre 3 : Mesure de taille et de température de microgouttelettes chargées générées par électrospray. Vers une thermodynamique de l'électrospray.

Table des matières

Introduction	75
3.1 L'ionisation par électrospray	76
3.1.1 Principe d'ionisation par ElectroSpray.....	78
3.1.2 Propriétés de l'électrospray	80
3.2 Dispositif expérimental	82
3.2.1 Source ESI	84
3.2.2 Dispositif pour la mesure de la taille des gouttelettes.....	86
Théorie de Mie	86
Instrumentation	86
3.2.3 Dispositif pour la thermométrie des gouttelettes	89
Thermométrie statique	89
Thermométrie résolue en temps.....	90
3.2.4 Profil du spray et acquisition	93
3.3 Corrélation entre la taille et la température de microgouttelette en cours d'évaporation ..	94
3.3.1 Résultats.....	95
Mesure de la taille des gouttelettes dans le spray	95
Mesure et Comparaison thermométrie statique / résolue en temps	97
Artéfacts possibles et conditions de validité de l'approche thermochromique.....	101
3.3.2 Influence des paramètres de la source	105
Température du gaz confinant chauffé.....	105
Débit du gaz confinant chauffé	107
Pression du Gaz Nébulisant	109
Débit d'injection	111
3.3.3 Modèle théorique	113
Transfert de chaleur par conduction.....	114
Transfert de chaleur par évaporation	116
Résultats	117
Conclusion.....	124
Références	125

Introduction

Les méthodes optiques, du fait de leur caractère non-invasif, s'avèrent être des outils adaptés à la mesure de la température d'un système thermodynamique « hors-équilibre ». La physique des aérosols en est un très bon exemple. En effet, la description complète de la thermodynamique d'un aérosol composé d'un nuage de gouttelette de liquide ne peut être faite que si nous pouvons nous appuyer sur des mesures directes de la température de ces gouttelettes [1], [2]. Dans ce chapitre en particulier, nous allons nous intéresser à un type d'aérosol très largement utilisé en chimie analytique : l'électrospray [3]. La génération d'ion en phase gazeuse par électrospray a des applications analytiques diverses, c'est pourquoi, augmenter la sensibilité et l'efficacité de ces sources est un réel challenge. Ce challenge ne sera réalisable que si nous développons une compréhension des procédés fondamentaux impliqués. Nous verrons alors que les méthodes décrites dans le **Chapitre 1** sont des techniques de thermographie par méthodes optiques adaptées à l'étude de la thermodynamique de gouttelettes chargées générées par électrospray en cours d'évaporation. Cependant, les objets pour la thermographie décrits lors du **Chapitre 2** ne pourront être exploités ici. En effet, l'intensité de fluorescence seule n'est pas suffisante pour pouvoir accéder à une température dans l'étude des sources aérosols puisque la concentration apparente des sondes de température dans l'aérosol évolue (diffusion des gouttelettes constitutive de l'aérosol). De plus, l'utilisation des nanoparticules de latex n'est pas adaptée pour les sources électrospray (dégradation du capillaire d'injection de la source – voir description d'une source ESI).

Nous aborderons rapidement dans une première partie les mécanismes physiques mis en jeu lors de la formation d'un électrospray permettant la désolvatation d'édifices moléculaires ioniques. Cette physique est très riche, cependant il n'existe que très peu d'expériences faites *in situ*. C'est pourquoi, en seconde partie, nous détaillerons le montage expérimental utilisé nous permettant de mesurer la température et la taille des gouttelettes en cours d'évaporation formant la plume d'un électrospray, pour enfin donner une description complète de la thermodynamique de l'électrospray.

3.1 L'ionisation par électrospray



“Electrospray Wings for Molecular Elephants.” [4]

- John B. Fenn

Notre besoin d'étudier des molécules en environnement isolé pour comprendre leurs fonctions et leurs propriétés nous a conduit à vouloir générer ces molécules en phase gazeuse. En effet, la spectrométrie de masse qui est une technique particulièrement adaptée pour la chimie analytique permet de séparer, détecter et d'identifier des molécules d'intérêt (analytes) selon leur rapport masse sur charge afin de caractériser leur structure chimique. Cette séparation et cette caractérisation peuvent se faire facilement en phase gazeuse, d'où la nécessité de développer un outil pouvant générer des espèces ioniques désolvatées.

Le transfert d'ions de la solution vers la phase gazeuse est un procédé de désolvatation qui consomme de l'énergie. De nombreuses techniques, plus ou moins brutales, existent telles que l'ionisation par Bombardement d'Atomes Rapides (Fast Atom Bombardment – FAB) [5], par désorption plasma [6], désorption laser [7] ou plus anciennement par simple chauffage. Cependant, ces techniques impliquent des collisions très énergétiques complexes conduisant bien souvent à la détérioration partielle des analytes.

C'est en 1984 que John Fenn a introduit pour la première fois le procédé d'ionisation par ElectroSpray (ESI) [8] permettant une génération douce d'analytes de grande taille en phase gazeuse grâce à une source électrospray pour l'analyse par spectrométrie de masse. Cette contribution technologique a été récompensée par le prix Nobel de Chimie en 2002 et est, depuis lors, majoritairement utilisée en spectrométrie de masse (Figure 3.1). Cependant, les fondements thermodynamiques impliqués dans les sources d'ionisation par électrospray sont encore mal compris.

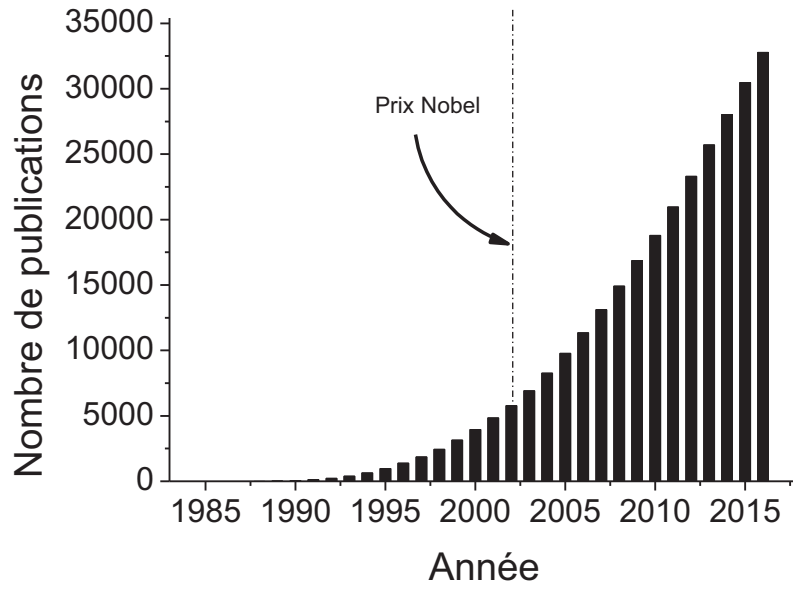


Figure 3.1: Nombre de publications scientifiques à comité de lecture comprenant les mots clefs "Electrospray Ionization" depuis 1985. Source : Web of Knowledge.

3.1.1 Principe d'Ionisation par ElectroSpray

Depuis plus d'un siècle, la formation de gouttelettes chargées est un procédé d'aérosol largement étudié. C'est en 1882 que Lord Rayleigh s'est intéressé pour la première fois aux instabilités résultant de l'évaporation de gouttelettes chargées [9]. Aujourd'hui, ce phénomène physique est exploité pour la génération d'ion en phase gazeuse. Quatre processus majeurs sont impliqués dans le processus d'ionisation par électrospray : (1) la production de gouttelettes chargées à partir d'une solution contenant les analytes, (2) la diminution en taille des gouttelettes chargées par évaporation rapide du solvant, (3) la fission asymétrique des gouttelettes chargées initiant (4) la formation de nano-gouttelettes précurseurs des ions générés en phase gazeuse (Figure 3.2.a).[3], [10]

1. Une différence de potentiel de quelques milliers de Volts est appliquée entre un tube capillaire d'où la solution est injectée et une électrode située à l'entrée du spectromètre de masse. Le champ électrique résultant est intense et induit un enrichissement d'espèce positive (ou négative suivant le mode d'ionisation) au niveau du ménisque formé en sortie de capillaire. Ce ménisque chargé est alors déformé en forme de cône dit de Taylor jusqu'à son point d'instabilité pour former un nuage de microgouttelettes hautement chargées.
2. La génération de ces gouttelettes chargées sous atmosphère est souvent assistée par un gaz dit nébulisant (qui peut être chauffé). Ce nuage de gouttelettes aussi appelé spray ou plume, peut également être accompagné par un jet de gaz de confinement chauffé facilitant le processus d'évaporation.
3. Lorsque la taille de la gouttelette chargée diminue par évaporation, la densité de charge surfacique de la gouttelette augmente jusqu'au point où les répulsions coulombiennes entre les charges égalent les forces cohésives de la tension de surface du liquide. C'est la limite de stabilité de Rayleigh. On définit cette limite par la charge maximale $q_{Rayleigh}$ qu'une gouttelette peut atteindre [9] :

$$q_{Rayleigh} = 8\pi(\gamma\epsilon_0 r^3)^{\frac{1}{2}} \quad (3.1)$$

Avec γ la tension superficielle du liquide, ϵ_0 la constante de permittivité du vide et r le rayon de la gouttelette. Une fois cette limite dépassée, la gouttelette se déforme et devient

instable. Il se produit alors une fission asymétrique de la gouttelette dite de Rayleigh : typiquement, la gouttelette mère perd 2% de sa masse et 15% de sa charge électrique en expulsant un jet de gouttes nanométriques chargées (Figure 3.2.b,c– Non disponible dans la version expurgée).[11]

4. Même si le monde scientifique s'accorde pour dire que ces expulsions de gouttelettes nanométriques sont les précurseurs des ions désolvatés, les mécanismes mis en jeu lors de ce processus final de passage en phase gazeuse des analytes sont encore discutés. Plusieurs modèles sont envisagés en fonction de la taille de l'analyte : un modèle d'évaporation ionique pour les petites tailles (l'analyte s'extrait de la gouttelette par évaporation), un modèle de résidu chargé pour les plus grosses tailles (l'évaporation du solvant se poursuit jusqu'à laisser l'analyte désolvaté) ou encore un modèle d'éjection en chaîne pour les biopolymères ou les polymères désordonnés. [12]

Figure 3.2: a) Schéma de principe de l'électrospray, b) représentation schématique de la durée de vie d'une gouttelette de charge Z et de rayon R (référence [3]) et c) photographie du phénomène d'injection de gouttelettes sub-micrométriques par fission de Rayleigh (référence [15]).

3.1.2 Propriétés de l'électrospray

Un aspect important qui régit la dynamique des paramètres physico-chimiques de l'électrospray est la diminution en taille des gouttelettes. L'évaporation rapide du solvant et les fissions de Rayleigh successives conduisent à une réduction significative de la taille de la gouttelette en quelques millisecondes jusqu'à la génération d'ion en phase gazeuse. Tang et Gomez [13], [14], [15] ainsi que Vertes *et al.* [16], [17], ont été les premiers groupes de recherche à étudier expérimentalement la dynamique des gouttelettes générées par électrospray. Ces études ont majoritairement été réalisées par shadowgraphie rapide et par vélocimétrie laser (*Phase Doppler Anenometry*), deux diagnostics optiques différents largement utilisés dans l'étude d'aérosols. Ils ont ainsi pu sonder pour la première fois les différents modes de spray, l'éjection de gouttelettes sub-micrométriques par fission de Rayleigh ou l'influence de la nature du liquide (tension superficielle, densité, conductivité, ...) sur la distribution en taille, en charge et en vitesse des micro-gouttelettes chargées.

Les changements des propriétés physico-chimiques de la plume du spray induits par une diminution en taille sont nombreux. Par exemple, les travaux pionniers de Zhou et Cook [18], [19], [20] ont permis de sonder des changements de composition du solvant ou du pH le long d'une plume électrospray par l'injection de chromophores solvatochromiques et pH-chromiques dans la source électrospray. De la même façon, Wang et Zenobi [21] ont également pu sonder les changements de polarité du solvant par des mesure de Fluorescence Induite par Laser.

En particulier, les processus induisant une réduction en taille de la gouttelette sont des processus endothermiques (coutant de l'énergie). Cette énergie est donc puisée dans l'énergie thermique de la gouttelette. Il en résulte une diminution de la température de la gouttelette. Kebarle [22] estime alors que la diminution en température d'une gouttelette générée par électrospray en cours d'évaporation pourrait être d'une dizaine de degré. Plus récemment, l'évolution de la température au sein d'une plume électrospray « modèle » a pu être mesurée par l'équipe de Cook [23] en utilisant une technique de thermométrie de fluorescence ratiométrique. Dans des conditions typiques, il est reporté que la température des gouttelettes de Méthanol générées par électrospray diminue d'environ 30°C dans les premiers 5.0 mm, suivi d'un léger réchauffement (2 à 3°C).

Ces changements de la température le long de la plume du spray, qui vont se produire sur une échelle de temps de quelques millisecondes, peuvent avoir une grande importance et des conséquences drastiques sur l'équilibre thermodynamique des espèces analysées[24], sur la cinétique des réactions [25] ou sur la conformation des protéines étudiées par spectrométrie de masse [26],[27].

3.2 Dispositif expérimental

Depuis les premiers travaux de John Fenn dans les années 80 [28], [29], les sources d'ionisation par électrospray ont continué d'évoluer de par leur taille, leur géométrie ou les matériaux utilisés [30]. Ces modifications ont été faites pour optimiser le taux de désolvation des analytes. Par exemple, les sources à haut débit d'injection ($>5-10 \mu\text{L}/\text{min}$) ont été équipées d'un gaz de confinement chauffé à très haute température pour faciliter l'évaporation du solvant.

Basé sur l'état de l'art actuel développé au sein de notre laboratoire pour l'étude des sprays [31],[32],[33], nous avons travaillé sur une instrumentation optique pour la mesure *in-situ* de la température et de la taille de gouttelettes chargées en cours d'évaporation afin de définir un profil de la source ESI. Le dispositif expérimental pour décrire le profil de la plume de l'électrospray est illustré en **Figure 3.3**. Une source Agilent Jet Stream, légèrement modifiée pour permettre les injections laser *in situ*, a été couplé avec trois systèmes de détection optique différents montés sur une platine de translation afin de pouvoir scanner la plume de l'électrospray, et ainsi réaliser de l'imagerie par méthodes optiques. Deux systèmes de détection permettent de mesurer des signaux de fluorescence statique et résolue en temps par l'injection de composés thermosensibles dans la plume du spray. Enfin, un dernier système de détection permet de collecter et d'enregistrer la lumière diffusée par la plume du spray en fonction de l'angle de diffusion pour une mesure de taille des gouttelettes. Les différentes méthodes expérimentales attachées à chaque partie du dispositif sont décrites dans les paragraphes suivants.

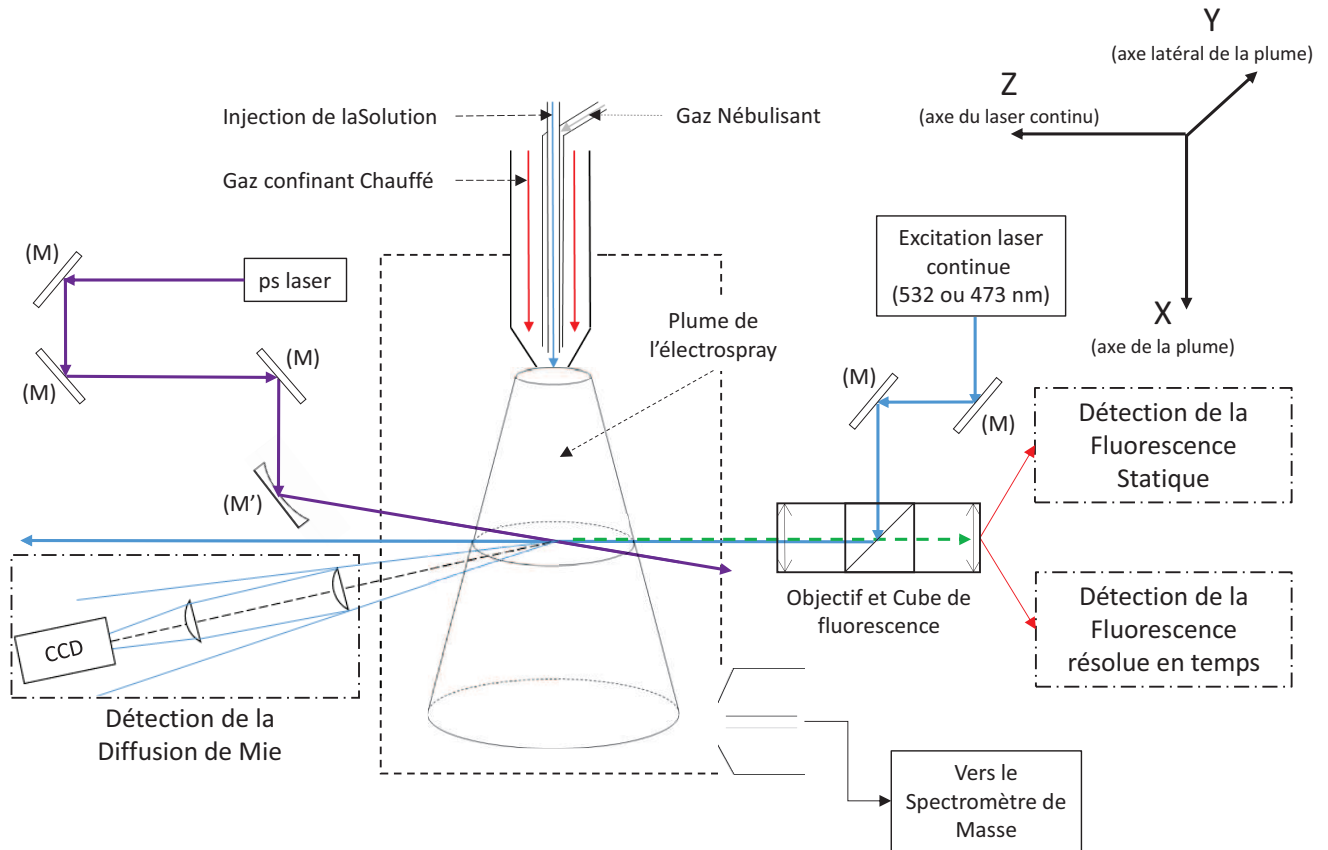


Figure 3.3: Montage expérimental utilisé pour sonder la température et la taille des gouttelettes chargées générées par une source Agilent Jet Stream que j'ai développé durant ma thèse. Dans une étude précédente, ce montage a été utilisé pour caractériser les évolutions de pH et de composition de la plume de l'électrospray [31],[32],[33], une caractérisation complète du système a été effectuée. La résolution spatiale du système de détection est de $200 \mu\text{m}$ selon les axes X et Y et de 1 mm selon l'axe Z, la limite de détection est estimée à 10^{-12} M pour la Rhodamine 6G soit à environ 6000 molécules de Rhodamine 6G dans le volume de détection. La gamme dynamique de détection est de 10^4 .

3.2.1 Source ESI

Le spectromètre de masse utilisé est un spectromètre de masse commercial à quadripôle simple Single Quad 6100 équipé d'une source *Agilent Jet Stream Thermal Gradient Focusing Technology* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.) fournie par Agilent US lors du partenariat *Agilent's Application and Core Technology University Research Program* (Grant ID 2243) Cette source a été modifiée afin de permettre l'injection d'un faisceau laser directement dans l'enceinte où la plume de l'électrospray est formée. La source électrospray est décrite en Figure 3.4 et en Figure 3.5.

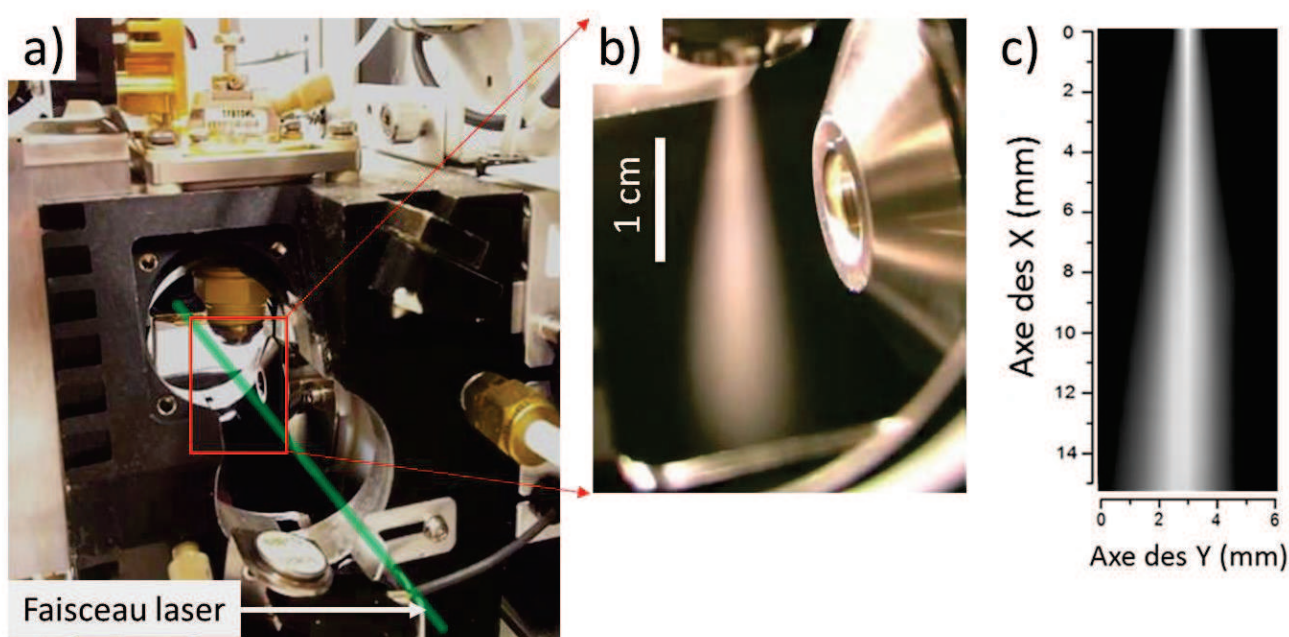


Figure 3.4: Photographie de la source électrospray modifiée autorisant l'injection d'un faisceau laser in situ. Profil spatial de la plume. b) Plume de électrospray. La plume est visible grâce à la diffusion de la lumière présente lors de la photographie c) Profil spatial de la source déterminé en injectant une solution de Rhodamine 110 à 20 μM dans le Méthanol dans la source électrospray et en traçant l'intensité du signal de fluorescence collecté en fonction de la position dans la plume du spray. L'entrée du spectromètre de masse est située à $X=15$ mm et $Y\approx 8$ mm.

Une différence de potentiel est appliquée entre l'embout de la source (*Nozzle Voltage* : C_n) et le capillaire d'entrée du spectromètre de masse (*Capillary Voltage* : C_v). Le mode de polarisation en commutation permet une acquisition positive et négative quasi-simultanée (commutation rapide entre le mode positif et le mode négatif). Sauf si mentionné autrement, les paramètres de voltage sont fixés à $C_n^+ = 500\text{ V}$, $C_n^- = 500\text{ V}$, $C_v^+ = 2000\text{ V}$ and $C_v^- = 3000\text{ V}$. Du diazote a été utilisé comme gaz nébulisant, gaz confinant chauffé et gaz séchant chauffé. Le gaz nébulisant permet de faciliter la dispersion de la solution en gouttelettes et sa pression (*NGP*) peut être ajustée dans une plage de fonctionnement allant de 10 psi à 50 psi (Pound-force per Square Inch, avec 1 psi = 6894,76 Pa). Le gaz confinant chauffé permet une collimation de la plume du spray. La température et le débit de gaz sont contrôlables et peuvent influencer l'efficacité d'ionisation de la source ESI. Pour assurer un fonctionnement optimal de la source, la température du gaz confinant (*SGT*) peut être fixée entre 80 et 350°C pour un débit (*SGF*) allant de 3 à 11 L.min⁻¹. Enfin, le gaz séchant chauffé est un gaz permettant une désolvatation optimale des analytes dans le capillaire d'entrée du spectromètre, sa température est fixée à 250°C et son débit à 7 L.min⁻¹. La solution est injectée dans la source à l'aide d'une seringue dont le débit est contrôlé par une pompe KDS100 (KD Scientific, Holliston, MA, U.S.A.).

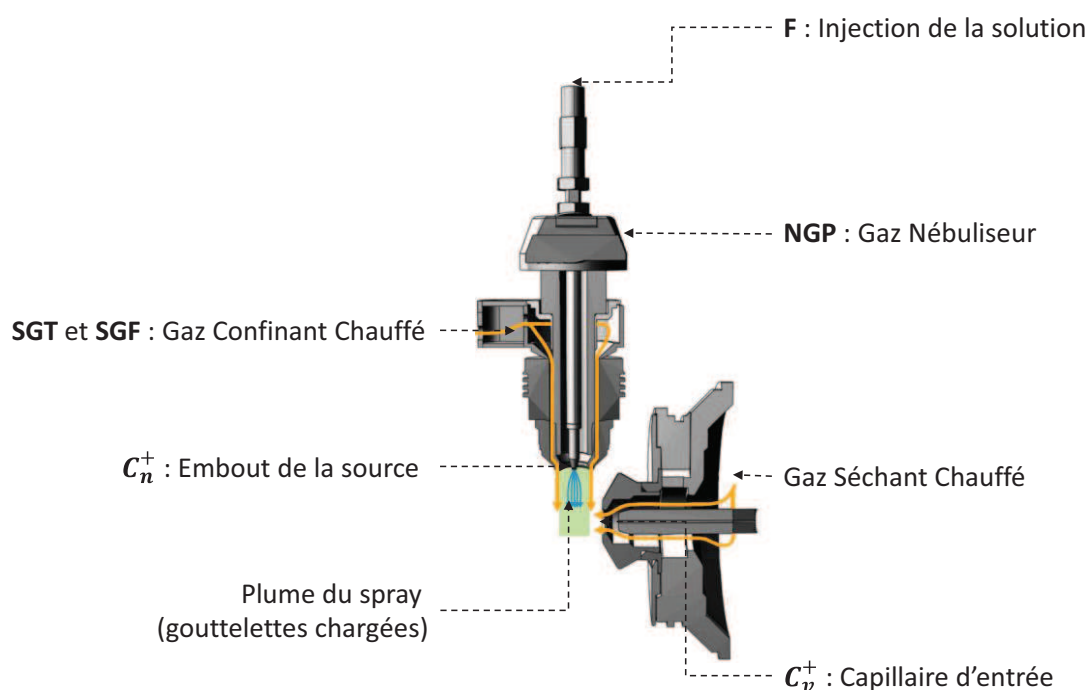


Figure 3.5: Source électrospray Agilent Jet Stream (AJS) Thermal Gradient Focusing Technology (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.).

Les paramètres d'ionisation de la source sont nombreux et peuvent être optimisés pour améliorer la qualité du signal du spectre de masse. Lors de cette étude, l'influence de certains de ces paramètres sur la thermodynamique du spray et sur l'efficacité d'ionisation de la source sera explorée.

3.2.2 Dispositif pour la mesure de la taille des gouttelettes

Théorie de Mie

La théorie de Mie décrit l'interaction de la lumière avec une particule sphérique.[34] C'est une solution particulière des équations de Maxwell pour la diffusion élastique d'une onde électromagnétique plane par une sphère définie par son rayon et son indice de réfraction. Ces solutions nous offrent une description analytique complète de la lumière diffusée sous forme de séries infinies faisant intervenir les polynômes de Legendre et les fonctions de Bessel en coordonnées sphériques. Les détails de ces solutions sont aujourd'hui bien connus et n'ont pas été traités lors de ce travail de thèse.

Cependant, connaissant les solutions de la théorie de Mie, nous pouvons simuler l'intensité de l'onde électromagnétique diffusée selon son angle de diffusion connaissant tous les autres paramètres du système (longueur d'onde de l'onde incidente, dimension de la sphère, indice de réfraction des différents milieux,...). Depuis la figure d'interférence produite par la diffusion d'une onde plane par une sphère dont nous connaissons la composition, nous sommes capables de déterminer la dimension de cette sphère.

Instrumentation

Le laser continu à 532 nm est injecté dans l'objectif par deux miroirs plan en aluminium protégés ($R > 90\%$). Suivant le type d'acquisition, le laser à 473 nm a également pu être utilisé pour l'excitation. Un système de deux lentilles cylindriques a été utilisé pour diriger la lumière diffusée sur une camera CCD guppy F-080B/C FireWire(Allied Vision Technologies, Stadroda, Germany). La première lentille ($f = 100$ mm) collecte la lumière diffusée selon un angle solide

allant de $\theta_{min} = 6.7^\circ$ à $\theta_{max} = 24.5^\circ$ par rapport à l'axe du laser alors que la second lentille ($f = 150$ mm) a été utilisé pour focaliser la lumière sur la camera CCD.

Ce système de détection par diffusion de Mie a été validé par des mesures de taille de gouttelettes d'eau calibrées et générées par un générateur de microgouttelettes piézoélectrique (MD-K-130, MicroDrop Technologies) avec une grande reproductibilité. Le temps d'exposition de la caméra est fixé à 80 ms (le paramètre d'obturation étant fixé 4000 et la base de temps de la caméra est de 20 μ s). Les images de trois figures d'interférence enregistrées de gouttelettes générées par le générateur de gouttelettes sont données en [Figure 3.6](#).

La projection de l'intensité du signal diffusé en fonction de l'angle de collection offre une comparaison directe avec la théorie de Mie. En considérant que la gouttelette est une sphère d'eau (indice de réfraction $n = 1.3325$) générée dans l'air (indice de réfraction $n \approx 1$), nous pouvons déterminer la taille de la gouttelette avec précision. En effet, la figure d'interférence du signal diffusé est particulièrement sensible à la taille de la sphère diffusante. Les calculs théoriques ont été réalisés à partir d'un logiciel développé au sein de l'Institut Lumière Matière. Le code de simulations (écrit en visual C++) a été largement inspiré du code proposé par C. F. Bohren and D. R. Huffman [34].

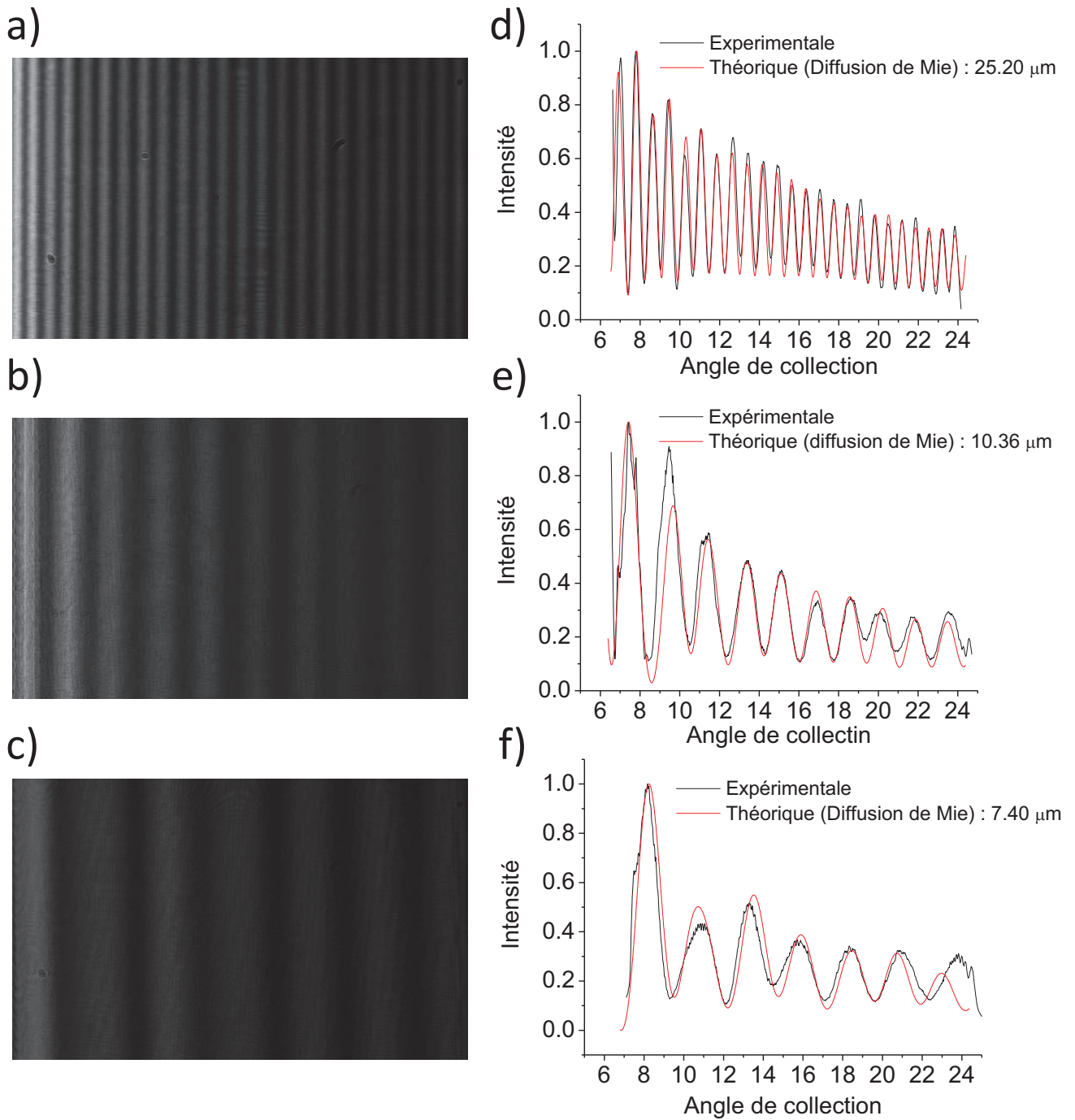


Figure 3.6: a,b,c) Figures d'interférence du laser à 532 nm diffusée par des gouttelettes d'eau générées par un générateur de gouttelette. d,e,f) (noir) Projection de l'intensité du signal diffusée en fonction de l'angle de collection. (rouge) calcul de l'intensité du signal diffusée en fonction de l'angle de collection pour une taille donnée d'après la théorie de Mie.

3.2.3 Dispositif pour la thermométrie des gouttelettes

Nous avons exploré durant ce travail de thèse la mesure de température des gouttelettes par deux méthodes optiques différentes : par thermométrie statique et par thermométrie résolue en temps. La comparaison entre ces deux techniques en termes de sensibilité et précision a été réalisée.

Thermométrie statique

Dans la configuration statique, une thermométrie par mesure ratiométrique « deux couleurs » a été menée. La Rhodamine B a de nouveau été utilisée comme chromophore thermosensible. Un de ses dérivés, la Rhodamine 110 a été utilisé comme chromophore de référence. Les propriétés spectrales de la Rhodamine 110 sont très proches de ceux de la Rhodamine B, cependant son émission est quasi-indépendante de la température [35]. En effet, l'absence des deux groupes diéthylamines sur l'anneau xanthène (Figure 3.7) affecte drastiquement la dépendance en température de ce chromophore.

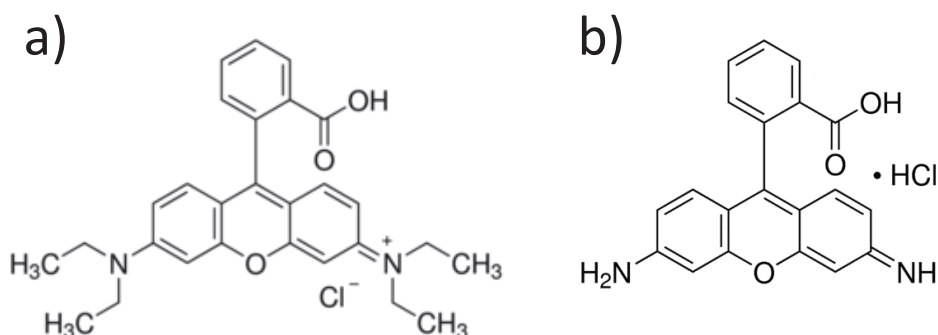


Figure 3.7: Structure Moléculaire de a) la Rhodamine B ($\lambda_{abs}^{RhB} = 547 \text{ nm}$ et $\lambda_{emis}^{RhB} = 567 \text{ nm}$) et de b) la Rhodamine 110 ($\lambda_{abs}^{Rh110} = 495 \text{ nm}$ et $\lambda_{emis}^{Rh110} = 523 \text{ nm}$).

En solution, les signaux de fluorescence de Rhodamine 110 à 0.2 μM et de Rhodamine B à 2 μM dans le Méthanol à 473 nm ont été enregistrés en fonction de la température à l'aide de la cellule régulée en température (Figure 3.8.a). La courbe de calibration obtenue donnant le rapport d'intensité des deux chromophores en fonction de la température est donnée en Figure 3.8.b.

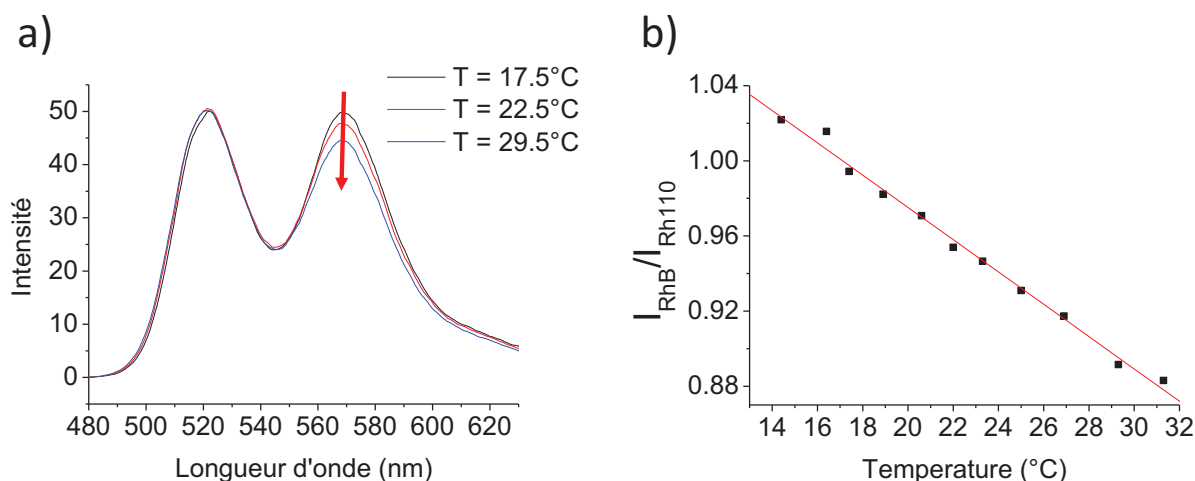


Figure 3.8: a) Spectres de fluorescence d'un mélange de Rhodamine 110 à $0.2 \mu\text{M}$ et de Rhodamine B à $2 \mu\text{M}$ dans le Méthanol à différentes températures excités à 473 nm . b) Courbe de calibration donnant le ratio I_{RhB}/I_{Rh110} en fonction de la température ($I_{RhB} = 567 \text{ nm}$ et $I_{Rh110} = 523 \text{ nm}$).

Dans le spray, le faisceau laser continu à 532 nm est injecté dans l'objectif par deux miroirs plan en aluminium protégés ($R > 90\%$). Le faisceau laser est alors focalisé dans le spray et le signal de fluorescence de la solution injectée dans la source électrospray est collecté en configuration d'épi-fluorescence. Le temps d'exposition du spectrophotomètre est fixé à 10 s pour chaque point d'acquisition d'un profil.

Thermométrie résolue en temps

La durée de vie de la Rhodamine B dans le Méthanol est d'environ 2.5 ns à température ambiante. Une thermométrie résolue en temps nécessiterait une méthode de détection sensible à la picoseconde pour permettre une bonne calibration de la durée de vie de la Rhodamine B en fonction de la température. Ne disposant pas de tels instruments de détection, une autre stratégie a été entreprise. Un complexe de Ruthénium, le Tris(2,2'-bipyridyl)-dichlororuthénium(II) : $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, est connu pour être un composé phosphorescent dont l'émission dépend fortement de la température [36], [37], [38] et sa durée de vie est compatible avec les instruments de mesure disponibles au laboratoire. La structure moléculaire, les spectres d'absorption et d'émission et le spectre de masse du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ sont donnés en Figure 3.9.

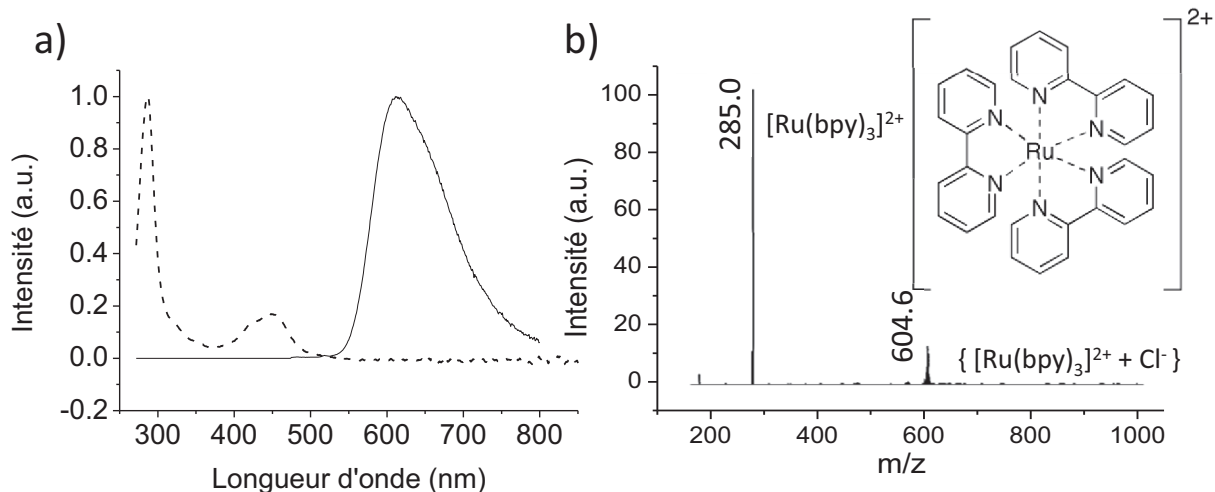


Figure 3.10: a) Spectre d'absorption et d'émission du complexe de Ruthénium. b) Spectre de masse du complexe de Ruthénium en mode positif. En insert, la structure moléculaire du complexe de Ruthénium.

En solution, les signaux de décroissance de fluorescence d'une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ dans le Méthanol à 0.1mM ont été enregistrés en fonction de la température pour une excitation à 450 nm (Figure 3.10.a). La courbe de calibration obtenue donnant la durée de vie du chromophore en fonction de la température est donnée en Figure 3.10.b. Les durées de vie de fluorescence ont été obtenues par régression non linéaire basée sur un modèle de décroissance exponentielle simple.

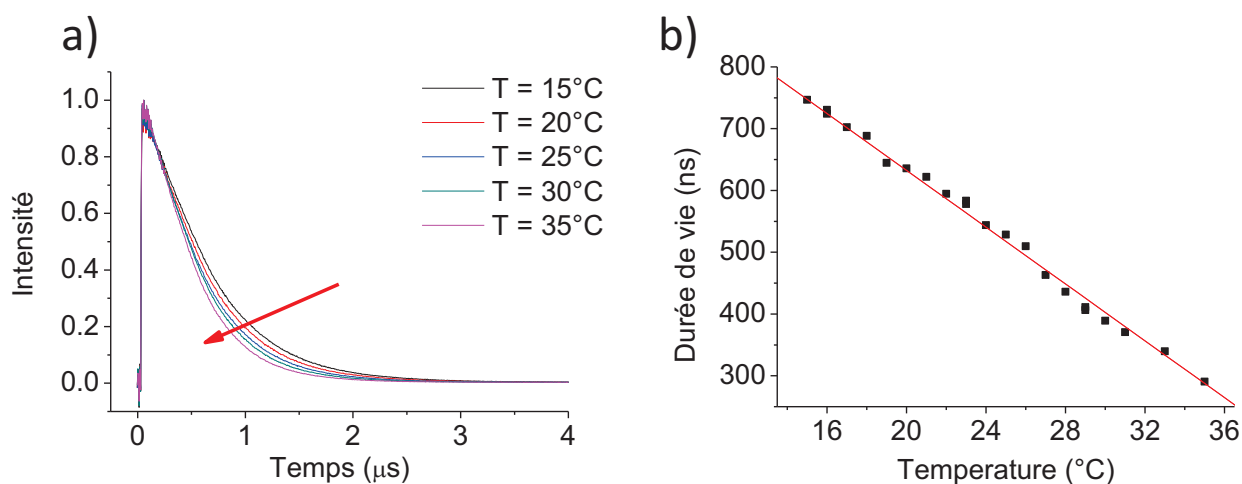


Figure 3.9: Signaux de décroissance de fluorescence d'une solution de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ dans le Méthanol à différentes températures excité à 450 nm. b) Courbe de calibration donnant la durée de vie en fonction de la température : les durées de vie de fluorescence ont été obtenues par régression non linéaire basé sur un modèle de décroissance exponentielle simple.

Dans le spray, le faisceau laser excitateur à 450 nm pulsé à 1 kHz, de puissance moyenne 68 mW est guidé le long de la platine de translation via trois miroirs (M) plan en aluminium protégés ($R > 90\%$) et focalisé dans la plume du spray par un miroir concave (M') en aluminium protégé ($f = 100$ mm) de tel sorte que le point focal du laser pulsé coïncide avec celui du laser continu (utilisé pour les mesures de taille) et donc avec celui de l'objectif de collection. La décroissance du signal de fluorescence de la solution injectée dans la source électrospray est collectée par l'objectif. Pour l'acquisition d'une courbe de décroissance de fluorescence, 400 balayages ont été moyennés.

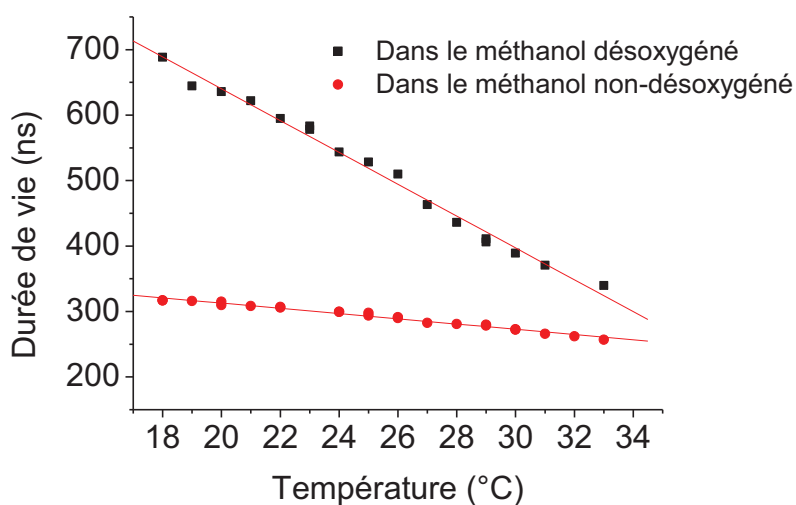


Figure 3.11: Comparaison de la durée de vie du complexe de Ruthénium en fonction de la température en présence ou non de Dioxygène dans la solution.

Il est important de noter que le complexe de Ruthénium est un composé dont l'émission de fluorescence dépend fortement de la concentration en Dioxygène (O_2) présent en solution [39], [40]. C'est pourquoi, avant chaque utilisation, un protocole de désoxygénation minutieux de la solution de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ a été mis en place. Chaque solution de complexe de Ruthénium a été dégazée durant 20 à 30 min par un bain à ultrason (Fisher Scientific) avant de faire buller du diazote dans la solution pendant 5 à 10 min. Après deux cycles de dégazage, la solution est ensuite injectée dans la cellule étanche régulée en température sous atmosphère inerte. Si ce protocole n'est pas réalisé, le Dioxygène dissout en solution vient désexciter le complexe de Ruthénium. La valeur de la durée de vie du chromophore en solution est alors grandement modifiée (Figure 3.11). Lors du passage dans le spray, l'utilisation de Diazote comme gaz nébulisant et gaz confinant chauffé vient

« naturellement » désoxygéner les gouttelettes dans les premiers instants de la formation du spray, limitant les artefacts de mesure. Il est donc nécessaire de déterminer des courbes de calibration en solution désoxygénée afin de ne pas grandement sous-estimer la température mesurée au sein de la plume du spray.

3.2.4 Profil du spray et acquisition

Les systèmes de détection et d'injection laser sont montés sur une platine de translation XYZ actionnée par des moteurs pas-à-pas (LMS 80 OWIS) permettant l'acquisition du profil du spray. L'analyse des données collectées se fait point par point et l'image est ensuite reconstituée. La dimension des profils XY 2D collectées est de 15 mm par 6 mm par pas de 0.5 mm dans chaque direction. Le plan XY est défini par le plan dans lequel l'intensité de fluorescence collectée est maximale (selon l'axe Z) ; il correspond au plan normal à l'axe du laser continu d'excitation passant par le sommet du cône définissant la plume de l'électrospray. Afin de vérifier la stabilité du spray durant toute l'acquisition du profil, le signal du spectre de masse est enregistré en continu (Figure 3.12), on assume alors que si l'efficacité d'ionisation (nombre d'ions détectés par unité de temps) est stable, le spray l'est également. L'acquisition des données de fluorescence statique, résolue en temps et d'image de diffusion de Mie est faite par un logiciel développé au sein de l'Institut Lumière Matière écrit en langage VISUALC++.

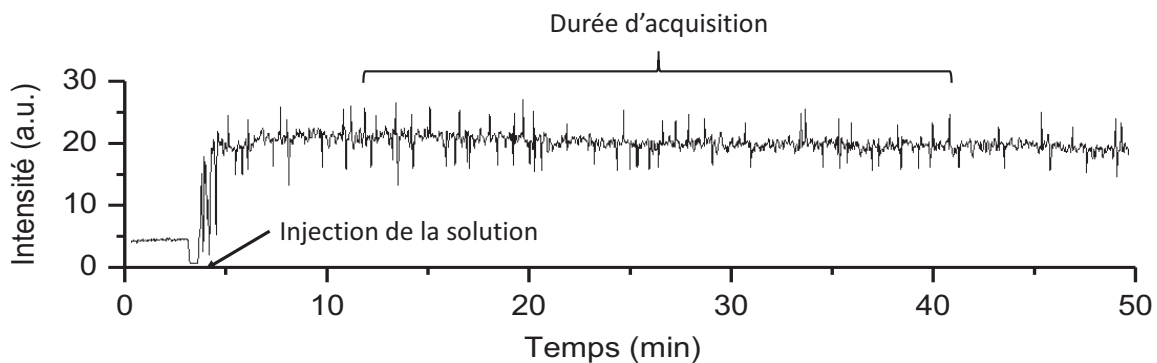


Figure 3.12: a) Efficacité d'ionisation en fonction du temps en mode positif. L'injection de la solution de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ à 0.1 mM est à $t \sim 5$ min. Sur tout le temps d'acquisition, on constate que l'efficacité d'ionisation est constante, on suppose donc que le spray est stable.

3.3 Corrélation entre la taille et la température de microgouttelette en cours d'évaporation [41]

Compte tenu du grand nombre de paramètres pouvant influencer la génération et la thermodynamique de l'électrospray, une configuration de la source électrospray, dite « standard », est alors définie. Cette configuration ne correspond pas nécessairement aux paramètres pour lesquels l'efficacité d'ionisation de la source est maximale, mais elle correspond à la configuration médiane des paramètres d'ionisation dans un régime de fonctionnement où la stabilité du spray est conservée. La majorité des paramètres d'ionisation sera alors fixée et l'influence de certains paramètres clés pourra être clairement caractérisée.

Ainsi, nous ne travaillerons qu'en mode de polarisation en commutation avec des paramètres de voltage fixés à $C_n^+ = 500 V$, $C_n^- = 500 V$, $C_v^+ = 2000 V$ and $C_v^- = 3000 V$. La température du gaz séchant chauffé est définie à 250°C et son débit à 7 L/Min. Enfin, sauf si mentionné différemment, le débit d'injection (F) de la solution est de 3 mL/h, la pression du gaz nébulisant (NGP) est fixée à 25 psi et la température du gaz confinant (SGT) à 150°C pour un débit (SGF) de 7 L/Min (Figure 3.5).

3.3.1 Résultats

Mesure de la taille des gouttelettes dans le spray

Au sein de l'électrospray, un nuage de gouttelettes chargées est généré. Afin de pouvoir utiliser directement la théorie de Mie, nous assimilerons ces gouttelettes à des sphères de solvant de Méthanol pur (indice de réfraction $n = 1,3395$) dont les charges surfaciques n'influenceraient pas les solutions des équations de Maxwell pour la diffusion de la lumière par une sphère.

Le gaz chauffé confinant permet de collimater la plume du spray. Cette collimation implique une densité de gouttelettes très grande au cœur de la plume, si bien qu'une mesure des franges d'interférence du signal diffusé par les gouttelettes générées au cœur de l'électrospray s'avère difficile. Néanmoins, la densité des gouttelettes situées sur le bord de la plume définie par l'extension spatiale du spray est moindre si bien que cette mesure est possible. L'angle solide de collection est réduit à cause de la présence du bloc de la source. Dans ces conditions expérimentales, on a alors $\theta_{min} = 6.7^\circ$ à $\theta_{max} = 17.7^\circ$. Quelques exemples de franges d'interférences par diffusion du laser par le spray à différentes positions du spray sont donnés en [Figure 3.13](#).

Afin de suivre l'évolution de taille des gouttelettes le long du spray, un grand nombre d'images sont enregistrées à différentes positions du bord de la plume afin d'avoir une mesure statistique. Ce nuage de valeurs est donné en [Figure 3.14](#). Les barres d'erreur correspondent à une déviation standard statistique. En moyenne, la mesure de taille de gouttelette à une position donnée est d'environ $\pm 0.5 \mu m$. Cette incertitude sur la mesure n'est pas due à l'imprécision du modèle théorique de la diffusion de Mie (qui est extrêmement sensible à la taille de la gouttelette), mais à la grande polydispersité en taille des gouttelettes générées par électrospray.

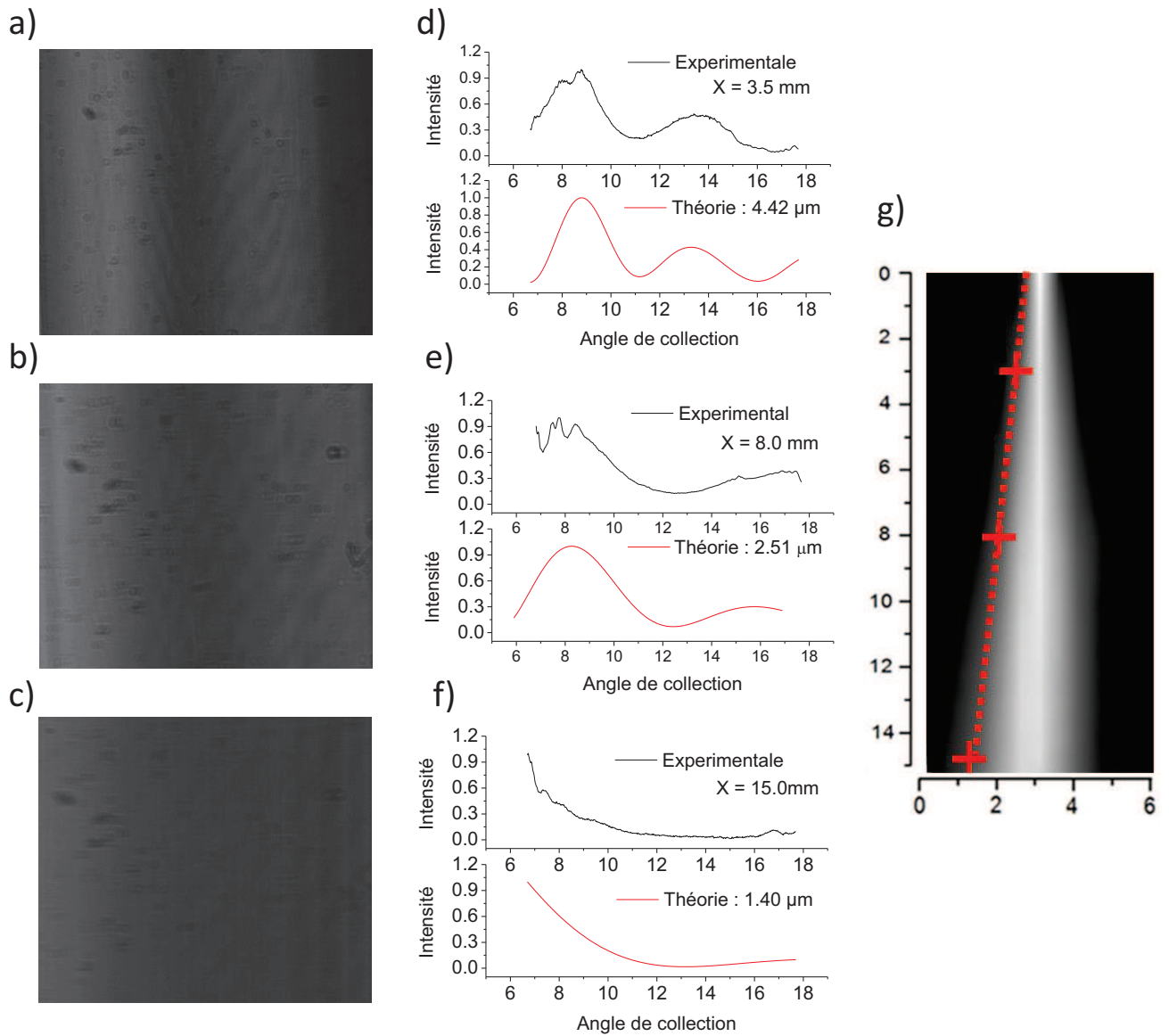


Figure 3.13: a,b,c) Figures d'interférence du laser à 532 nm diffusée par des gouttelettes de Méthanol générées par électrospray. d,e,f) (noir) Projection de l'intensité du signal diffusée en fonction de l'angle de collection et (rouge) calcul de l'intensité du signal diffusée en fonction de l'angle de collection pour une taille donnée d'après la théorie de Mie et g) profil spatial de la plume du spray avec la position des points de mesure et la définition du bord de la plume

En haut de la plume, le rayon des gouttelettes générées par électrospray est d'environ $4.2 \mu\text{m}$. La taille de ces gouttelette diminue très rapidement pour atteindre $2.0 \mu\text{m}$ en bas de la plume traduisant une évaporation du solvant composant la gouttelette très efficace.

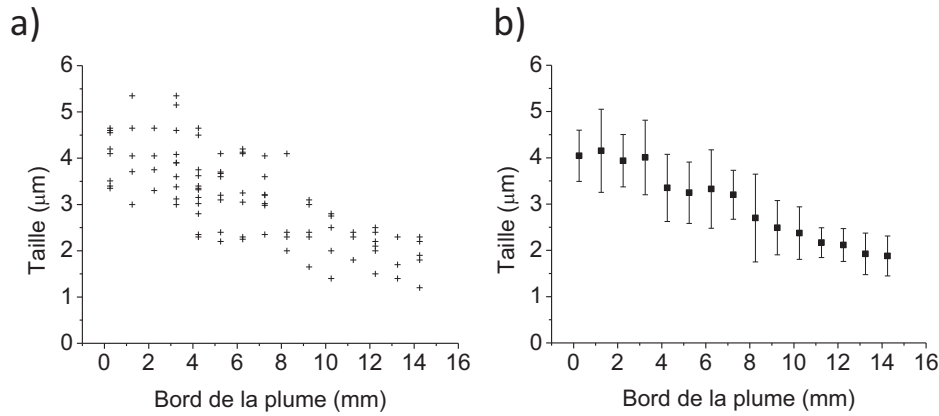


Figure 3.14: a) Collection de taille des gouttelettes de Méthanol le long du bord de la plume de l'électrospray en configuration standard et b) Tailles de gouttelettes mesurées.

Mesure et Comparaison thermométrie statique / résolue en temps

Dans les conditions d'ionisation définies précédemment, des mesures de température par fluorescence statique (proposée par Cook *et al.* [23]) et résolue en temps ont été menées afin de pouvoir comparer et valider ces deux méthodes. Pour la thermométrie statique, les spectres de fluorescence d'une solution de Rhodamine 110 à $0.2 \mu\text{M}$ et de Rhodamine B à $2 \mu\text{M}$ dans le Méthanol infusée par électrospray sont collectés à différent point du spray et donnés en [Figure 3.15](#). Le temps d'exposition pour chaque point de mesure est fixé à 10 s. L'acquisition comprenant 403 points, et le temps d'acquisition total pour un profil est donc d'environ 4030 s. La température des gouttelettes du spray est déterminée par ratiométrie des intensités des maximum de fluorescence de la bande d'émission de la Rhodamine 110 et de la bande de la Rhodamine en utilisant la courbe de calibration donnée en [Figure 3.8](#).

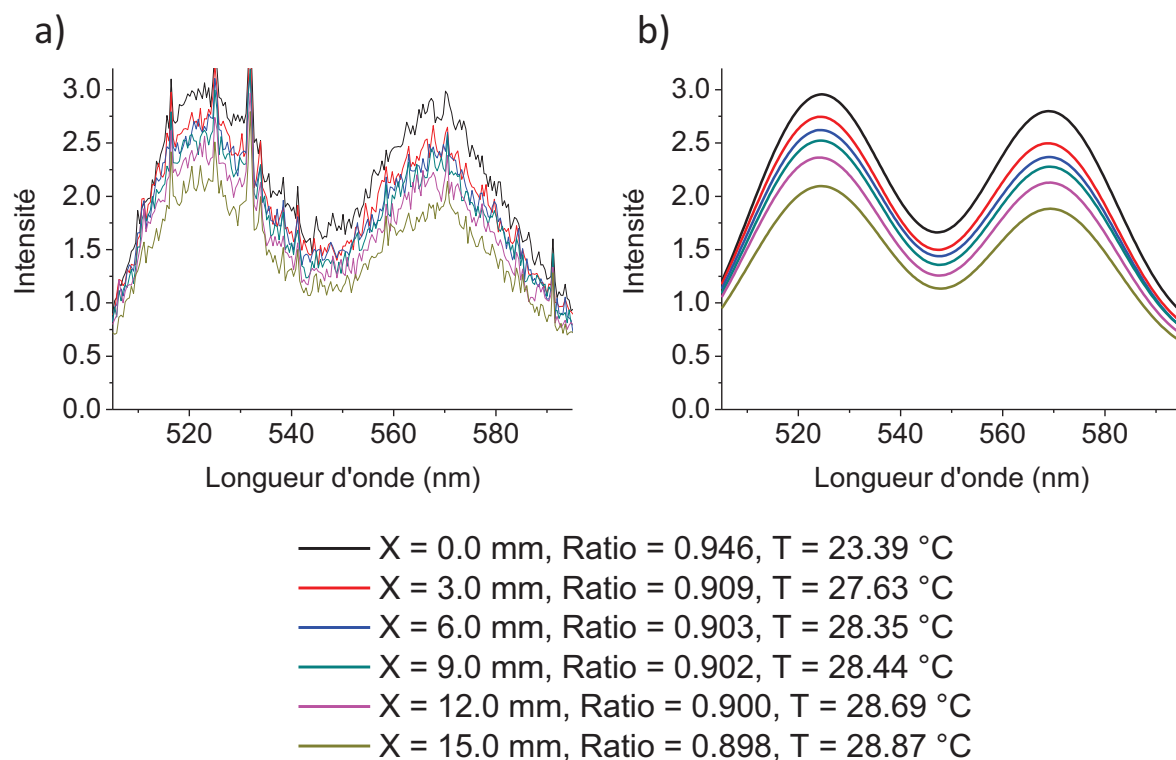


Figure 15: a) Exemples de spectres de fluorescence bruts et b) après traitement d'un mélange de Rhodamine 110 à $0.2 \mu M$ et de Rhodamine B à $2 \mu M$ dans le Méthanol injecté dans la source électrospray pour plusieurs positions dans la plume de spray. La valeur du ratio I_{RhB}/I_{Rh110} en fonction de la position est donné ($I_{RhB} = 567 \text{ nm}$ et $I_{Rh110} = 523 \text{ nm}$) avec la température correspondante.

Pour la thermométrie résolue en temps, les décroissances du signal de fluorescence d'une solution de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ à 0.1 mM dans le Méthanol injectée dans la source électrospray sont collectées à différentes positions de la plume (Figure 3.16). La température des gouttelettes est alors déterminée en utilisant la courbe de calibration en Figure 3.10. Pour chaque courbe de décroissance, une moyenne sur 400 balayages est effectuée (temps d'acquisition $\sim 5 \text{ s}$), l'acquisition comprenant 403 points, et le temps d'acquisition total pour un profil est donc d'environ 2015 s. Le premier avantage de la technique résolue en temps est sa plus grande rapidité de mesure (un facteur 2 par rapport à la technique statique) pour un obtenir un profil de plume de spray.

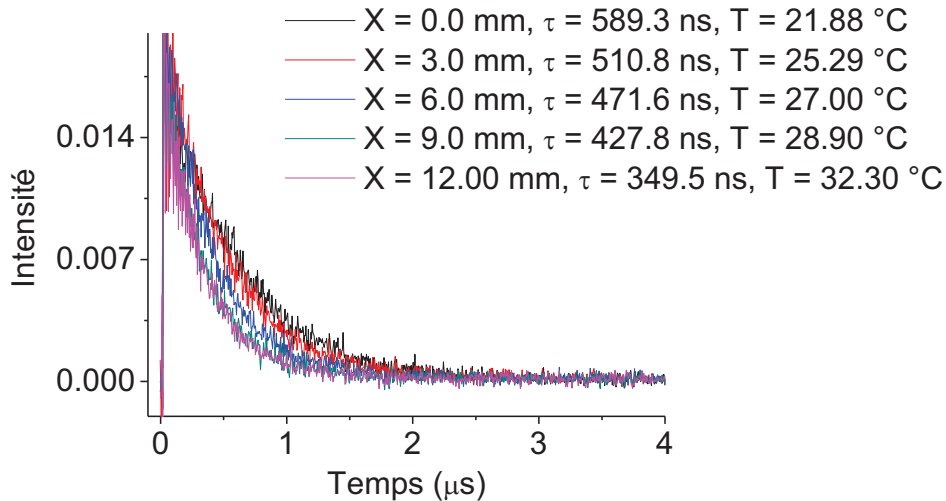


Figure 3.16: Exemple de décroissances du signal de fluorescence brut d'une solution de complexe de Ruthénium à 0.1 mM dans le Méthanol injectée dans la source électrospray pour plusieurs positions dans la plume de spray. Les valeurs de la durée de vie mesurées ainsi que les températures correspondantes sont indiquées.

Les résultats donnés en Figure 3.17 montrent clairement que les deux méthodes donnent des profils similaires, ce qui exclut tout artéfact de mesure potentiel pouvant engendrer des erreurs d'analyse majeures. La projection des températures selon l'axe de la plume du spray sont également très similaires. Les barres d'erreur sont définies comme étant la déviation standard de quatre répliques successifs. La précision de mesure (au vu des barres d'erreur) de la méthode résolue en temps est estimée à $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ (et est globalement constante sur toute la plume) alors que pour la méthode statique, l'erreur de mesure est estimée à $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ au début de la plume du spray et augmente graduellement le long du spray jusqu'à atteindre à $\pm 1.2^{\circ}\text{C}$ en bas de la plume. La perte de précision de la méthode statique le long de la plume est attribuée à la chute du rapport signal sur bruit du spectre d'émission dûe à une diminution de la concentration en chromophore dans le volume collecté. Cette variation de la concentration n'affecte la mesure de la température par fluorescence résolue en temps que de façon modérée. De plus, d'après les pentes des courbes de calibration de ces deux techniques, la sensibilité de la mesure par méthode résolue en temps est de $-3.71\%^{\circ}\text{C}^{-1}$ contre $-0.88\%^{\circ}\text{C}^{-1}$ pour la thermométrie statique. A la fois le gain en temps de mesure, le gain en sensibilité et en précision tendent à considérer la thermométrie résolue en temps comme mieux appropriée pour l'étude thermodynamique de l'électrospray.

Dans ces conditions d'ionisation par électrospray, on estime alors que la température des gouttelettes chargées varie de 21 à 34°C. Le profil en température montre une élévation globale de la température le long de la plume du spray. De plus la présence d'un gradient de température latéral (selon l'axe X) montre que la température des gouttelettes situées au cœur de la plume est plus faible que celle situées au bord de la plume. On peut également constater un net refroidissement pour les grandes valeurs de X et de Y (en bas à droite de la plume).

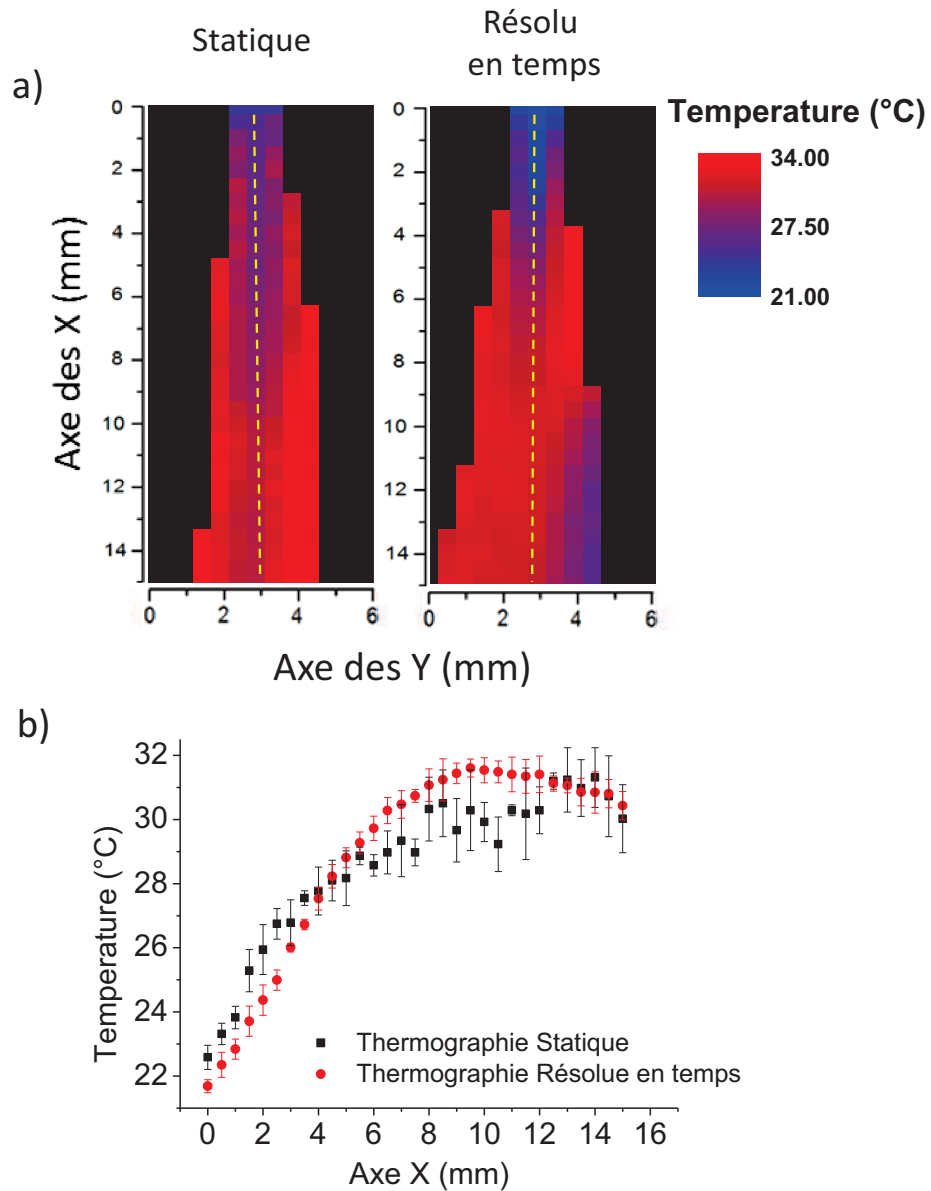


Figure 3.17: a) Comparaison des profils XY en température de la plume du spray entre une mesure de fluorescence statique et résolue en temps en configuration standard. b) Projection des températures selon l'axe X (pointillé jaune).

Deux phénomènes semblent être en compétition : (1) l'évaporation du solvant, processus endothermique, induisant une diminution de la température des gouttelettes et (2) un transfert par conductivité thermique entre le gaz environnant et le solvant qui a tendance à augmenter la température des gouttelettes. L'augmentation globale de la température indique que le transfert thermique par conduction semble être prédominant (une étude de transfert de chaleur sera détaillée plus loin afin de modéliser la thermodynamique de ce système).

Comme attendu, la température au bord de la plume du spray est plus grande puisque ce sont les gouttelettes qui sont en contact direct avec le gaz confinant chauffé à très haute température. Le refroidissement en bas à droite de plume, quant à lui, peut être expliqué par la présence de la contre-électrode. En effet, la position du capillaire d'entrée du spectromètre de masse est situé à $X = 15 \text{ mm}$ et $Y \approx 8 \text{ mm}$ (non représenté sur les images). Cette pièce perturbe l'écoulement du gaz confinant chauffé si bien que le processus endothermique redevient prédominant dans cette zone. Pour ces raisons, les discussions suivantes seront faites en ne considérant que le « bord gauche » de la plume afin que nos conclusions ne soient pas tronquées par l'influence de la contre-électrode. L'environnement en bord de plume est alors bien défini par les paramètres d'ionisation de la source en termes de température.

Artéfacts possibles et conditions de validité de l'approche thermochromique

Afin de valider la nature de nos propos, certaines questions ont besoin d'être discutées. Pour la thermométrie statique par ratiométrie, il a été discuté dans le chapitre 1 que l'utilisation de deux espèces différentes pouvait conduire à des artéfacts de mesure liés à l'interaction entre chromophores. Par exemple, le couple de chromophore Rhodamine 110 – Rhodamine B utilisé dans cette étude peut être sujet aux phénomènes d'absorption croisée ou de FRET [42], [43]. En effet, la bande d'émission de la Rhodamine 110 et la bande d'absorption de la Rhodamine B se superposent, si bien qu'un photon émis par la Rhodamine 110 peut être réabsorbé par la Rhodamine B. De la même façon, si les deux espèces sont suffisamment proches l'une de l'autre, un transfert d'énergie non radiatif entre la Rhodamine 110 (donneur) et la Rhodamine B (accepteur) peut se produire. L'intensité de la bande d'émission de la Rhodamine B se verrait alors augmenter au dépend de celle de la Rhodamine 110. Une modification du ratio I_{RhB}/I_{Rh110} est alors induite indépendamment de la température et impliquerait une sous-évaluation de la température.

Conceptuellement, cette problématique peut être aisément résolue en diminuant la concentration des chromophores afin de limiter leurs interactions. En pratique, la sensibilité de détection de l'instrument détermine la concentration minimale en chromophore si bien que les concentrations respectives de la Rhodamine 110 et de la Rhodamine B ont été fixées de telle sorte que le signal de fluorescence soit détectable et qu'aucun effet notable « d'absorption croisée » ne soit mesuré (en d'autre mot, la concentration de chromophore a été graduellement diminuée jusqu'à ce que l'évolution du ratio I_{RhB}/I_{Rh110} soit constante).

Concernant la méthode de thermographie résolue en temps, nous avons vérifié que la durée de vie du complexe de Ruthénium n'était pas dépendant de la concentration. L'intensité du signal de fluorescence diminue environ d'un facteur 3 le long de la plume du spray. Nous pouvons donc considérer que la teneur en chromophore dans le volume de détection ne varie au maximum que d'un ordre de grandeur. Le signal de décroissance de fluorescence d'une solution de complexe de Ruthénium a été mesuré en solution pour trois concentrations différentes. La **Figure 3.18.a** montre que la durée de vie d'un chromophore est un paramètre intrinsèque à ce dernier dans cette gamme de concentration. De plus, l'état excité d'une espèce fluorescente en phase gazeuse peut avoir une durée de vie beaucoup plus longue qu'en solution dû à une diminution du taux de transitions non radiatives [43]. Nous avons donc réalisé une mesure de fluorescence résolue en temps du profil de l'électrospray avec la Rhodamine 110, non-thermochromique.

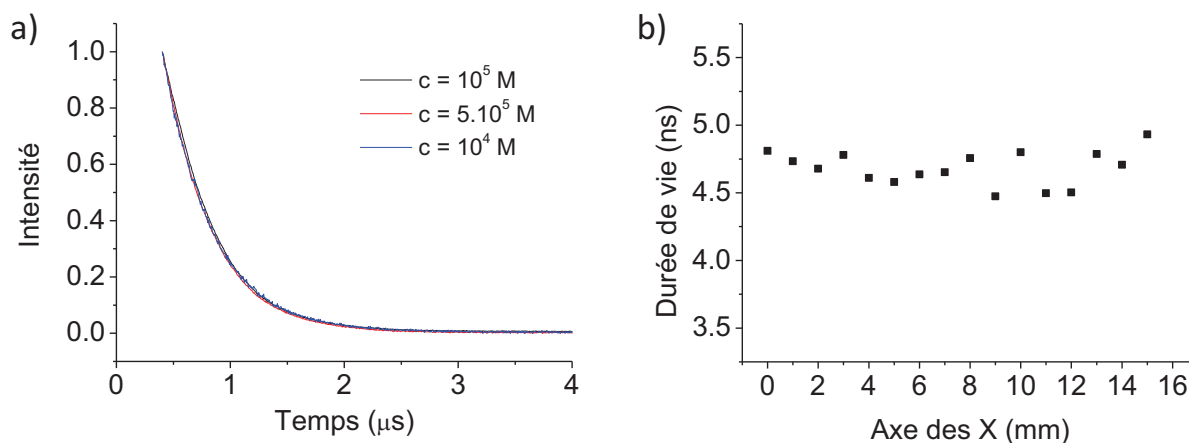


Figure 3.18: a) Décroissance du signal de fluorescence d'une solution de complexe de Ruthénium dans le Méthanol à différentes concentrations. b) Durée de vie de la Rhodamine 110 en solution à 20 µM de Méthanol injectée dans la source électrospray en fonction de la position dans la plume du spray.

Les résultats attestent que la durée de vie de la Rhodamine 110 est constante tout le long de la plume comme montré en [Figure 3.18.b](#). Cela confirme que les chromophores sont encore majoritairement solvatés, même en bas de la plume de l'électrospray.

Enfin, quelle que soit la méthode utilisée, d'autres critères sont à prendre en compte. En effet, très majoritairement, les espèces fluorescentes sont solvatochromiques (et/ou dans une moindre mesure, pH-chromique) [44], [45]. C'est-à-dire que leur émission dépend de la composition du solvant et de leur environnement local. Une modification de la composition et des propriétés physico-chimique du solvant induiraient alors une modification de leur propriété d'émission indépendamment de la température. Ainsi, lorsque le solvant est un mélange d'eau et de Méthanol par exemple, sa composition le long de la plume du spray se voit modifiée à cause de l'évaporation plus efficace du composé le plus volatil : le Méthanol [31].

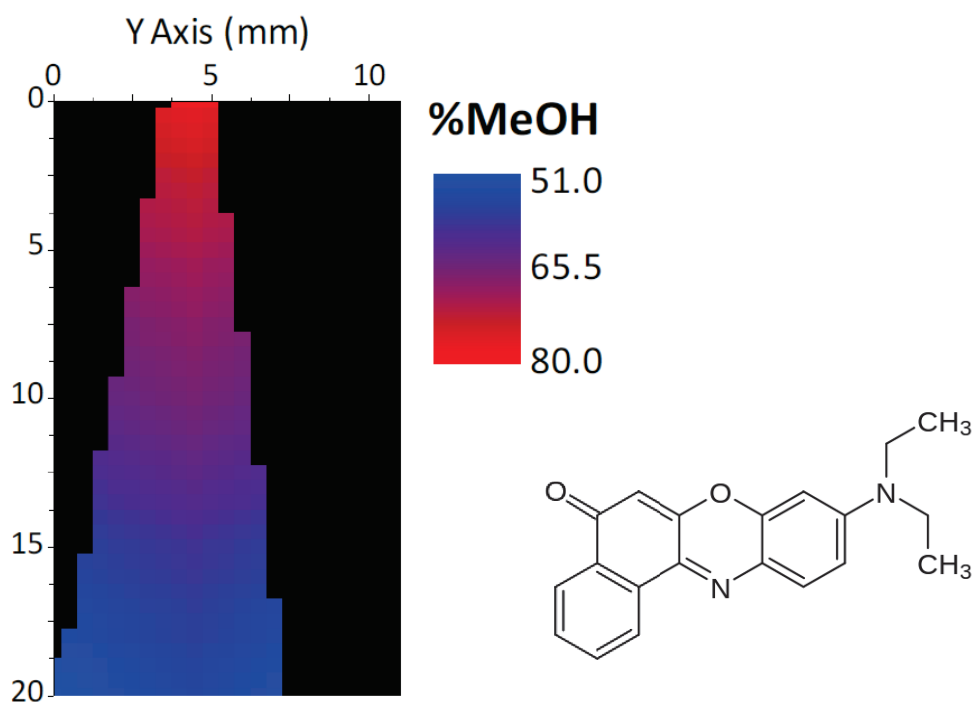


Figure 3.19: Exemple de Profil de la composition de la plume du spray pour un mélange d'eau et de Méthanol de composition initial 20:80% déterminé grâce aux propriétés d'émission du Nile Red (chromophore solvatochromique dont la structure est donné à droite). Les conditions d'ionisation utilisées sont proches de la configuration standard (référence [31]).

L'utilisation directe de courbes de calibrations déterminées à une composition de solvant donnée devient impossible. Il faut alors au préalable déterminer le profil de la composition du spray dans

des conditions d'ionisation données (Figure 3.19). Ensuite pour chaque point du spray correspondant à une composition particulière, il faudrait effectuer une étude des propriétés d'émission du chromophore en fonction de la température (une courbe de calibration en température par composition de solvant).

Une première approche a été explorée dans ce sens. Les émissions d'une solution de complexe de Ruthénium dans le Méthanol et dans l'eau désoxygénée en fonction de la température sont données en Figure 3.20. En supposant que ces dépendances en fonction de la température évoluent continuellement du solvant Méthanol pur, vers un mélange de Méthanol et d'eau, jusqu'à une solution de solvant aqueux pur, nous pouvons extrapoler de façon continue une courbe de calibration pour chaque proportion eau/Méthanol envisageable.

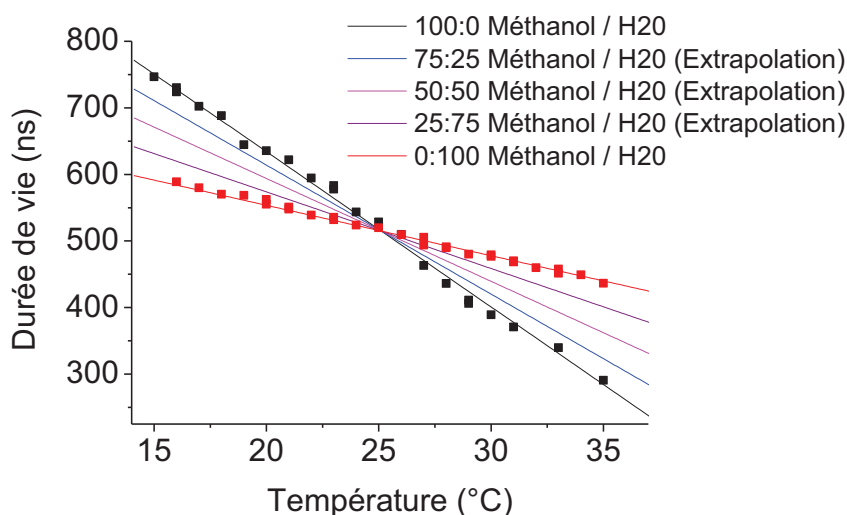


Figure 3.20: Courbe de calibration donnant la durée de vie en fonction de la température dans différents solvants.

L'analyse du profil de la composition du spray [31] et l'utilisation de ces courbes de calibration permettraient alors de définir un profil en température d'un mélange de solvant électronébulisé. Cependant, un tel effort serait laborieux et n'aboutirait pas à un résultat satisfaisant. En effet, le cumul des erreurs à travers la détermination du profil de la composition de la plume et l'incertitude sur les calibrations en solution conduirait très certainement à une mesure imprécise de la température des gouttelettes.

3.3.2 Influence des paramètres de la source

Nous nous plaçons dans les conditions dites « standards » de configuration de la source électrospray. Une étude systématique de l'influence des trois paramètres clefs d'ionisation de la source est alors menée.

Nous rappelons ici que les conditions dites « standards » correspondent au mode de polarisation en commutation avec des paramètres de voltage fixés à $C_n^+ = 500 V$, $C_n^- = 500 V$, $C_v^+ = 2000 V$ and $C_v^- = 3000 V$. La température du gaz séchant chauffé est définie à 250°C et son débit à 7 L/Min. Enfin, sauf si mentionné différemment, le débit d'injection (F) de la solution est de 3 mL/h, la pression du gaz nébulisant (NGP) est fixée à 25 psi et la température du gaz confinant (SGT) à 150°C pour un débit (SGF) de 7 L/Min.

Température du gaz confinant chauffé

Les profils en température de la plume électrospray sont donnés en [Figure 3.21.a](#) pour trois températures différentes de gaz confinant. Une augmentation globale de la température est observée avec l'augmentation de la température du gaz confinant (SGT). En particulier, pour une température du gaz confinant de 80°C, la température de la plume varie de 18°C à 29 °C, pour une température de 150°C, elle varie de 20 à 31°C et de 24 à 34°C pour une température du gaz confinant de 250°C ([Figure 3.21.c](#)). De plus, la [Figure 3.21.d](#) montre que l'effet de la température du gaz confinant est d'autant plus marqué sur les bords de la plume de l'électrospray, directement en contact avec le gaz que son cœur. Enfin, en mode d'ionisation positif de la source, on observe que l'efficacité d'ionisation d'une solution de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ à 0.1 mM dans le Méthanol augmente avec la température du gaz confinant ([Figure 3.21.b](#)), traduisant une meilleure désolvatation des analytes (qui sont en réalité ici les sondes de température injectées, à savoir le complexe de Ruthénium).

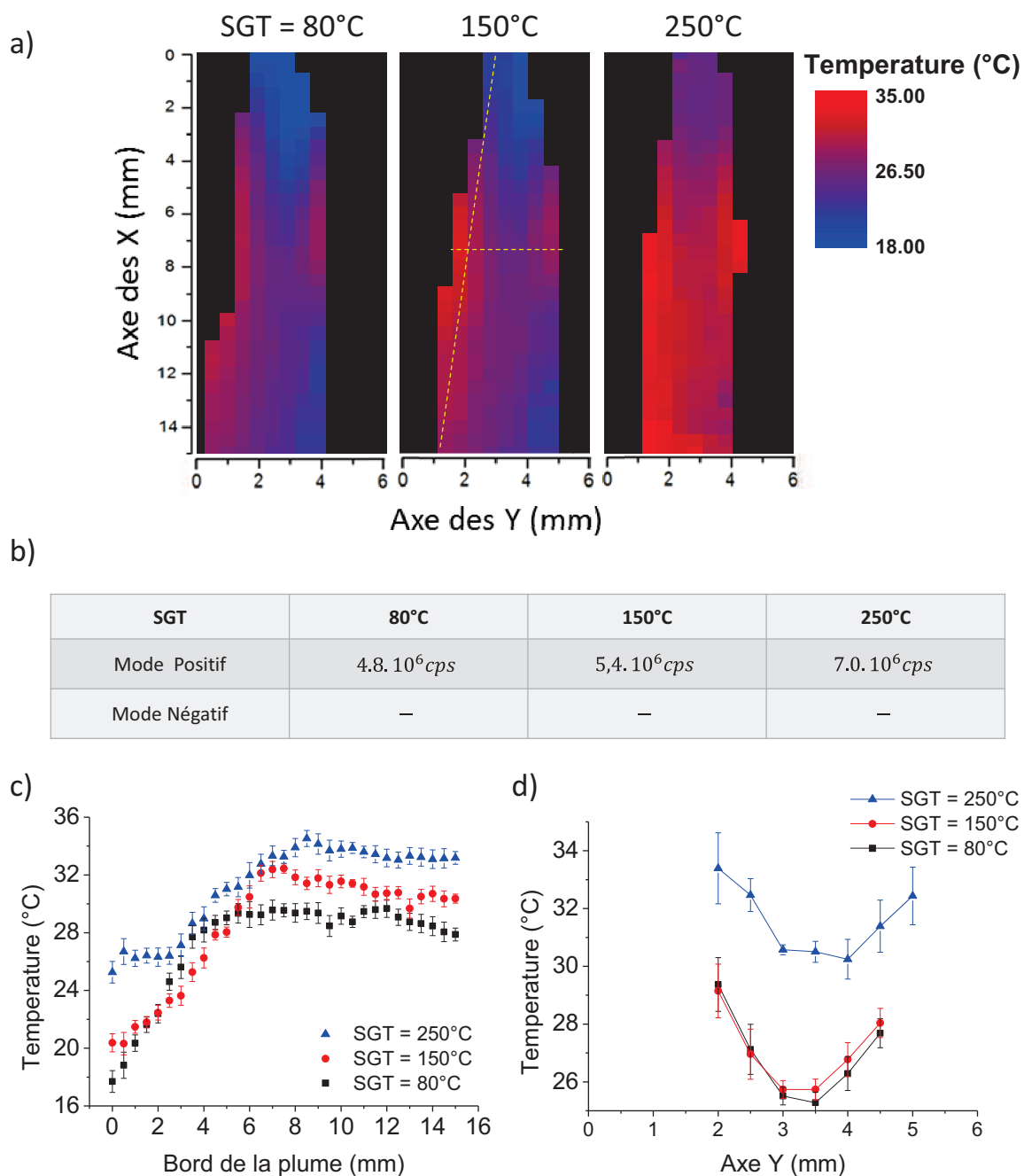


Figure 3.21: a) Profils XY en température de la plume du spray par fluorescence résolue en temps, b) Efficacité d'ionisation du complexe de Ruthénium, c) Projection de la température selon le bord de la plume et d) Projection de la température selon l'axe transversal de la plume pour différentes valeurs de la température du gaz confinant chauffé (SGT = 80, 150 et 250°C).

L'influence de la température sur l'évolution de la taille des gouttelettes est également étudiée. La **Figure 3.22** donne l'évolution du rayon des gouttelettes en bord de spray en fonction de sa position dans la plume du spray pour deux températures différentes de gaz confinant chauffé (150°C et 250°C).

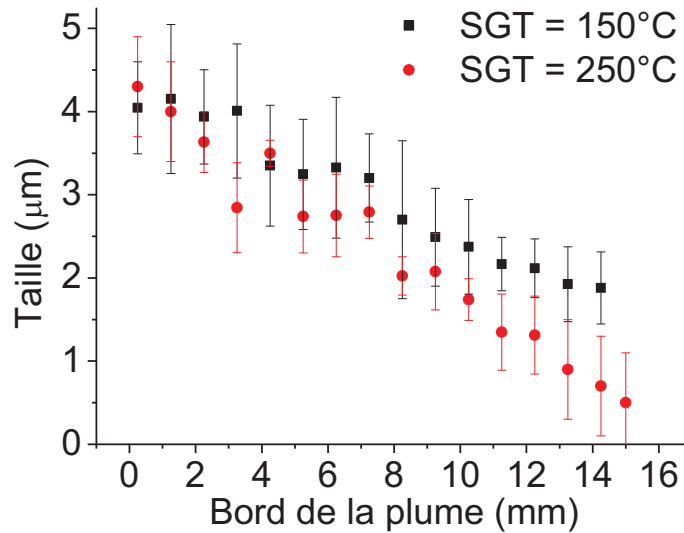


Figure 3.22: Evolution de la taille des gouttelettes de Méthanol le long du bord de la plume de l'électrospray pour deux valeurs de température de gaz confinant chauffé (SGT = 150 et 250°C).

Pour une température du gaz confinant chauffé $SGT = 150^\circ\text{C}$, le rayon des gouttelettes passe de 4.2 μm en haut de plume à 2.0 μm au bas de plume contre 4.2 μm à 0.7 μm pour $SGT = 250^\circ\text{C}$. Cette étude montre alors que lorsque la température du gaz confinant chauffé est grande, l'évaporation des gouttelettes est plus importante et donc, la désolvation des analytes se fait plus efficacement. En contrepartie, la température du spray augmente de façon significative ce qui peut altérer l'intégrité des espèces analysées.

Débit du gaz confinant chauffé

Nous avons également étudié l'impact du débit du gaz confinant sur le profil en température de la plume de l'électrospray. Les résultats sont donnés en **Figure 3.23.a**.

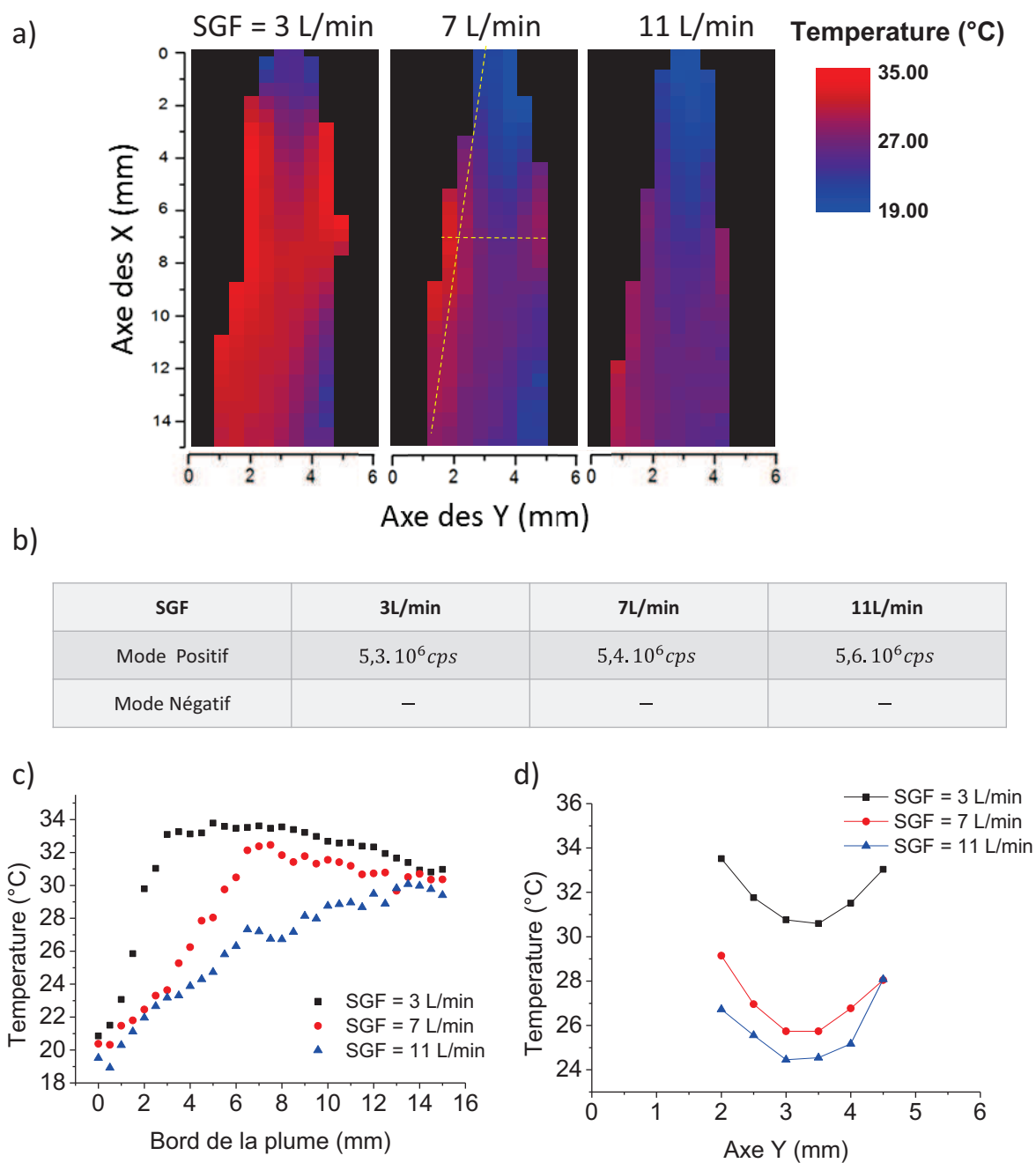


Figure 3.23: Profils XY en température de la plume du spray par fluorescence résolue en temps, b) Efficacité d'ionisation du complexe de Ruthénium, c) Projection de la température selon le bord de la plume et d) Projection de la température selon l'axe transversal de la plume pour différentes valeurs du débit du gaz confinant chauffé (SGF = 3, 7 et 9 L/min).

Avec une température de 150°C du gaz confinant chauffé (*SGT*), on observe que l'augmentation globale de la température de la plume du spray ne dépend pas du débit du gaz. La température des gouttelettes en début de spray est de 20°C et l'équilibre thermodynamique traduit par un plateau de température est atteint en fin de plume à 31°C environ. Cependant, l'augmentation de la température de la plume ([Figure 3.23.c](#)) montre une différence de dynamique complètement différente en fonction du débit du gaz confinant chauffé. En effet, plus le débit du gaz est faible, plus le plateau est atteint rapidement (i.e., plus le gradient de température le long du spray est grand). Ceci peut être expliqué par deux phénomènes complémentaires : soit (1) par une équilibration thermique plus efficace - et donc plus rapide - des gouttelettes lorsque le débit du gaz confinant est faible (transfert par conduction), soit (2) par une augmentation de la vitesse de déplacement des gouttelettes dans le spray dû à l'entraînement des gouttelettes par le gaz (l'équilibre thermodynamique est alors atteint de la même façon, mais plus bas dans la plume). Ces hypothèses pourront être discutées plus loin. Enfin, on peut noter que l'efficacité d'ionisation n'est que peu affectée par le débit du gaz confinant, même si on peut mentionner une légère augmentation du nombre d'ions détectés pour les plus hauts débits.

Pression du Gaz Nébulisant

La [Figure 3.24.a](#) montre des images de température de la plume obtenues pour différentes pressions de gaz nébulisant. On observe qu'une variation de la pression du gaz nébulisant n'influence que sensiblement la température des gouttelettes du spray. Cependant, il est clair qu'elle affecte de manière significative la dimension spatiale du spray : la plume de l'électrospray est plus focalisée pour les grandes valeurs de pression du gaz nébulisant.

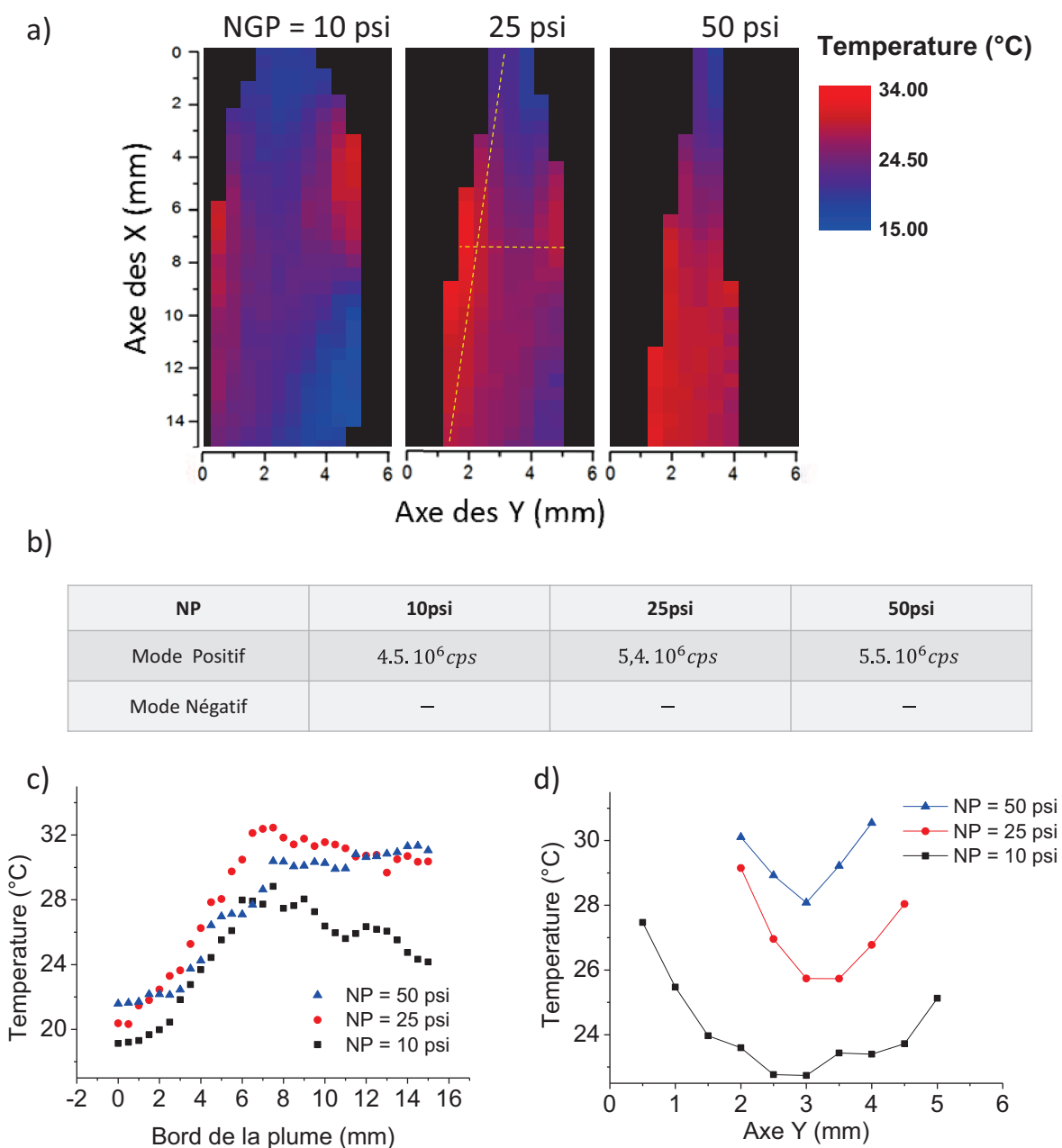


Figure 3.24: Profils XY en température de la plume du spray par fluorescence résolue en temps, b) Efficacité d'ionisation du complexe de Ruthénium, c) Projection de la température selon le bord de la plume et d) Projection de la température selon l'axe transversal de la plume pour différentes valeurs de pression du gaz nébulisant (NGP = 10, 25 et 50 psi).

Débit d'injection

L'impact du débit d'injection de la solution a été étudié. Nous avons augmenté le débit d'injection (F) de 3 mL/h à 12 mL/h (le débit maximum atteignable pour avoir une source électrospray stable) afin de se rapprocher des conditions de débit typiques des techniques de séparation par chromatographie liquide. Comme attendu, on observe une augmentation de la taille des gouttelettes générées lorsque le débit est plus grand. En effet, la taille moyenne des gouttelettes en début de spray est de 4.2 μm pour $F = 3\text{mL/h}$ et elle est estimée à 6.5 μm pour $F = 12\text{mL/h}$. (Figure 3.25). Ces résultats sont en accord quantitatif avec une dépendance en $F^{1/3}$ de la taille des gouttelettes générées par électrospray [46]. Cependant, plus bas dans la plume du spray, on peut noter la présence de très grosses gouttelettes ($>12\ \mu\text{m}$) ce qui biaise la mesure de taille par diffusion. En effet, l'intensité de la lumière diffusée est fonction du rayon de la sphère diffusante à la puissance 6. En présence de grosses gouttelettes, il devient alors difficile de détecter les petites.

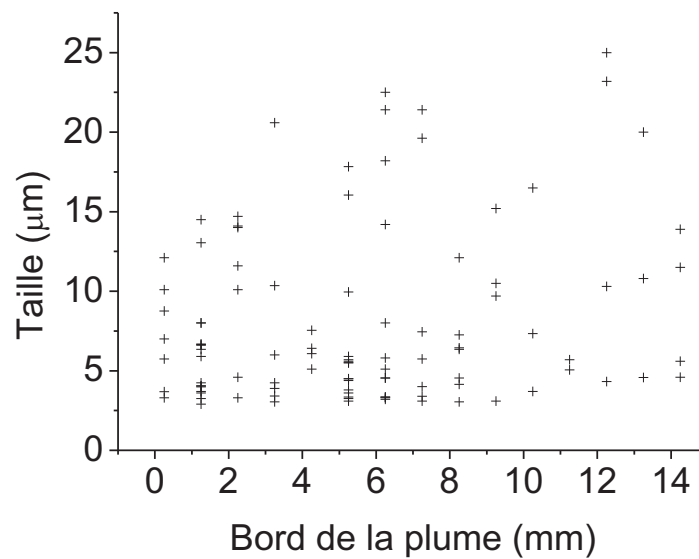


Figure 3.25: Exemple de collection de taille des gouttelettes de Méthanol le long du bord de la plume de l'électrospray avec $F = 12\text{mL/h}$

De plus la Figure 3.26 montre que la température du système augmente globalement le long de la plume du spray avec l'augmentation du débit d'injection avec la même pente. Enfin, le nombre d'ions détectés par unité de temps augmente naturellement avec le débit puisque plus de matière est injectée dans la source.

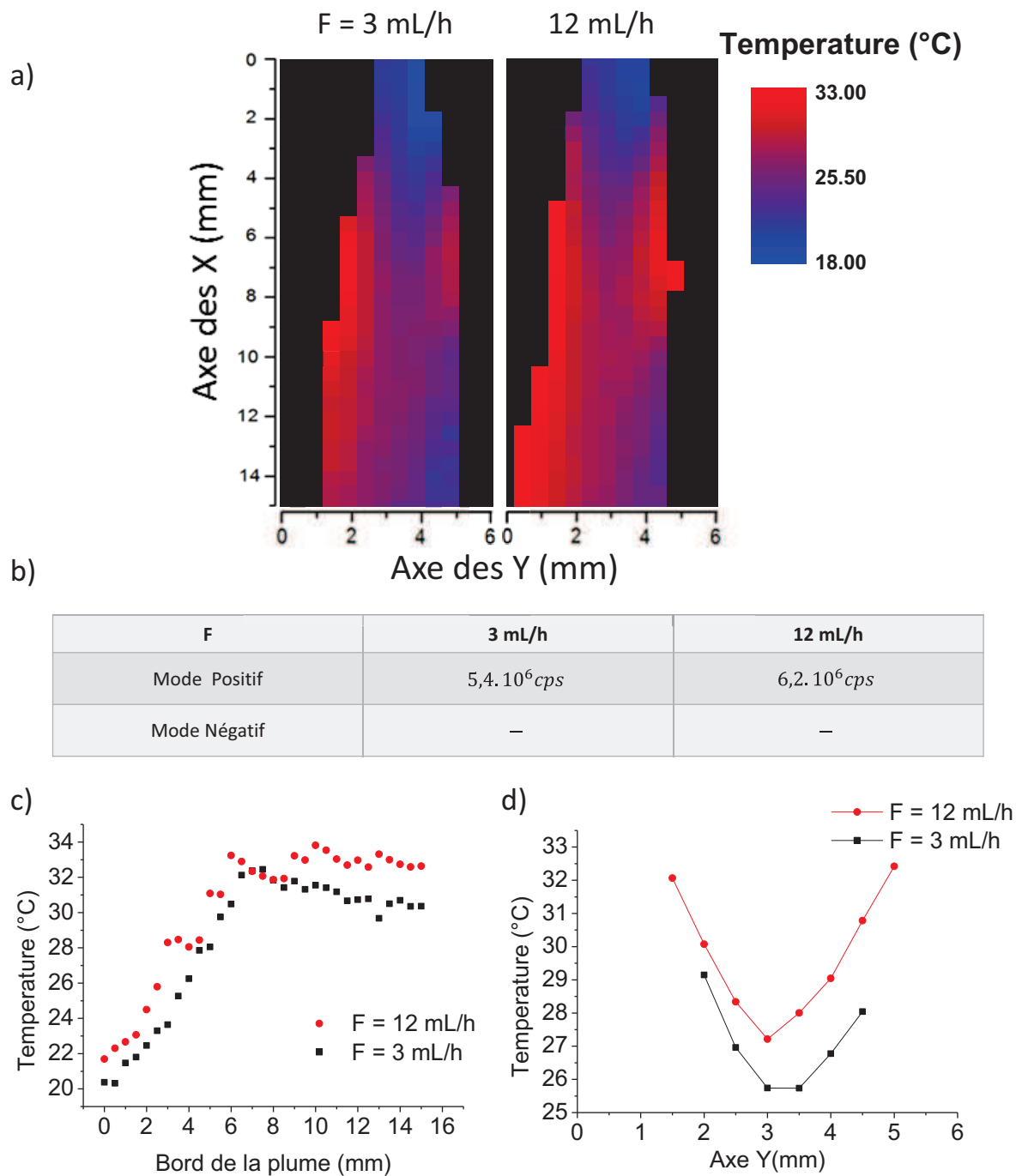


Figure 3.26: Profils XY en température de la plume du spray par fluorescence résolue en temps, b) Efficacité d'ionisation du complexe de Ruthénium, c) Projection de la température selon le bord de la plume et d) Projection de la température selon l'axe transversal de la plume pour différentes valeurs du débit d'injection ($F = 3$ et 12 mL/h).

3.3.3 Modèle théorique

Nous avons pu mesurer les changements de température le long de la plume du spray avec l'évolution de la taille des gouttelettes en cours d'évaporation tout en suivant l'efficacité d'ionisation de la source. Nous allons maintenant développer un modèle théorique simple basé sur des concepts de transfert de masse et de chaleur dans une source *thermal gradient focusing ESI* afin de confronter les résultats expérimentaux. Dans ce modèle, largement inspiré par les travaux de Davies (*Diffusion Controlled Evaporation Model*) [47], on ne prend pas en compte le fait que les gouttelettes sont chargées. Tous les mécanismes sous-jacents à l'ionisation par électrospray ne seront pas considérés. En particulier, nous ne discuterons pas de l'éjection de gouttelettes nanométriques, qui est un phénomène endothermique (coûtant de l'énergie) et qui pourrait influencer la thermodynamique du système. Le système modélisé se limite donc à l'étude de l'évaporation d'une gouttelette de Méthanol se déplaçant à la vitesse v , généré sous atmosphère azotée, chaude et inerte.

Deux mécanismes de transfert sont à prendre en compte. D'une part, un transfert thermique par conduction est évalué : le gaz confinant est chauffé à haute température induisant un transfert de chaleur du gaz vers le milieu liquide. D'autre part, le transfert de masse de la gouttelette est aussi pris en compte : l'évaporation du solvant de la gouttelette est une transition de phase endothermique.

En régime quasi-statique, l'évolution de la température à la surface de la gouttelette de rayon a noté dT_a sur une petite période de temps δt est donné par

$$dT_a = \frac{|Transfert\ de\ chaleur\ par\ conduction| - |Transfert\ de\ chaleur\ par\ évaporation|}{mc_m'} \quad (3.2)$$

Où m est la masse de la gouttelette (kg) et c_m' la capacité thermique massique ($J.kg^{-1}.K^{-1}$) du solvant liquide. Ainsi, si le transfert de chaleur par conduction est supérieur au transfert de chaleur par évaporation, la température augmente. Dans le cas contraire, les transferts de chaleur endothermique (évaporation) sont dominants et la température de la gouttelette diminue. Cette tendance continue jusqu'à ce que les transferts de chaleur par conduction et les transferts de chaleur

par évaporation se compensent : l'équilibre thermodynamique est alors atteint si bien que la température à la surface de la gouttelette ne varie plus ($dT_a = 0$).

Afin de pouvoir modéliser l'évolution de la température dT_a le long de la plume du l'électrospray, nous allons évaluer ces deux types de transferts.

Transfert de chaleur par conduction

La densité de flux de chaleur par conduction j_{cond} est donnée par la Loi de Fourier :

$$\overrightarrow{j_{cond}} = -k \overrightarrow{grad}(T) \quad (3.3)$$

Où j_{cond} la densité de flux de chaleur ($W \cdot m^{-2}$), k est la conductivité thermique du gaz environnement ($W \cdot m^{-1}K^{-1}$) et T la température (K). La densité de flux de chaleur peut être vue comme la dérivée du transfert thermique par conduction par rapport au temps divisé par la surface de la gouttelette. En considérant la géométrie du système, l'expression (3) peut s'écrire comme :

$$\left| \frac{Q_{cond}}{S} \right| = k \left(\frac{\partial T}{\partial r} \right)_a \quad (3.4)$$

Où Q_{cond} est le transfert thermique par conduction (J), S la surface de la gouttelette de rayon a . Afin d'évaluer la dérivé de la température en fonction du rayon, l'équation de conservation de la chaleur est donnée par :

$$c_m \rho \frac{\partial T}{\partial t} - div(k \overrightarrow{grad} T) = 0 \quad (3.5)$$

Avec k considérée comme constante, en coordonnée sphérique il vient :

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \frac{k}{c_m \rho} \left(\frac{2}{r} \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} \right) \quad (3.6)$$

Avec c_m la chaleur spécifique ($J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$) du gaz environnement, ρ sa masse volumique ($kg \cdot m^{-3}$).

A la surface de la gouttelette, $\frac{\partial T}{\partial t} = 0$ (régime quasi-statique), ainsi

$$\frac{2}{r} \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} = 0 \Rightarrow \frac{\partial T}{\partial r} = \frac{A}{r^2} \quad (3.7)$$

Evaluons maintenant la constant A en intégrant l'expression sur l'espace

$$\int_{T_a}^{T_\infty} dT = \int_a^\infty \frac{A}{r^2} dr \quad (3.8)$$

$$A = a(T_\infty - T_a) \quad (3.9)$$

D'où

$$\frac{\partial T}{\partial r} = \frac{a(T_\infty - T_a)}{r^2} \quad (3.10)$$

Cette expression pour $r = a$ donne

$$\left(\frac{\partial T}{\partial r}\right)_a = \frac{1}{a}(T_\infty - T_a) \quad (3.11)$$

En substituant (8) dans l'expression (4) on obtient

$$\frac{\delta Q_{cond}}{\delta t} = Sk \frac{1}{a}(T_\infty - T_a) \quad (3.12)$$

Or on a $S = 4\pi a^2$ et $\delta t = \frac{\delta X}{v}$ où δX est la distance parcourue pendant le temps δt à la vitesse v .

Finalement, le transfert de chaleur par conduction s'écrit

$$\delta Q_{cond} = 4\pi ak(T_\infty - T_a) \frac{\delta X}{v} \quad (3.13)$$

Transfert de chaleur par évaporation

Afin d'évaluer le transfert de chaleur par évaporation, considérons la densité de flux massique du solvant en phase gazeuse dans le cas où l'évaporation du solvant est limitée (i.e. contrôlée) par diffusion du solvant en phase gazeuse dans le milieu environnant. Son expression est alors donnée par la loi de Fick :

$$\overrightarrow{j_{mass}} = -D\overrightarrow{grad}(c) \quad (3.14)$$

Où j_{mass} est la densité de flux massique ($kg.s^{-1}.m^{-2}$), D le coefficient de diffusion du solvant en phase gazeuse dans le milieu environnant ($m^2.s^{-1}$), et c la concentration massique du solvant en phase gazeuse dans le milieu environnant ($kg.m^{-3}$). Avec le même raisonnement que précédemment, il vient

$$\left| \frac{Q_{evap}}{S} \right| = \left| \frac{l\dot{m}}{S} \right| = -lD \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right)_a \quad (3.15)$$

Avec Q_{evap} est le transfert thermique par évaporation, l est la chaleur latente du solvant ($J.mol^{-1}$). Afin d'évaluer la dérivée de la concentration massique en fonction du rayon, l'équation de conservation de la masse en coordonnée sphérique donne

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} + \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} \right) \quad (3.16)$$

De la même façon que précédemment, à la surface de la gouttelette, $\frac{\partial c}{\partial t} = 0$ (régime quasi-statique), d'où

$$\left(\frac{dc}{dr} \right)_a = \frac{1}{a} (c_\infty - c_a) \quad (3.17)$$

Si les gaz sont considérés comme parfait, on peut écrire l'équation d'état du gaz parfait en fonction de sa concentration massique

$$P \frac{M}{c} = R_m T \quad (3.18)$$

Avec P la pression partielle du solvant en phase gaz dans le milieu environnant, M sa masse molaire et R_m la constante des gaz parfait.

On a alors :

$$\left(\frac{dc}{dr}\right)_a = \frac{M}{aR_m} \left(\frac{P_\infty}{T_\infty} - \frac{P_a}{T_a}\right) \quad (3.19)$$

Si bien qu'en substituant (17) dans (13)

$$\frac{\delta Q_{evap}}{\delta t} = -SlD \frac{M}{aR_m} \left(\frac{P_\infty}{T_\infty} - \frac{P_a}{T_a}\right) \quad (3.20)$$

Finalement, le transfert de chaleur par évaporation s'écrit

$$\delta Q_{evap} = 4\pi a l D \frac{M}{R_m} \left(\frac{P_a}{T_a} - \frac{P_\infty}{T_\infty}\right) \frac{\delta X}{v} \quad (3.21)$$

Résultats

L'équation (2) donne

$$dT_a = \frac{|\delta Q_{cond}| - |\delta Q_{evap}|}{\frac{4}{3}\pi a^3 \rho' c_m'} \quad (3.22)$$

Avec ρ' la masse volumique du solvant. En substituant les expressions de δQ_{cond} et de δQ_{evap} il vient :

$$dT_a = \frac{3}{a^2 \rho' c_m'} \frac{\delta X}{v} \left\{ k(T_\infty - T_a) - l'D \frac{M}{R_m} \left(\frac{P_a}{T_a} - \frac{P_\infty}{T_\infty}\right) \right\} \quad (3.23)$$

Les paramètres utilisés dans le développement de ce modèle sont rappelés en [Table 3.1](#).

Table 3.1 : Description des paramètres utilisés dans le modèle d'évaporation contrôlé par diffusion

	Description	Information	Valeur	Unité
a	Rayon de la gouttelette	Mesurée par Diffusion de Mie		
v	Vitesse moyenne de la gouttelette	Références [17], [25]	2	$m.s^{-1}$
ρ'	Masse volumique du solvant (Méthanol) en phase liquide	Constante	791,4	$kg.m^{-3}$
c_m'	Capacité thermique massique du solvant (Méthanol) en phase liquide	Constante	2531	$J.kg^{-1}K^{-1}$
l'	Chaleur latente du solvant	Dépendant de la température	Equation (3.24)	$kJ.kg^{-1}$
M	Masse molaire du solvant (Méthanol)	Constante	32.04	$g.mol^{-1}$
k	Conductivité thermique du milieu environnant (Diazote)	Dépendant de la température, Moyenne géométrique	$\sqrt{k(T_a)k(T_\infty)}$	$W.m^{-1}K^{-1}$
D	Coefficient de diffusion du solvant en phase gazeuse dans le milieu environnant	Dépendant de la température, Moyenne géométrique	$\sqrt{D(T_a)D(T_\infty)}$ Equation (22)	$cm^2.s^{-1}$
R_m	Constante des gaz parfaits	Constante	8,31	$J.mol^{-1}.K^{-1}$
X	Position de la gouttelette	Entre $X = 0$ et 15 mm		
δX	Incrémentation	Pas pour le calcul	0.25	μm
dT_a	Evolution de la température à la surface de la gouttelette entre X et $X + \delta X$			
T_a	Température à la surface de la gouttelette	Mesurée pour $X = 0$		
P_a	Pression partielle du solvant en phase gazeuse à la surface de la gouttelette	Dépendant de la température, Equation d'Antoine	Equation (23)	Pa
T_∞	Température du milieu environnant : gaz confinant chauffé (Diazote)	Paramètre expérimental	SGT	K
P_∞	Pression partielle du solvant en phase gazeuse dans le milieu environnant	Paramètre ajusté (libre)	18665 (250°C) 17331 (150°C) 14665 (80°C)	Pa

Pour une solution de Méthanol nébulisée par électrospray, la taille des gouttelettes a été mesurée expérimentalement par diffusion de Mie. Le paramètre a varie en fonction de la position le long de la plume et est déterminé par une interpolation polynomiale des valeurs expérimentales.

Afin de limiter le nombre de paramètres libres, la vitesse moyenne des gouttelettes a été fixée à $v = 2 \text{ m.s}^{-1}$ [17], [25]. Cependant, selon l'hypothèse faite dans le paragraphe regardant l'influence du débit du gaz de confinant chauffé, la vitesse de déplacement des gouttelettes peut être discutée : à la vue de l'équation (21), la vitesse moyenne des gouttelettes est un paramètre qui va influencer le gradient de la température par rapport la position dans le spray, mais pas sa valeur d'équilibre. Plus cette vitesse sera petite, plus l'équilibre thermodynamique sera atteint rapidement dans la plume.

La chaleur latente du Méthanol liquide est évaluée selon son expression en fonction de la température. On donne alors [48] :

$$l'(T) = l'_0 e^{-\alpha \frac{T}{T_c}} \left(1 - \frac{T}{T_c}\right)^\beta \quad (3.24)$$

Avec $l'_0 = 45.3 \text{ (kJ.mol}^{-1}\text{)}$ ou $l'_0 = 1415.6 \text{ (kJ.kg}^{-1}\text{)}$, $\alpha = -0,3100$, $\beta = 0,4241$, $T_c = 512,6 \text{ K}$ et T en Kelvin.

Les valeurs de D , dépendant de la température en général, sont données par leur moyenne géométrique. L'expression de D en fonction de la température est donnée par [49] :

$$D(T) = D(T_r) \left(1 - \frac{T}{T_r}\right)^{1,81} \quad (3.25)$$

Avec pour le Méthanol, $D(T_r = 298.15\text{K}) = 0.155 \text{ (cm}^2.\text{s}^{-1}\text{)}$ et T en Kelvin.

Les valeurs de k , dépendant de la température en général, sont données par leurs moyennes géométriques. L'expression de k est déterminée par extrapolation de valeurs tabulées (on donne pour $T = 25^\circ\text{C}$, $k = 0.0249 \text{ W.m}^{-1}\text{K}^{-1}$).

Enfin, la pression partielle du solvant en phase gazeuse à la surface de la gouttelette est donnée en fonction de la température par l'équation d'Antoine [23] :

$$P_a = 10^{\left(A - \frac{B}{C + (T - 273.15)}\right)} \times 133.322368 \quad (3.26)$$

Où P_a est donné en pascal, $A = 8.0809$, $B = 1582.27$, $C = 239.7$ et T en Kelvin.

La corrélation entre la température et la taille des gouttelettes le long du bord de la plume électrospray est donnée en **Figure 3.27**. Les données expérimentales sont comparées au modèle d'évaporation d'une gouttelette de solvant dans un environnement chauffé pour des valeurs de température de gaz confinant chauffé. Le modèle reproduit les mesures de la température lorsque T_∞ est déterminé par la valeur du *SGT*. Le seul paramètre ajustable est P_∞ , en effet, dans ce modèle d'évaporation contrôlée par la diffusion du Méthanol, c'est la pression partielle du Méthanol dans le milieu environnant qui affecte la température finale du système. Les valeurs ajustées de P_∞ (**Table 3.1**) sont raisonnables et cohérentes avec la valeur de pression de vapeur saturante du Méthanol (13 kPa à 20°C).

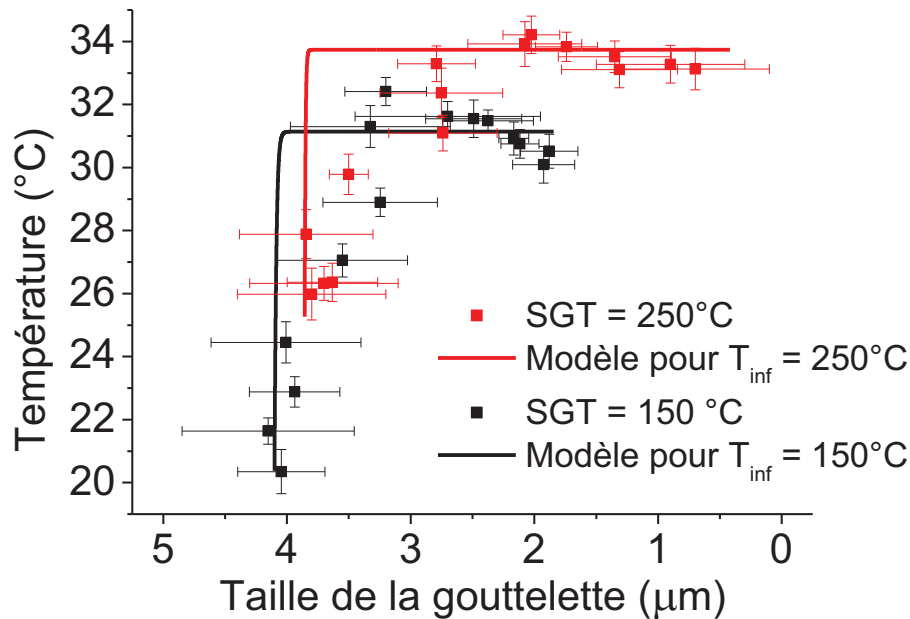


Figure 3.27 : (point) Corrélation entre la température et la taille des gouttelettes en cours d'évaporation pour deux température de gaz confinant chauffé ($SGT = 150$ et 250°C) et (ligne) comparaison avec le modèle théorique d'évaporation contrôlé par diffusion.

Ces résultats montrent que, malgré une diminution de la taille des gouttelettes induite par une évaporation efficace, la température du système augmente par l'effet du gaz confinant chauffé à très haute température.

Afin de proposer une seconde visualisation de ce modèle, nous pouvons également donner l'évolution de la température en fonction de la position dans la plume du spray (Figure 3.28). La taille des gouttelettes ne sera alors plus visible, mais cette représentation permet une discussion du modèle plus clairement.

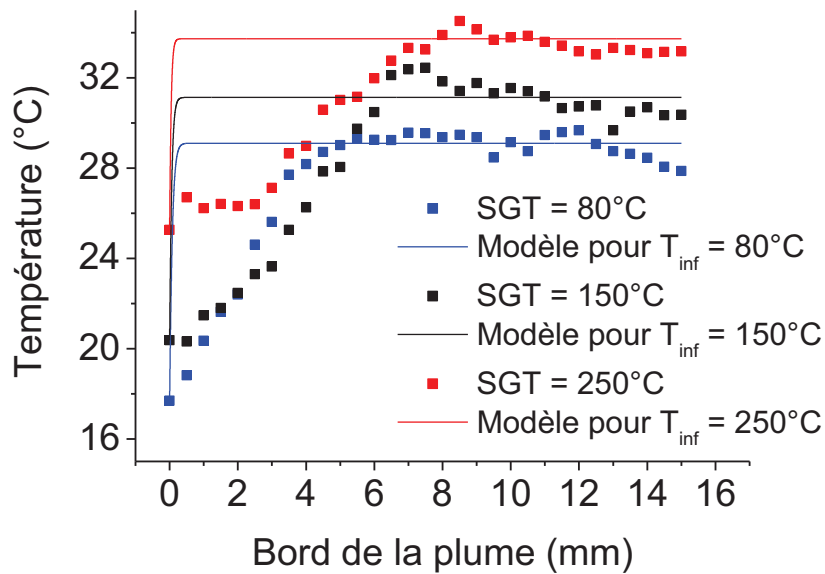


Figure 3.28: Evolution de la température en fonction de la position dans la plume de l'électrospray dans les conditions standards de la source pour différentes valeurs de SGT.

Comme souligné précédemment, on voit que le modèle reproduit bien la température d'équilibre, mais le plateau est atteint beaucoup plus rapidement avec le modèle que dans l'expérience. Le seul paramètre ajustable influençant la pente de la température est la vitesse de déplacement de la gouttelette (la taille étant un paramètre expérimental). Cette dernière a jusqu'à présent été fixée pour notre système à $v = 2 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ (correspondant aux mesures par vélocimétrie laser de Zenobi [25]). Afin de se rapprocher des tendances expérimentales, une autre stratégie peut être adoptée. Cette fois-ci, seule la vitesse de déplacement des gouttelettes est ajustable ; la valeur de P_{∞} est fixée (pour SGT = 150°C, $P_{\infty} = 17331 \text{ Pa}$). Les mesures de l'évolution de la température le long de la plume de l'électrospray pour différents débits de gaz confinant sont confrontées à ce modèle en Figure 3.29.

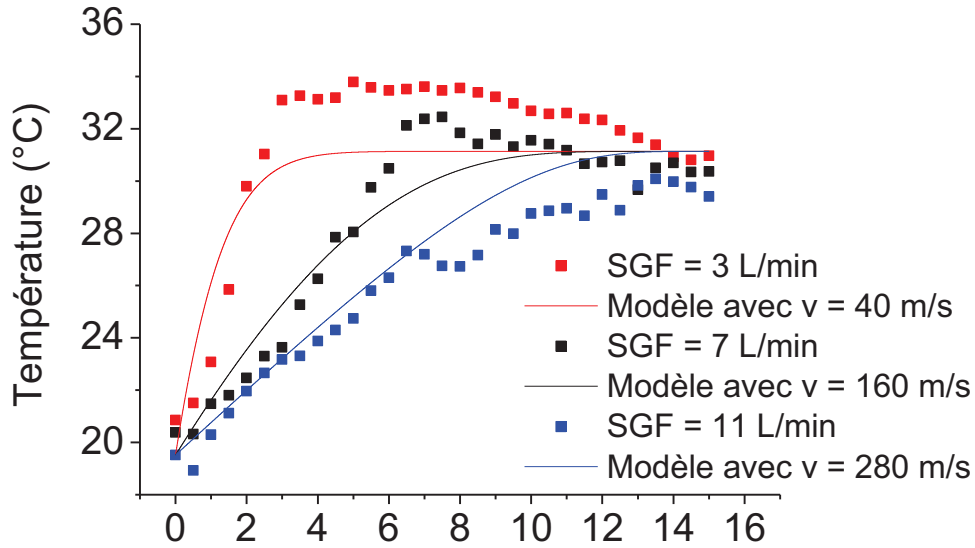


Figure 3.29: Evolution de la température en fonction de la position dans la plume de l'électrospray dans les conditions standards de la source pour différentes valeurs de SGF.

Pour un débit de gaz confinant de $SGF = 3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, la vitesse des gouttelettes est évaluée à $v = 40 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, pour $SGF = 7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, $v = 160 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ et enfin pour $SGF = 11 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, $v = 280 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Le modèle reproduit convenablement les valeurs expérimentales, cependant, cette analyse donne des valeurs de la vitesse de déplacement des gouttelettes déraisonnables compte tenu de la géométrie du système. En effet, l'éjection du gaz confinant se fait par un anneau autour de la plume du spray (Figure 3.30). Les diamètres intérieur d_{int} et extérieur d_{ext} de l'anneau sont respectivement de 8.15 mm et 9.25 mm. On peut alors estimer la vitesse d'écoulement du gaz confinant v_{gaz} pour les différents débits :

$$v_{gaz} = \frac{SGF}{\frac{\pi}{4}(d_{ext}^2 - d_{int}^2)} \quad (3.27)$$

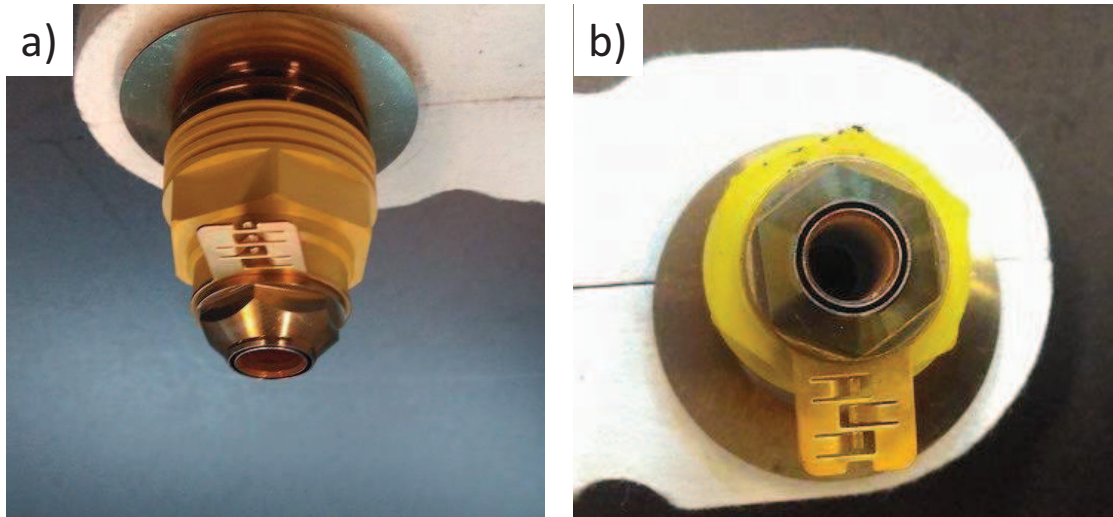


Figure 3.30: Photographie du système d'injection du gaz confinant chauffé

Pour $SGF = 3 \text{ L.min}^{-1}$, on estime que $v_{gaz} = 3.32 \text{ m.s}^{-1}$, pour $SGF = 7 \text{ L.min}^{-1}$, $v_{gaz} = 7.76 \text{ m.s}^{-1}$, et enfin pour $SGF = 11 \text{ L.min}^{-1}$, $v_{gaz} = 12.20 \text{ m.s}^{-1}$. Ces valeurs sont très inférieures aux valeurs obtenues pour la vitesse de déplacement des gouttelettes. L'écoulement du gaz confinant chauffé ne permet donc pas d'accélérer les gouttelettes par entrainement pour cette gamme de vitesse. Néanmoins, qualitativement, on obtient une tendance cohérente : plus le débit du gaz confinant est grand, plus la vitesse des gouttelettes augmente, déplaçant la position du plateau de température vers le bas de la plume. L'influence de la vitesse des gouttelettes seule ne justifie pas pourquoi l'équilibre est atteint si tardivement, un autre modèle thermodynamique plus complexe doit être élaboré, qui va au-delà de l'équilibre entre de ces deux grandeurs. En particulier, un modèle prenant en compte l'éjection de nano-gouttelettes par fission asymétrique des microgouttelettes chargées par instabilité de Rayleigh pourrait être pertinent dans cette étude.

On peut noter que ces résultats sont en contraste avec les mesures effectuées par le groupe de Cook [23]. Dans ce travail, la température des gouttelettes de Méthanol diminue d'environ 30°C dans les premiers 5.0 mm de la plume. Cette diminution de la température peut également être modélisée par le modèle d'évaporation contrôlée par diffusion. Dans ces conditions, la température du gaz environnant est à température ambiante et l'absence de gaz confinant chauffé influence drastiquement la valeur de P_∞ . Ces différences sont mises sur le compte des différences entre notre montage de celui employé par Cook, en particulier sur la présence du gaz confinant chauffé et sur la géométrie de la source.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en place un jeu de méthodes optiques afin de déterminer le profil en température et de suivre l'évolution de la taille de gouttelettes en cours d'évaporation dans une source Agilent Jet Stream basée sur les propriétés de fluorescence de molécules thermochromiques et sur des propriétés d'interférence de la lumière diffusée. En tant que sonde de température, un couple de chromophore de la famille des Rhodamine a été utilisé pour des mesures par ratiométrie en fluorescence statique. Cette méthode a été comparée avec une technique de thermométrie résolue en temps en utilisant un complexe de Ruthénium : $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Les deux méthodes donnent des résultats similaires, néanmoins, la méthode résolue en temps donne des résultats plus précis avec une meilleure sensibilité avec un temps d'acquisition plus court.

Un réchauffement global ($\Delta T \sim 10^\circ\text{C}$) de la plume de l'électrospray est observé malgré une évaporation efficace des gouttelettes. Cela indique que les transferts d'énergie thermique par conduction entre le gaz chauffé permettant de confiner la plume sont prédominants devant les transferts d'énergie par évaporation. Ceci est confirmé par le modèle d'évaporation contrôlée par diffusion malgré ses limites. L'amplitude de ΔT peut être contrôlée en changeant les paramètres de la source d'ionisation. En particulier, les caractéristiques du gaz confinant chauffé (température et débit) ont un impact direct sur la thermodynamique du spray puisque ce dernier est en contact direct avec les gouttelettes en cours d'évaporation. La source électrospray *Thermal Gradient Focusing* est donc une source efficace pour l'évaporation de grande quantité de solvant.

Pour finir, cette augmentation de température peut avoir un impact sur l'équilibre chimique des analytes présents dans les gouttelettes si leur cinétique de réaction est comparable à la durée de vie de la gouttelette chauffée. De plus, l'amplitude de ΔT peut avoir des conséquences sur l'analyse de protéines par spectrométrie de masse native. En effet, un dépliement partiel de la protéine peut se produire durant le procédé de désolvatation, et ce dépliement peut être causé par une amplitude de ΔT trop importante. Il serait intéressant de coupler ces mesures de températures à une mesure de type FRET sur protéines en cours de désolvatation pour mieux évaluer l'impact de la température dans les sources d'ionisation par électrospray sur la conformation des protéines, en enjeu majeur en spectrométrie de masse de type « native MS ».

Références

- [1] R. J. Hopkins and J. P. Reid, "Evaporation of Ethanol/Water Droplets: Examining the Temporal Evolution of Droplet Size, Composition and Temperature," *J. Phys. Chem. A*, vol. 109, no. 35, pp. 7923–7931, Sep. 2005.
- [2] F. Lemoine and G. Castanet, "Temperature and chemical composition of droplets by optical measurement techniques: a state-of-the-art review," *Exp. Fluids*, vol. 54, no. 7, p. 1572, 2013.
- [3] P. Kebarle and L. Tang, "FROM IONS IN SOLUTION TO IONS IN THE GAS PHASE," *Anal. Chem.*, vol. 65, no. 22, p. 972A–986A, Nov. 1993.
- [4] J. B. Fenn, "Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture)," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 42, no. 33, pp. 3871–3894, 2003.
- [5] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, and A. N. Tyler, "Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry," *Nature*, vol. 293, no. 5830, pp. 270–275, Sep. 1981.
- [6] R. D. Macfarlane and D. F. Torgerson, "Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy," *Science (80-.)*, vol. 191, no. 4230, p. 920 LP-925, Mar. 1976.
- [7] F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, and B. T. Chait, "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers," *Anal. Chem.*, vol. 63, no. 24, p. 1193A–1203A, Dec. 1991.
- [8] J. Fenn, "Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began," *J. Biomol. Tech.*, vol. 13, no. 3, pp. 101–118, Sep. 2002.
- [9] L. R. F.R.S., "XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity," *Philos. Mag. Ser. 5*, vol. 14, no. 87, pp. 184–186, 1882.
- [10] P. Kebarle and M. Peschke, "On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions," *Anal. Chim. Acta*, vol. 406, no. 1, pp. 11–35, Feb. 2000.

- [11] K. Tang and A. Gomez, "On the structure of an electrostatic spray of monodisperse droplets," *Phys. Fluids*, vol. 6, no. 7, pp. 2317–2332, Jul. 1994.
- [12] L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, and S. Vahidi, "Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 1, pp. 2–9, Jan. 2013.
- [13] K. Tang and A. Gomez, "Generation by electrospray of monodisperse water droplets for targeted drug delivery by inhalation," *J. Aerosol Sci.*, vol. 25, no. 6, pp. 1237–1249, 1994.
- [14] K. Tang and A. Gomez, "Generation of Monodisperse Water Droplets from Electrosprays in a Corona-Assisted Cone-Jet Mode," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 175, no. 2, pp. 326–332, 1995.
- [15] K. Tang and A. Gomez, "Charge and fission of droplets in electrostatic sprays," *Phys. Fluids*, vol. 6, no. 1, pp. 404–414, Jan. 1994.
- [16] Z. Olumee, J. H. Callahan, and A. Vertes, "Droplet Dynamics Changes in Electrostatic Sprays of Methanol–Water Mixtures," *J. Phys. Chem. A*, vol. 102, no. 46, pp. 9154–9160, Nov. 1998.
- [17] P. Nemes, I. Marginean, and A. Vertes, "Spraying Mode Effect on Droplet Formation and Ion Chemistry in Electrosprays," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 8, pp. 3105–3116, Apr. 2007.
- [18] S. Zhou, A. G. Edwards, K. D. Cook, and G. J. Van Berkel, "Investigation of the Electrospray Plume by Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy," *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 4, pp. 769–776, Feb. 1999.
- [19] S. Zhou and K. D. Cook, "Probing Solvent Fractionation in Electrospray Droplets with Laser-Induced Fluorescence of a Solvatochromic Dye," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 5, pp. 963–969, Mar. 2000.
- [20] S. Zhou, B. S. Prebyl, and K. D. Cook, "Profiling pH Changes in the Electrospray Plume," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 19, pp. 4885–4888, Oct. 2002.
- [21] R. Wang and R. Zenobi, "Evolution of the solvent polarity in an electrospray plume," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 21, no. 3, pp. 378–385, 2010.
- [22] P. Kebarle and U. H. Verkerk, "Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase,

- what we know now,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 28, no. 6, pp. 898–917, 2009.
- [23] S. C. Gibson, C. S. Feigerle, and K. D. Cook, “Fluorometric Measurement and Modeling of Droplet Temperature Changes in an Electrospray Plume,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 1, pp. 464–472, Jan. 2014.
- [24] H. Wang and G. R. Agnes, “Kinetically Labile Equilibrium Shifts Induced by the Electrospray Process,” *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 19, pp. 4166–4172, Oct. 1999.
- [25] A. Wortmann, A. Kistler-Momotova, R. Zenobi, M. C. Heine, O. Wilhelm, and S. E. Pratsinis, “Shrinking Droplets in Electrospray Ionization and Their Influence on Chemical Equilibria,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 18, no. 3, pp. 385–393, Mar. 2007.
- [26] J. Liu and L. Konermann, “Irreversible Thermal Denaturation of Cytochrome c Studied by Electrospray Mass Spectrometry,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 20, no. 5, pp. 819–828, May 2009.
- [27] X. M. Pan, X. R. Sheng, S. M. Yang, and J. M. Zhou, “Probing subtle acid-induced conformational changes of ribonuclease A by electrospray mass spectrometry,” *FEBS Lett.*, vol. 402, no. 1, pp. 25–27, Feb. 1997.
- [28] S. F. Wong, C. K. Meng, and J. B. Fenn, “Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols),” *J. Phys. Chem.*, vol. 92, no. 2, pp. 546–550, Jan. 1988.
- [29] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, “Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules,” *Science (80-.)*, vol. 246, no. 4926, p. 64 LP-71, Oct. 1989.
- [30] A. Bruins and R. B. Cole, *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*. 2010.
- [31] M. Girod *et al.*, “Profiling an electrospray plume by laser-induced fluorescence and Fraunhofer diffraction combined to mass spectrometry: influence of size and composition of droplets on charge-state distributions of electrosprayed proteins,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, no. 26, pp. 9389–9396, 2012.
- [32] M. Girod, R. Antoine, P. Dugourd, C. Love, A. Mordehai, and G. Stafford, “Basic Vapor

- Exposure for Tuning the Charge State Distribution of Proteins in Negative Electrospray Ionization: Elucidation of Mechanisms by Fluorescence Spectroscopy,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 23, no. 7, pp. 1221–1231, 2012.
- [33] M. Girod, X. Dagany, R. Antoine, and P. Dugourd, “Relation between charge state distributions of peptide anions and pH changes in the electrospray plume. A mass spectrometry and optical spectroscopy investigation,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 308, no. 1, pp. 41–48, Nov. 2011.
- [34] C. F. Bohren and D. R. Huffman, *Absorption and scattering of light by small particles*. 1998.
- [35] J. Sakakibara and R. J. Adrian, “Whole field measurement of temperature in water using two-color laser induced fluorescence,” *Exp. Fluids*, vol. 26, no. 1, pp. 7–15, 1999.
- [36] J. Van Houten and R. J. Watts, “Temperature dependence of the photophysical and photochemical properties of the tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) ion in aqueous solution,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 98, no. 16, pp. 4853–4858, Aug. 1976.
- [37] T. Hiraga, N. Kitamura, H. B. Kim, S. Tazuke, and N. Mori, “Pressure and temperature effects on the excited state of the tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complex,” *J. Phys. Chem.*, vol. 93, no. 8, pp. 2940–2945, Apr. 1989.
- [38] F. E. Lytle and D. M. Hercules, “Luminescence of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) dichloride,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 91, no. 2, pp. 253–257, Jan. 1969.
- [39] Q. G. Mulazzani, H. Sun, M. Z. Hoffman, W. E. Ford, and M. A. J. Rodgers, “Quenching of the Excited States of Ruthenium(II)-Diimine Complexes by Oxygen,” *J. Phys. Chem.*, vol. 98, no. 4, pp. 1145–1150, Jan. 1994.
- [40] P. Payra and P. K. Dutta, “Development of a dissolved oxygen sensor using tris(bipyridyl) ruthenium (II) complexes entrapped in highly siliceous zeolites,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 64, no. 1–3, pp. 109–118, Oct. 2003.
- [41] A. Soleilhac, X. Dagany, P. Dugourd, M. Girod, and R. Antoine, “Correlating Droplet Size with Temperature Changes in Electrospray Source by Optical Methods,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 16, pp. 8210–8217, Aug. 2015.

- [42] J. Saha *et al.*, "Investigation of Fluorescence Resonance Energy Transfer between Fluorescein and Rhodamine 6G," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 149, pp. 143–149, Oct. 2015.
- [43] V. Frankevich, V. Chagovets, F. Widjaja, K. Barylyuk, Z. Yang, and R. Zenobi, "Fluorescence resonance energy transfer of gas-phase ions under ultra high vacuum and ambient conditions," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, no. 19, pp. 8911–8920, 2014.
- [44] I. L. Arbeloa and K. K. Rohatgi-Mukherjee, "Solvent effects on the photophysics of the molecular forms of rhodamine B. Internal conversion mechanism," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 129, no. 6, pp. 607–614, 1986.
- [45] J. V Caspar and T. J. Meyer, "Photochemistry of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+) ion (Ru(bpy)₃²⁺). Solvent effects," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 105, no. 17, pp. 5583–5590, Aug. 1983.
- [46] J. F. De La Mora and I. G. Loscertales, "The current emitted by highly conducting Taylor cones," *J. Fluid Mech.*, vol. 260, pp. 155–184, 1994.
- [47] C. N. Davies and D. T. Shaw, *Fundamentals of Aerosol Science*. 1978.
- [48] V. Majer, V. Svoboda, H. V Kehiaian, and I. U. of P. and A. Chemistry., *Enthalpies of vaporization of organic compounds : a critical review and data compilation*. Oxford: Blackwell Scientific, 1985.
- [49] B. E. Poling, J. M. Prausnitz, and J. P. O'Connell, *The properties of gases and liquids*. McGraw-Hill, 2001.

Chapitre 4 : Anisotropie de fluorescence : De la température aux mesures de forme sur protéines.

Table des matières

Introduction	135
4.1 Des édifices biomoléculaires complexes : Les Protéines	137
4.1.1 Structures et Conformations des protéines	138
Structure Primaire	138
Structure Secondaire	138
Structure Tertiaire	139
4.1.2 Diagnostic de la conformation d'une protéine par spectrométrie de masse	140
4.1.3 Couplage entre spectrométrie de masse et mobilité ionique : vers la spectrométrie de masse native.....	142
4.1.3 Couplage entre spectroscopie optique, plume électrospray et spectrométrie de masse... ..	144
4.2 L'anisotropie de fluorescence comme sonde conformationnelle. L'influence du Méthanol ..	146
4.2.1 Synthèse de la Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate.....	149
4.2.2 Caractérisation du système Chromophore – Protéine	150
Par Absorption	150
Par Spectrométrie de Masse.....	152
Par dichroïsme Circulaire.....	153
Durée de vie de Fluorescence	154
Anisotropie de fluorescence.....	155
4.2.3 Influence des différents paramètres sur l'anisotropie de fluorescence	155
4.2.4 Déplieement de la protéine sondée par anisotropie de fluorescence	157
Conclusion et perspectives	162
Références	164

Introduction

La physico-chimie des gouttelettes chargées lors du processus d'ionisation par électrospray est très riche. Pendant l'évaporation des gouttelettes, des modifications brutales de l'environnement local des analytes, comme des changements de température, de pH et de composition de solvant, peuvent avoir de grandes conséquences sur les analytes ce qui vient altérer leur analyse en phase gazeuse par spectrométrie de masse. En particulier, les protéines sont des biomolécules complexes dont la conformation est particulièrement sensible aux mécanismes d'ionisation (**Chapitre 3** et **Figure 4.1– Non disponible dans la version expurgée**) mis en jeu lors du procédé d'ionisation par électrospray [1], [2].

Figure 4.1: Représentation des mécanismes impliqués lors de l'ionisation par électrospray de protéines. (a) modèle d'évaporation ionique (pour les petits analytes) (b) modèle de résidu chargé (pour les protéines globulaires) (c) modèle d'éjection en chaîne (pour les grandes protéines) [2].

Afin d'aller vers une spectrométrie de masse native, c'est-à-dire vers une étude de la structure de biomolécules en phase gazeuse qui ont conservé leurs propriétés structurales fonctionnelles, nous avons besoin de développer de nouveaux outils permettant de sonder la conformation de la

protéine pendant le processus d'ionisation par électrospray afin d'être capable de contrôler l'impact des paramètres d'ionisation sur la structure des analytes. Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps décrire ce qu'est une protéine d'un point de vue conformationnel. Nous verrons alors que des méthodes de couplage entre spectrométrie de masse et fluorescence peuvent être utilisées pour le diagnostic structurel de protéines. Par ailleurs, Nous verrons également que l'anisotropie de fluorescence est une propriété qui dépend, entre autre, du rayon hydrodynamique de l'espèce émettrice et qu'elle pourrait être une sonde adaptée pour l'analyse de l'évolution conformationnelle des protéines. En effet, on rappelle ici que l'anisotropie de fluorescence r d'un chromophore de durée de vie τ est définie par :

$$r = \frac{r_0}{1 + \tau/\theta} \quad (4.1)$$

Où r_0 est l'anisotropie limite, et θ est le temps de corrélation rotationnel donné par la relation de Stokes-Einstein pour une sphère rigide en rotation par :

$$\theta = \frac{\eta V}{k_b T} \quad (4.2)$$

Où η est la viscosité du solvant, k_b la constante de Boltzmann, T la température et V le volume de la sphère. Une modification du rayon hydrodynamique de la protéine induirait alors une modification de son temps de corrélation rotationnel. Avant de faire des mesures au sein de la plume électrospray, une première démonstration de ce concept sera établie en solution avec un cas d'étude simple : la dénaturation d'une protéine « modèle » par un solvant organique, le Méthanol. Pour cela, nous décrirons un protocole permettant le greffage d'un chromophore sur une protéine afin de sonder la dynamique d'une protéine en solution à l'échelle moléculaire.

4.1 Des édifices biomoléculaires complexes : Les Protéines

Les protéines sont des biomolécules présentes dans toutes les cellules vivantes dont la structure définit leur fonction biologique par leur capacité à se lier de manière spécifique à d'autres molécules. Ce sont elles qui assurent un grand nombre de fonctions biologiques. L'étude de leur structure constitue donc un élément clé pour la compréhension du fonctionnement cellulaire. En solution, la structuration d'une protéine peut être déterminée par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire [3] ou par dichroïsme circulaire [4]. Pour certaines espèces en environnement contrôlé, la cristallographie moléculaire par diffraction des rayons X [5] est également une technique répandue en biologie structurale mais de grandes quantités d'échantillon sont nécessaires pour ces types de techniques rendant ces analyses difficiles ou coûteuses. En phase gazeuse, l'étude de leur structure peut se faire par spectrométrie de masse [6], [7] ou par spectrométrie de mobilité ionique [8], [9]. De cette façon, cette étude est bien plus aisée puisque l'édifice biomoléculaire est en environnement isolé ce qui permet de nous débarrasser des interférences générées par les interactions avec le solvant ou les autres molécules présentes en solution. De plus, peu d'échantillon est nécessaire.

Cependant, la structure conformationnelle de la protéine peut être altérée lors de son passage de la solution vers la phase gazeuse [10]. Toute interprétation sur sa fonction biologique peut être caduque. Même si l'ionisation par électrospray est un procédé d'ionisation doux, les analytes étudiés en phase gazeuse sont soumis à des changements drastiques de leur environnement local. L'évaporation rapide de microgouttelettes chargées induit des modifications physico-chimiques brutales à l'échelle macroscopique comme le pH, la composition du solvant ou la température, mais aussi à l'échelle moléculaire sur les analytes.

L'objectif de ce paragraphe n'est pas d'avoir une description avancée de la biochimie des protéines mais de définir les éléments nécessaires à la bonne compréhension des mécanismes pour une étude conformationnelle. En particulier nous verrons qu'une protéine peut être considérée comme un biopolymère complexe qui peut voir sa conformation modifiée. Ensuite, nous détaillerons rapidement certaines techniques de diagnostics conformationnels basés sur des mesures de spectrométrie de masse pour aller vers un couplage entre spectrométrie de masse et fluorescence pour la spectrométrie native.

4.1.1 Structures et Conformations des protéines

Les protéines (Table 4.1) sont des molécules complexes formées d'une chaîne de « briques élémentaires » : les acides aminés (ou résidus) [11]. L'enchaînement de ces acides aminés est assuré par des liaisons peptidiques. On parle alors de chaîne polypeptidique lorsque la chaîne contient entre 10 et 100 acides aminés. Au-dessus de 100 acides aminés, on parle généralement de protéine. Il existe une très grande variété de protéines de taille allant de quelques dizaines à quelques dizaines de milliers de résidus dont le rôle biologique est bien défini. Par exemple, les protéines enzymatiques assurent la catalyse des réactions chimiques de synthèse ou de dégradation nécessaire au métabolisme de la cellule alors que d'autres sont impliquées dans la régulation de l'expression génique. Une modification de leur structure peut alors induire une défaillance de leur fonction biologique. Ces défaillances se traduisent souvent par l'expression de maladies aussi nombreuses que graves telles que les maladies génétiques à prion, ou encore certaines maladies neurodégénératives de type Alzheimer ou Parkinson [12], [13].

Structure Primaire

Il existe 20 acides aminés différents. La structure primaire d'une protéine est définie par sa séquence peptidique : c'est l'ordre d'enchaînement des acides aminés qui se succèdent de façon linéaire. La séquence peptidique est représentée par une suite d'acides aminés symbolisés par une lettre sans référence à une quelconque configuration spatiale. Il est important de noter que certains de ces résidus comme le Tryptophane possèdent un cycle aromatique et présentent un certain nombre de propriétés optiques intéressantes. En particulier, ces résidus absorbent les rayonnements UV et peuvent être fluorescents [14], [15].

Structure Secondaire

La structure secondaire d'une protéine est une description spatiale de la configuration adoptée localement par un segment d'une chaîne peptidique. Elle est définie par les arrangements tridimensionnels des liaisons entre acides aminés permettant d'être dans une configuration locale énergétiquement favorable. Il existe trois catégories de structure secondaire commune : l'hélice

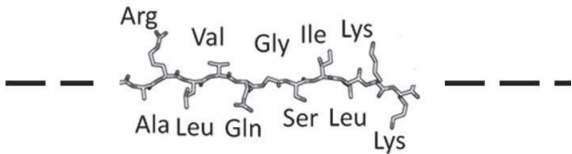

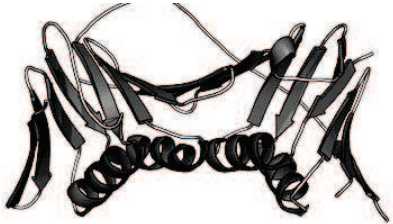
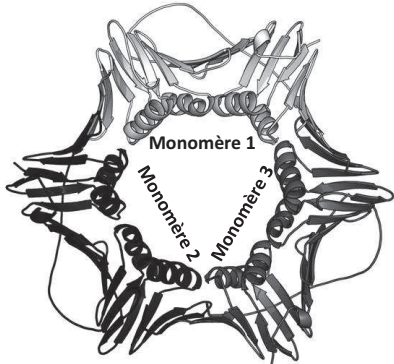
alpha, le feuillet bêta et le coude. L'hélice alpha est une structure compacte représentant un enroulement hélicoïdal périodique autour d'un axe. Le feuillet bêta est une structure où les acides aminés voisins forment un plan périodique étendu. Enfin, les coudes ne sont pas une structure périodique, mais un repliement particulier du squelette de la protéine localisé sur 3 ou 4 résidus consécutifs.

Le dichroïsme circulaire est une méthode de spectroscopie adaptée pour déterminer la structure secondaire d'une protéine. En effet, le caractère chiral des acides aminés les rend optiquement actifs : l'absorption de la lumière sera différente selon si la polarisation de la lumière est circulaire droite ou circulaire gauche. Une structure en hélice alpha présentera une réponse en dichroïsme circulaire différente d'un feuillet bêta ou d'un coude. Donc connaissant la réponse spectrale de chaque type de structure dans la bande d'absorption de la protéine, nous pouvons déterminer en proportion, la présence de structures type hélice alpha, feuillet bêta, de coudes ou si la structure est désordonnée.

Structure Tertiaire

La structure tertiaire d'une protéine est la forme générale de la protéine : elle correspond au repliement global des chaînes peptidiques entre elles dans un espace tridimensionnel. C'est la structure tertiaire d'une protéine qui va définir sa fonction biologique. Généralement, on dit qu'une protéine est dans sa « structure native » lorsqu'elle est dans la conformation la plus stable thermodynamiquement en milieu biologique. La structure tertiaire est stabilisée par un ensemble d'interactions fortes (des liaisons covalentes telles que les ponts disulfure) ou faibles (liaisons hydrogènes, forces coulombiennes attractives ou répulsives, interactions hydrophobes...). Les protéines ne sont pas des molécules rigides si bien que leur conformation peut varier lorsque les interactions maintenant la protéine dans sa conformation native sont modifiées : on dit que la protéine est dénaturée.

Table 4.1 : Structure des protéines.

	<p>Structure Primaire : séquence des acides aminés</p>
	<p>Structure Secondaire : configuration locale comme (1) l'hélice alpha ou (2) le feuillet bêta</p>
	<p>Structure tertiaire : le repliement global des chaînes peptidiques entre elles dans un espace tridimensionnel</p>
	<p>Structure Quaternaire : les protéines qui contiennent plus d'une chaîne polypeptidique présentent un niveau supplémentaire d'organisation</p>

4.1.2 Diagnostic de la conformation d'une protéine par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique spectrométrique d'analyse en phase gazeuse permettant de disperser des ions selon leur rapport masse sur charge (m/z). Cette technique est largement utilisée pour l'identification de protéines. En effet, les protéines sont des édifices moléculaires multichargés, si bien qu'avec une gamme de détection en m/z limitée de 100 à 3000 par exemple, l'analyse de molécules allant de mille à plusieurs dizaines de milliers de Dalton (Da) est possible. La distribution des états de charge d'une protéine peut indirectement nous donner une information sur sa conformation spatiale [16]. En effet, pour une protéine donnée, si son état de charge est élevé, cela signifie qu'en moyenne la protéine est plus chargée électriquement. Par répulsion coulombienne, les charges de la protéine auront tendance à

s'éloigner induisant une ouverture de la protéine : on dit alors que la protéine se déplie. Inversement, les protéines qui ont gardé leur structure native ou globulaire seront moins chargées. Ainsi, à partir d'une même espèce, nous pouvons obtenir deux spectres de masse différents suivant la conformation de la protéine (Figure 4.2).

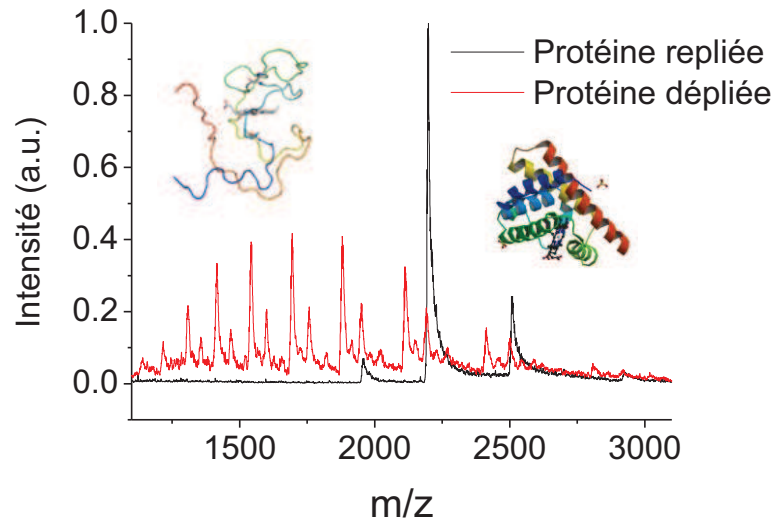


Figure 4.2: Spectres de masse d'une même protéine dans un état natif (noir) et dans un état dénaturé (rouge). La protéine utilisée pour illustrer ce propos est la Myoglobine dans une solution aqueuse tampon (PBS à 10 mM) pour l'état natif, et la Myoglobine dans un mélange d'eau/Méthanol (20:80) pour l'état dénaturé).

Le dépliement d'une protéine en solution par l'ajout de dénaturant organique [17], [18] ou par dénaturation thermique [19], [20], [21] a ainsi pu être diagnostiqué en phase gazeuse en spectrométrie de masse par ionisation par électrospray. Néanmoins, le processus d'ionisation par électrospray lui-même peut induire des modifications de conformation. En effet, McLuckey *et al.* [22], [23] montrent que l'exposition des gouttelettes chargées à un gaz dénaturant contenant des protéines initialement dans leur état natif peut influencer leur état de charge. Un dépliement de la protéine au sein même des microgouttelettes est donc possible [24].

Le groupe d'E.R. Williams [25] a également montré qu'un repliement de la protéine dans la gouttelette était également réalisable. En effet, l'utilisation d'un système permettant le mélange de deux solvants lors du mécanisme d'ionisation par électrospray a montré qu'une protéine initialement dénaturée (d'état de charge élevé) en solution pouvait retrouver une configuration « repliée » (état de charge faible) durant le processus d'électrospray grâce au mélange avec une solution aqueuse tampon favorable à l'état natif de la protéine (Figure 4.3– Non disponible dans

la version expurgée). Compte tenu de ces résultats, il est nécessaire d'avoir une information sur l'évolution de la conformation d'une protéine au sein même de la gouttelette si nous souhaitons pouvoir corrélérer de façon efficace l'état de charge de la protéine en phase gazeuse avec sa conformation en solution.

Figure 4.3: Schéma de principe montrant le repliement de la protéine au sein des gouttelettes de l'électrospray démontré par le groupe d'E.R. Williams [25].

4.1.3 Couplage entre spectrométrie de masse et mobilité ionique : vers la spectrométrie de masse native

Pour aller vers la spectrométrie de masse native, se pose la question suivante : est-ce qu'il est possible de conserver la conformation native d'une protéine en phase gazeuse ? Le développement technologique des nano-électrosprays et l'utilisation de solutions tampons appropriées ont démontré que oui. En effet, le contrôle de la conformation d'une protéine par mobilité ionique, générée par nano-électrospray et détectée par spectrométrie de masse a permis d'étudier des complexes moléculaires de très grande taille en phase gazeuse ayant conservé leur structure fonctionnelle, faisant du couplage entre spectrométrie de masse et mobilité ionique un outil performant pour la biologie structurale. En particulier, le groupe de C.V. Robinson [26] a décrit un protocole d'ionisation basé sur un couplage entre spectrométrie de masse et mobilité ionique afin de générer un complexe protéique de très grande taille : le TaHSP16.9 (*Small Heat-*

Shock Protein) en phase gazeuse (Figure 4.4– Non disponible dans la version expurgée). Ce complexe forme une protéine chaperon, c'est une protéine composée de plusieurs monomères structurés. La détection prédominante de dodécamère (un ensemble de 12 monomères) confirme que la structure de cet édifice biomoléculaire de grande taille a été conservée en phase gazeuse.

Figure 4.4 . Représentation multidimensionnelle du spectre de masse et du spectre de mobilité ionique du complexe protéique. Les pics du spectre sont attribués au dodécamère TaHSP16.9 (202.8 kDa) [26]. En insert, la structure de la protéine (Small Heat-Shock Protein), réimprimée depuis Protein Data Bank (réf: 1SHS).

Une spectrométrie de masse native peut donc être réalisée, cependant, dans des « conditions standards » d'analyse, le dépliement partiel des protéines générées en phase gazeuse reste une problématique importante. Les technologies micro-électrosprays et l'utilisation de solvants classiques du type eau/Méthanol induisent des modifications physico-chimiques complexes intrinsèques au processus électrospray. La structure d'une espèce en solution et celle en phase gazeuse représentent les deux extrêmes de degré de solvation. Avoir une information de sa structure dans un degré de solvation intermédiaire pourrait mieux définir le rôle du solvant dans la conformation des protéines. Le besoin d'une mesure *in situ* pendant le processus de désolvation vient donc de façon naturelle.

4.1.3 Couplage entre spectroscopie optique, plume électrospray et spectrométrie de masse.

Des techniques d'analyse basées sur des méthodes de fluorescence peuvent être utilisées pour sonder les propriétés conformationnelles des analytes à l'échelle moléculaire [27]. Cette approche a été démontrée par deux groupes de recherches pionniers. Le groupe de Clemmer [28] a mesuré l'émission du résidu Tryptophane naturellement présent dans la Cytochrome C afin de sonder la conformation de cette protéine. En effet, dans sa conformation native, la fluorescence du résidu Tryptophane est annihilée par la proximité du groupement Hème par transfert résonnant d'énergie (FRET). Cependant lorsque la protéine se déplie, la distance effective entre le Tryptophane et ce groupement moléculaire augmente ce qui induit une augmentation de la fluorescence du Tryptophane. La dynamique du dépliement de la protéine au sein de la plume de l'électrospray est alors donnée par l'intensité de fluorescence du résidu Tryptophane. Il est alors montré que le Cytochrome C passe de sa forme compact (non-fluorescente) en début de plume à une conformation étendue (fluorescent) en fin de plume, montrant ainsi pour la première fois une mesure *in situ* d'un changement conformationnel d'une protéine durant le processus d'ionisation par électrospray. Le groupe de Parks [29] a également utilisé la fluorescence du résidu Tryptophane de la cytochrome C afin de comparer son dépliement au sein de la plume de l'électrospray avec son dépliement en solution. Il est alors reporté que la dénaturation du Cytochrome C par l'introduction d'un composé organique dénaturant, le Méthanol, est moins importante dans l'électrospray qu'en solution suggérant ainsi une influence de l'interface air/solvant sur la protéine au sein de l'électrospray. Plus récemment, Zenobi *et al.* ont utilisé une protéine naturellement fluorescente dans le visible : la rGFP (*recombinant Green Fluorescent Protein*) afin de démontrer que la protéine pouvait conserver sa fonction biologique - la fluorescence - au sein de la plume de l'électrospray mais que cette fonction était perdue après désolvatation complète (Figure 4.5– Non disponible dans la version expurgée).

Figure 4.5: (gauche) Spectre d'émission de la rGFP dans une plume électrospray mesurée à différente position du spray. (droite) Spectre de fluorescence collecté depuis des ions rGFP isolés en phase gazeuse dans le piège d'un spectromètre de masse à résonance cyclonique ionique (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance – FT ICR mass spectrometer) [54].

4.2 L'anisotropie de fluorescence comme sonde conformationnelle.

L'influence du Méthanol

Le développement de méthodes versatiles pour le suivi de changement conformationnel des protéines en cours de désolvatation est très intense. Dans ce paragraphe, nous allons tenter de valider une technique basée sur l'anisotropie de fluorescence comme sonde conformationnelle en solution pouvant être transposée à l'étude *in situ* des modifications structurelles des protéines dans des gouttelettes chargées générées par électrospray.

Nous avons concentré notre étude sur une protéine globulaire connue et déjà bien caractérisée : la Myoglobine. La caractérisation du dépliement de cette protéine a déjà pu être faite selon deux approches. D'une part, tout comme le Cytochrome C, la Myoglobine possède dans son état natif un groupement Hème non-covalent. La fluorescence des résidus Tryptophanes de la Myoglobine est alors annihilée par la proximité du groupement Hème par transfert résonnant d'énergie (FRET) lorsque la protéine est dans son état natif. La fluorescence intrinsèque de la Myoglobine est donc utilisée comme sonde de sa conformation : une augmentation de la distance effective entre les Tryptophanes et l'Hème induit une augmentation de la fluorescence de la Myoglobine, signature caractéristique du dépliement de la protéine [30], [31]. D'autre part, l'absorption de ce groupement Hème est également un bon indicateur de la dénaturation de la Myoglobine (Figure 4.6– Non disponible dans la version expurgée). En effet, la dénaturation de la Myoglobine par du Chlorure de Guanidinium a également pu être suivie grâce à la bande d'absorption du groupement Hème, aussi appelée « bande de Soret ». L'ouverture de la protéine libère le groupement Hème, hautement absorbant, diminuant ainsi l'intensité de l'absorption de la bande de Soret de la Myoglobine [32].

Les modifications des propriétés d'absorption de la protéine par la perte d'intensité de la bande de Soret est une technique efficace pour démontrer le dépliement de la structure d'une protéine. Néanmoins cette méthode d'analyse n'est pas versatile puisqu'elle n'est disponible que pour les protéines possédant déjà un groupement Hème, ce qui limite grandement son champ d'application. La fluorescence des résidus Tryptophanes peut également soulever de nombreux problèmes d'analyse : si plusieurs résidus aromatiques sont présents dans une même protéine, leurs interactions peuvent limiter notre capacité d'analyse (par auto-désexcitation par exemple).

L'utilisation de mutants, onéreux, peut être nécessaire. Ce sont des protéines dont un acide aminé a été remplacé par un autre. De plus, la détection de la fluorescence des chromophores intrinsèques aux protéines n'est pas triviale expérimentalement puisque les bandes d'absorption et d'émission des acides aminés fluorescents se situent dans l'UV. Par exemple, pour le Tryptophane, $\lambda_{abs} = 280 \text{ nm}$ et $\lambda_{emis} \sim 308 \text{ nm}$. Les instruments nécessaires pour l'excitation et la détection dans l'UV sont plus contraignants à mettre en place.

Figure 4.6: (gauche) Absorption de la Myoglobine à 409 nm (bande de Soret) et (droite) Fluorescence de la Myoglobine à 355 nm en fonction de la concentration en Chlorure de Guanidinium en présence de solution Ionique Liquide. La diminution de l'absorption est attribuée à une libération de l'Hème. L'augmentation de la fluorescence des résidus Tryptophanes de la Myoglobine est attribuée à une diminution de l'efficacité du FRET entre l'Hème et les Tryptophanes [32].

On propose donc une technique versatile basée sur notre expertise des chromophores Rhodamines : l'utilisation d'un chromophore extrinsèque (en opposition aux chromophores intrinsèques, type hème ou résidu tryptophane) est envisagée pour l'analyse conformationnelle de la protéine. Une technique de greffage de la protéine par liaison covalente avec la Rhodamine B Isothiocyanate est alors reportée. Nous avons caractérisé l'influence de ce greffage sur la structure de la Myoglobine. De plus, cette greffe permet une mesure de l'anisotropie de fluorescence du complexe chromophore – protéine dans le visible.

L'anisotropie de fluorescence est une propriété permettant de déterminer le temps de corrélation rotationnel d'un système fluorescent. Les équations de Perrin sont dérivées pour un objet sphérique de volume V (Equation 4.2). Cependant, nous pouvons définir un rayon hydrodynamique r_h comme étant le rayon apparent d'une sphère équivalente en rotation (Figure

4.7). En général, les protéines ne sont pas sphériques, mais certaines sont dites globulaires : dans leur état natif, elles peuvent être assimilées à une sphère. Une modification de la dimension ou de la forme de cette sphère due à un dépliement partiel de la protéine vient modifier son rayon hydrodynamique, ce qui impacte la valeur de son anisotropie de fluorescence. C'est une technique d'analyse par méthode optique qui peut être utilisée comme sonde pour la caractérisation de la dynamique de protéines [33], [34], des membranes [35] ou encore afin de mesurer des interactions protéine-protéine [36]. Nous avons alors étudié l'influence du Méthanol sur ce complexe afin de pouvoir sonder le dépliement de la protéine par anisotropie de fluorescence en passant d'un état « contraint » vers un état « libre » de la rotation du chromophore attaché de façon covalente à la protéine.

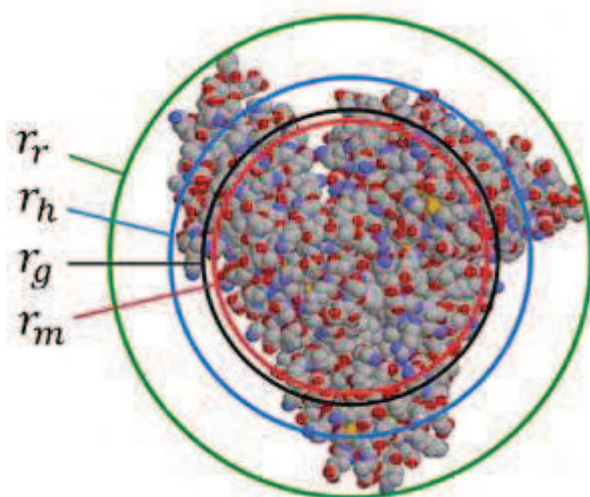
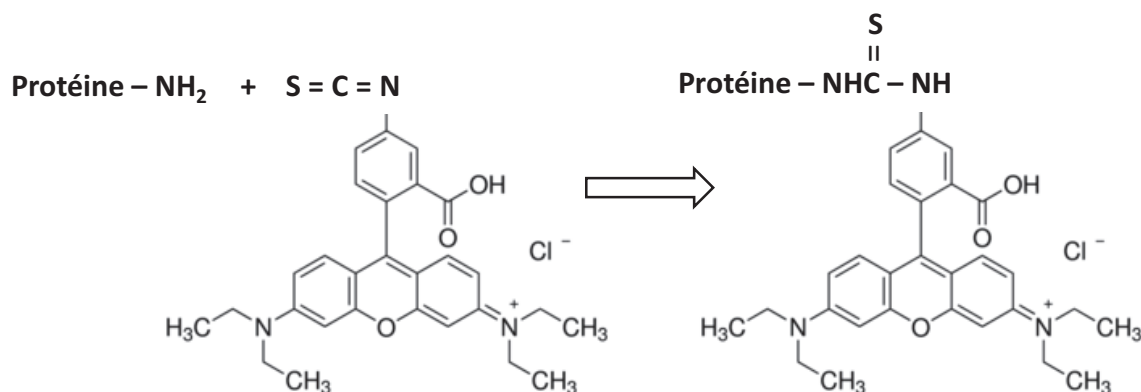


Figure 4.7: Représentation des différents types de rayons caractéristiques décrivant la dimension d'une protéine :

- r_r est le rayon de rotation – rayon de la sphérique circonscrite à la protéine.
- r_h le rayon hydrodynamique – rayon d'une sphère équivalente en rotation en prenant en compte les effets de solvation et de forme.
- r_g le rayon de giration – $r_g^2 = \frac{\sum m_i r_i^2}{\sum m_i}$ avec m_i la masse de l' $i^{\text{ème}}$ atome situé à une distance r_i du centre de masse de la protéine
- r_m le rayon de masse – rayon d'une sphère hypothétique de masse et de densité identique à la protéine.

4.2.1 Synthèse de la Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate

La Myoglobine est une protéine de 154 acides aminés (~17kDa) présente dans les muscles chez les vertébrés. Sa fonction biologique principale est le stockage de l'Oxygène par l'intermédiaire d'un groupement moléculaire contenant du fer et maintenu au centre de la protéine par des liaisons non-covalentes : l'Hème [5]. Si l'Hème est lié à la Myoglobine, on parle d'Holo-Myoglobine. Si la Myoglobine ne possède plus son groupement Hème, on parle d'Apo-Myoglobine. Dans le cadre de cette étude, la Myoglobine a été marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate selon un protocole de Hungerford *et al.* [37] que nous avons légèrement modifié. Typiquement, 34 mg de Myoglobine (Sigma-Aldrich) et 11 mg de Rhodamine B Isothiocyanate (Sigma-Aldrich) ont été dissous dans 10 mL d'une solution tampon de bicarbonate de sodium à 0.1 M de pH 9. Une agitation constante à température ambiante est maintenue pendant deux heures. La réaction associée au greffage de la Rhodamine B Isothiocyanate sur la protéine est donnée par [38] :



Sous sa forme native, la Myoglobine est une protéine globulaire ayant plusieurs groupements réactifs aminés (NH_2) [5]. La séquence peptidique de la Myoglobine ainsi que la représentation 3D (sous sa forme Holo-Myoglobine) sont données en [Figure 4.8](#). Les masses des réactifs ont été choisies de telle sorte que le ratio entre le nombre de chromophores et le nombre de protéines soit de 1 environ afin d'éviter un marquage excessif de la protéine. En effet, si le ratio chromophore sur protéine est plus grand que 1, des interactions importantes entre les chromophores greffés sur une même protéine peuvent se produire induisant une modification de la mesure de l'anisotropie de fluorescence [37]. En effet la protéine présente en surface de nombreux sites NH_2 (comme les

résidus Arginine ou Lysine) (Figure 4.8) pouvant donner lieu à une liaison covalente avec la Rhodamine B Isothiocyanate.

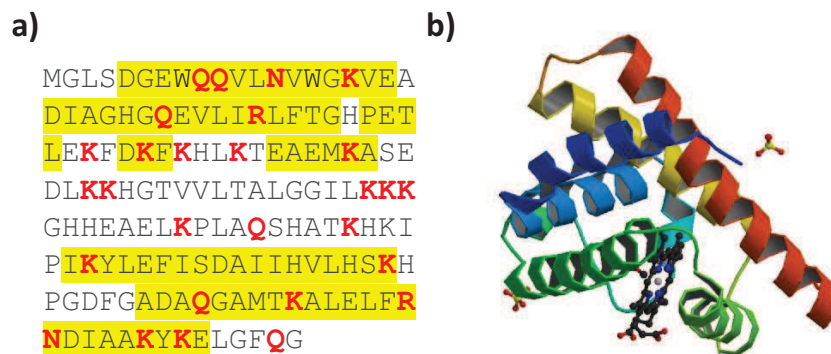


Figure 4.8: a) Séquence de la Myoglobine. Les résidus contenant un groupe amine sont notés en rouge et les structures secondaires en hélice alpha sont surlignées en jaune. b) Vue 3D de la Myoglobine, réimprimée depuis Protein Data Bank (réf : 5CMV).

Afin de séparer les complexes synthétisés des réactifs fluorescents n'ayant pas réagi, la solution a été dialysée. Des membranes de cellulose de 23 mm ayant un point de coupure supérieur à 6k Da (ZelluTrans/Roth) ont été utilisées. Les 10 mL de la solution sont dialysés dans 2L de solution tampon phosphate salin (PBS) de pH 7 à 10 mM pendant 1 jour. Plusieurs cycles de dialyse sont réalisés jusqu'à ce que l'absorption à 555 nm du surnageant (correspondant à la bande d'absorption de la Rhodamine B Isothiocyanate dans le PBS) soit en dessous de la limite de détection de notre appareil. Le produit de la synthèse est ensuite récupérée tel quel dans le tampon PBS comme solution mère. La concentration en protéine de la solution mère est évaluée à $c_{mère} \sim 200 \mu M$ et est diluée par 10 pour des mesures de fluorescence.

4.2.2 Caractérisation du système Chromophore – Protéine

Par Absorption

Les spectres d'absorption de la Myoglobine, de la Rhodamine B Isothiocyanate et de la solution du complexe mesurés immédiatement après la dernière dialyse sont donnés en Figure 4.9.

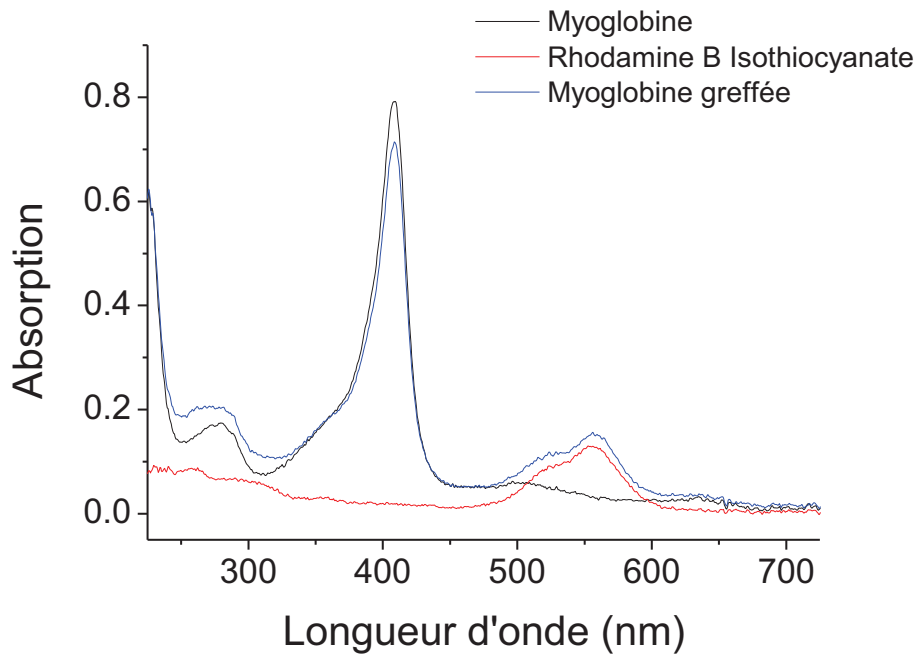


Figure 4.9: Spectre d'absorption de (noir) la Myoglobine, (rouge) la Rhodamine B Isothiocyanate et (bleu) de la solution de complexe de Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate dans une solution aqueuse tampon (PBS à 10 mM).

La bande de Soret à 408 nm caractéristique du groupement Hème de la Myoglobine est bien visible. L'existence de la bande d'absorption de la Rhodamine B Isothiocyanate à 555 nm dans la solution du complexe montre clairement que le greffage s'est produit. De plus, grâce à la connaissance des coefficients d'absorption molaire respectifs de la Myoglobine (à travers la bande de Soret) à 408 nm et de la Rhodamine B Isothiocyanate à 555 nm (respectivement $\epsilon_{408} = 188000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [39] et $\epsilon_{555} = 106000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [40]), nous pouvons calculer le nombre de chromophores greffés sur le nombre de protéines présentes par ratiométrie :

$$\frac{c_{\text{chromophore}}}{c_{\text{protéine}}} = \frac{A_{555}\epsilon_{408}}{A_{408}\epsilon_{555}} = \frac{0.15 \times 188000}{0.71 \times 106000} \sim \frac{1}{3} \quad (4.3)$$

On estime alors qu'en moyenne une protéine sur trois a été greffée par un unique chromophore.

Par Spectrométrie de Masse

Le spectre de masse de la solution de complexe dans le tampon PBS (Figure 4.10) a été mesuré (LTQ, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Le poids moléculaire moyen de la Myoglobine (sous sa forme Apo-Myoglobine) est de 16951.5 Da et la masse du groupement Hème est de 616.2 Da [Greg W. Kilby, *Noncovalently Associated Complexes: Apomyoglobin and Myoglobin Studies Using the HPLC-Chip/MS System Coupled with ESI-TOF Mass Spectrometry, Applications Scientist Agilent Technologies, Little Falls, Delaware, USA*]. Les pics caractéristiques de l'Holo-Myoglobine avec une distribution d'états de charge faible (notés $^{\text{h}9+}$, $^{\text{h}8+}$ et $^{\text{h}7+}$) sont clairement prédominants. Cependant, les pics de la protéine greffée par un chromophore sont également visibles avec la même distribution d'états de charge (la masse de la Rhodamine B Isothiocyanate est de 500.6 Da). Le ratio entre le nombre de protéines greffées et le nombre de protéines non greffées ne peut pas être trivialement déterminé quantitativement par spectrométrie de masse ; cependant, pour l'état de charge $^{\text{h}9+}$, nous pouvons estimer par intégration du spectre de masse que le rapport entre l'aire du pic caractéristique de la Myoglobine greffée par la Rhodamine B Isothiocyanate et l'aire du pic de la Myoglobine non-greffé est de 0.31. Pour l'état de charge $^{\text{h}8+}$, ce rapport tombe à 0.14. Pour l'état de charge $^{\text{h}7+}$, le pic de la Myoglobine greffée par la Rhodamine B Isothiocyanate n'est plus visible. Malgré tout, ces résultats sont en accord qualitatif avec les mesures par ratiométrie en absorption : un greffage de la Rhodamine B Isothiocyanate par liaison covalente sur la Myoglobine s'est produit, et il n'y a pas plus d'un chromophore par protéine greffée.

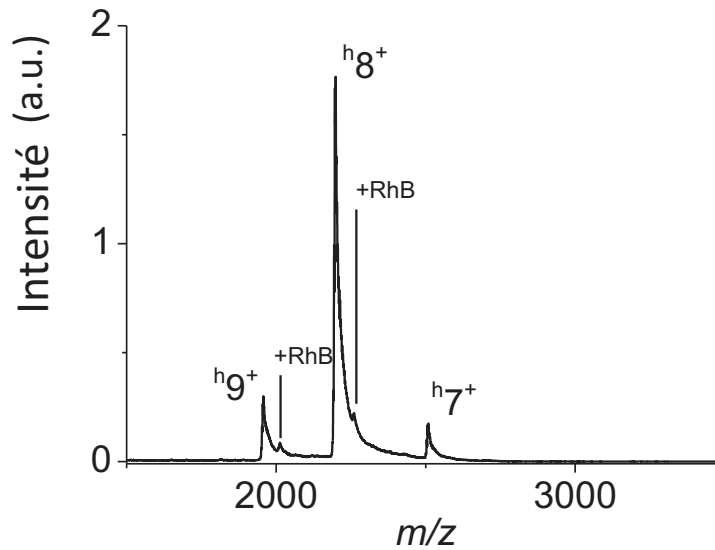


Figure 4.10: Spectre de masse de la solution de complexe dans le tampon PBS. La masse de l'Holo-Myoglobine est de 17567.7 Da. La présence du complexe Holo-Myoglobine + Rhodamine B Isothiocyanate (masse ~18067 Da) est visible dans les états de charge 9^+ et 8^+ .

Par dichroïsme Circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire de la Myoglobine et de la Myoglobine greffée par la Rhodamine B Isothiocyanate sont donnés en Figure 4.11. Ces spectres ont été collectés par un spectromètre Chirascan qCD (Applied Photophysics) à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP, Lyon). La structure secondaire de ces deux systèmes a été déterminée via Dichroweb [41], [42], un logiciel d'analyse online pour les spectres de dichroïsme circulaire de protéines. Les proportions d'hélice alpha (70.6%), de feuillet bêta (3.6%), de coudes (7.7%) et de désordre (18.6%) dans la structure secondaire des deux systèmes sont identiques. Ces valeurs correspondent à une moyenne calculée à partir de trois méthodes d'analyse différentes : SELCON3, CONTIN et CDSSTR.

Les mesures de dichroïsme circulaire complétées par les mesures de spectrométrie de masse confirment que la présence du chromophore n'affecte pas la protéine, ni par rapport à sa structure secondaire ni par rapport à sa distribution des états de charge.

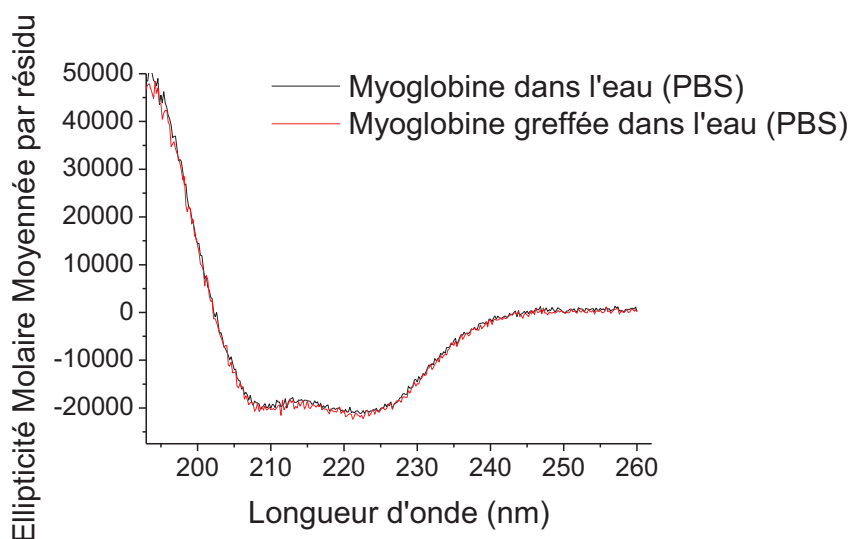


Figure 4.11: Spectre de dichroïsme circulaire de la Myoglobine et de la Myoglobine greffée en solution aqueuse (tampon PBS)

Durée de vie de Fluorescence

La durée de vie de la fluorescence de la Rhodamine B Isothiocyanate seule est comparée à celle du complexe en solution dans différents solvants (Table 4.2). Ces durées de vie ont été mesurées par le Spectrophotomètre Fluoromax-4 Horiba fluorescence à température ambiante.

Table 4.1: Durée de vie de la Rhodamine B Isothiocyanate seule et de la Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate dans différents mélanges de solvants eau (PBS) / Méthanol.

Vol. % en Méthanol	Durée de Vie (ns)	
	Rhodamine B Isothiocyanate	Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate
0	1.75 ± 0.05	1.73 ± 0.05
10	1.87 ± 0.05	1.88 ± 0.05
20	1.95 ± 0.05	1.98 ± 0.05
30	2.02 ± 0.05	2.04 ± 0.05

Ces mesures montrent que la durée de vie de fluorescence du chromophore reste inchangée lorsqu'il est greffé à la protéine. Le corps de la protéine ne semble pas affecter la durée de vie de la Rhodamine B Isothiocyanate. De plus, la durée de fluorescence mesurée diminue lorsque la proportion en eau augmente révélant le caractère solvatochromique de la Rhodamine B Isothiocyanate qui est désactivée par l'eau. Ces considérations sont favorables à un greffage du chromophore à la surface de la protéine.

Anisotropie de fluorescence

L'anisotropie de fluorescence statique à 532 nm de la Rhodamine B Isothiocyanate en solution tampon PBS à température ambiante est de $r = 0.046 \pm 0.005$ alors que pour le complexe chromophore – protéine, l'anisotropie de fluorescence est de $r = 0.199 \pm 0.005$. En effet, il est clair que le temps de corrélation rotationnel d'un chromophore seul est plus petit celui de la protéine (le chromophore est petit devant la taille de la protéine). Si on assimile la Myoglobine à une sphère solide, nous pouvons estimer grâce à l'équation de Perrin que le rayon hydrodynamique du système est de $r_h = 1.6 \pm 0.1 \text{ nm}$ en considérant une valeur de l'anisotropie de fluorescence limite $r_0 = 0.3$ et la viscosité de l'eau $\eta = 8.95 \times 10^{-4} \text{ Pa.s}$. Cette valeur est cohérente avec la littérature. En effet, historiquement, l'analyse tridimensionnelle de la Myoglobine par diffraction des rayons X décrit la Myoglobine comme un disque plat de 4.3 nm x 3.5 nm x 23 nm [5]. Plus récemment, des mesures de diffusion sur la Myoglobine estiment que le diamètre caractéristique de cette protéine est de 3.5 nm [43], [44].

4.2.3 Influence des différents paramètres sur l'anisotropie de fluorescence

D'après l'expression de l'équation de Perrin et l'expression du temps de corrélation rotationnel dérivée par Stokes et Einstein, l'anisotropie de fluorescence est principalement affectée par les paramètres physiques suivant :

- (i) La température est un paramètre clé par son influence sur le mouvement Brownien. Plus la température est élevée, plus le mouvement des objets est grand, ce qui génère une diminution de l'anisotropie de fluorescence.

- (ii) La dimension de l'objet fluorescent influence également l'anisotropie de fluorescence. Plus l'objet est grand, plus sa rotation sera lente par inertie, ce qui se traduit par une augmentation de l'anisotropie de fluorescence
- (iii) Une grande viscosité du solvant va tendre à diminuer la vitesse de rotation de l'objet, ce qui va induire une augmentation de l'anisotropie.
- (iv) La durée de vie de fluorescence est aussi un élément déterminant dans ce procédé de dépolarisation : plus la durée de vie est grande, plus le chromophore aura le temps de tourner avant d'émettre un photon si bien que l'anisotropie de fluorescence sera petite, et inversement.

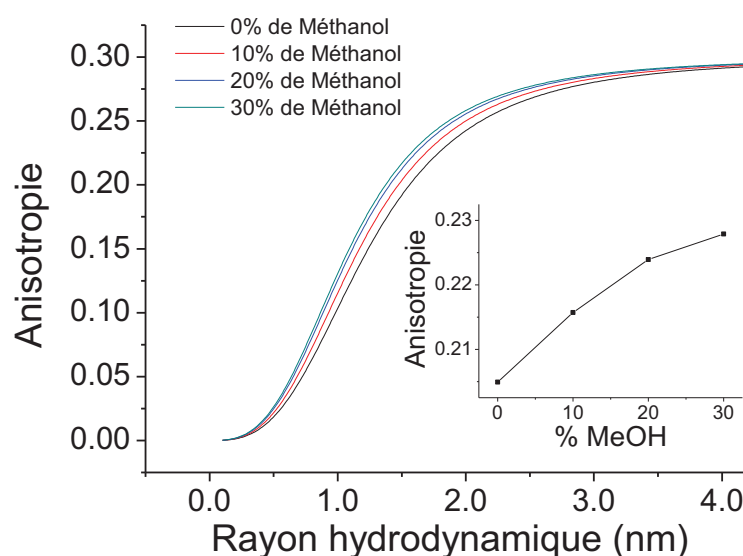


Figure 4.12: Calcul de l'anisotropie de fluorescence du système. En insert, l'anisotropie de fluorescence théorique en fonction de la proportion en Méthanol pour une taille donnée. Les valeurs de τ et de η ont été réévaluées [45] :

Pour 0% de Méthanol, $\tau = 1.73 \text{ ns}$, $\eta = 8.95 \times 10^{-4} \text{ Pa.s}$

Pour 10% de Méthanol, $\tau = 1.88 \text{ ns}$, $\eta = 11.55 \times 10^{-4} \text{ Pa.s}$

Pour 20% de Méthanol, $\tau = 1.97 \text{ ns}$, $\eta = 13.92 \times 10^{-4} \text{ Pa.s}$

Pour 30% de Méthanol, $\tau = 2.03 \text{ ns}$, $\eta = 15.40 \times 10^{-4} \text{ Pa.s}$

Nous pouvons donc calculer la prédiction de l'évolution de l'anisotropie de fluorescence de l'émission de la Rhodamine B Isothiocyanate en fonction de la taille du système en rotation (i.e. le rayon hydrodynamique) à température ambiante dans différents solvants composés d'un mélange d'eau et de Méthanol. Les Résultats sont donnés en [Figure 4.12](#) en prenant en compte

les modifications de la viscosité et de la durée de vie induites par des conditions de solvant différentes. On montre alors que pour une taille donnée, l'anisotropie de fluorescence du système a tendance à augmenter avec la proportion de Méthanol. En effet, l'accroissement de l'anisotropie de fluorescence induite par l'augmentation de la viscosité [45] contrebalance les pertes d'anisotropie dues à l'augmentation de la durée de vie.

4.2.4 Déplieement de la protéine sondée par anisotropie de fluorescence

Il est bien connu que les alcools, comme le Méthanol, sont des solvants qui affaiblissent les interactions hydrophobiques des protéines [46], [47], [48]. De l'affaiblissement de ces liaisons résulte une forte dénaturation de la protéine. Dans le but de sonder la dynamique de la protéine induite par l'addition de Méthanol, l'anisotropie de fluorescence de la Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate a été mesurée en fonction de la proportion en Méthanol et comparée à celle de la Rhodamine B Isothiocyanate seule en solution.

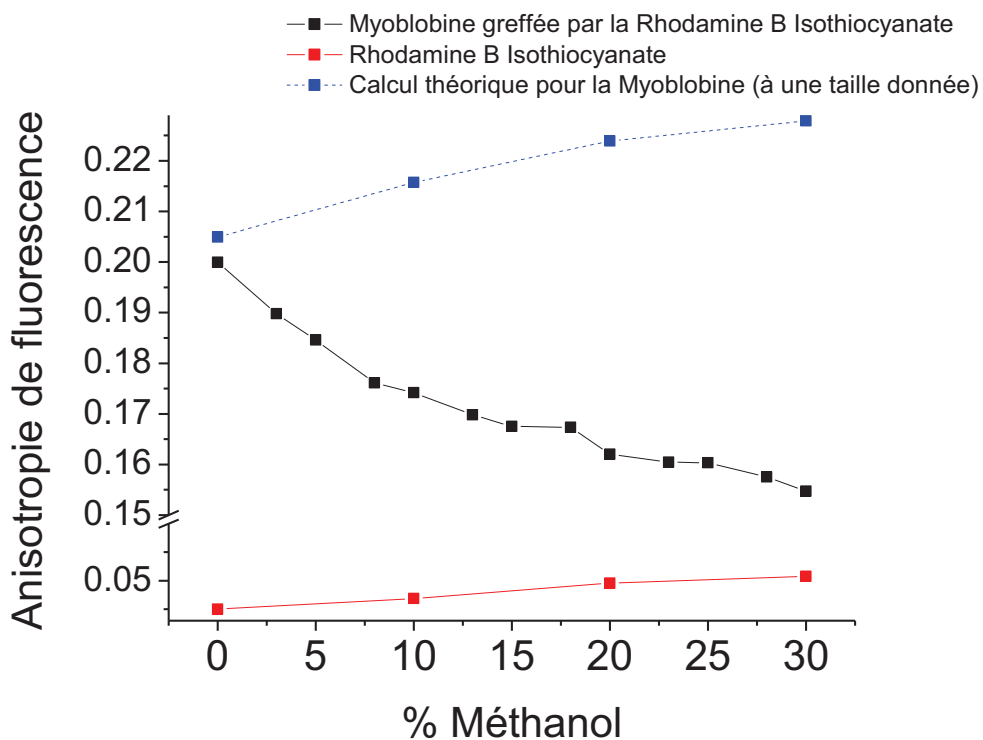


Figure 4.13: (noir) Anisotropie de fluorescence de la Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate. (rouge) Anisotropie de fluorescence de la Rhodamine B Isothiocyanate. (bleu) Calcul théorique pour la myoglobine (à volume et température constantes)

Les résultats indiquent clairement une dépolarisation de l'émission de fluorescence de la Myoglobine B marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate lorsque la proportion en Méthanol augmente (Figure 4.13). D'après la discussion précédente, une perte d'anisotropie de fluorescence ne peut être expliquée que par une réduction en taille de l'objet fluorescent. Cependant, cela est en contradiction avec des mesures de spectrométrie de mobilité ionique effectuées par sur la Myoglobine. En effet, pour chaque état de charge, il existe plusieurs conformations différentes. Une augmentation globale de la section efficace de la Myoglobine est reportée lorsque le solvant aqueux est remplacé par un mélange d'eau et de Méthanol [49].

Des mesures par spectrométrie de masse de la Myoglobine (Figure 4.14) montrent que la distribution des états de charge de la Myoglobine a tendance à augmenter avec la proportion de Méthanol, consistant avec un dépliement partiel de la protéine. De plus, la signature en masse de l'Apo-Myoglobine est observée. La présence de l'Apo-Myoglobine (notées $a8^+$ et $a7^+$) signifie qu'il y a eu libération du groupement Hème non-covalent ce qui est une signature caractéristique d'une ouverture partielle de la protéine.

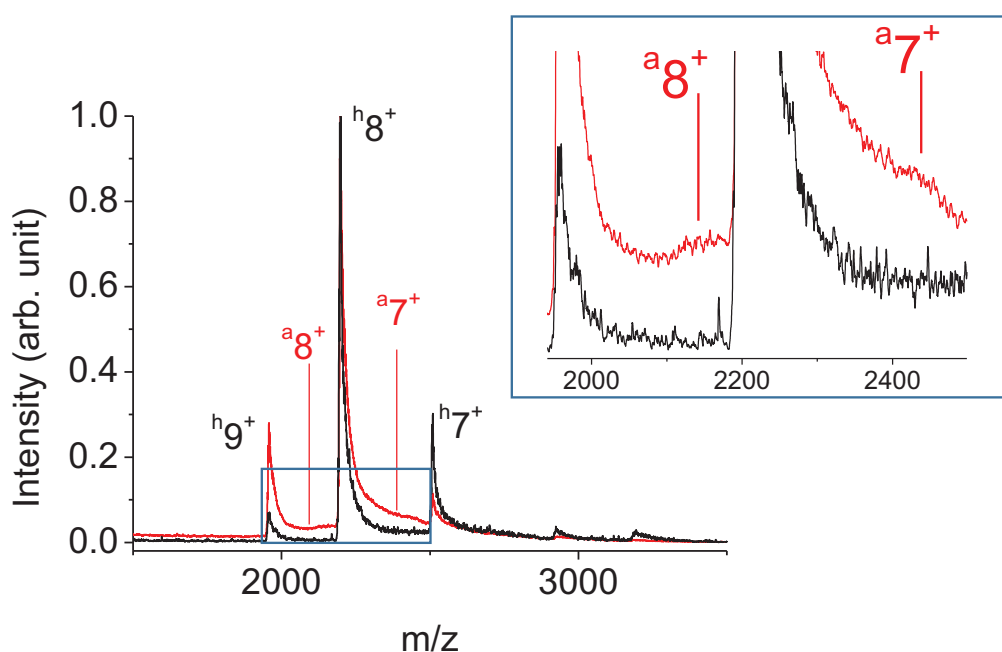


Figure 4.14: Spectre de masse de la Myoglobine initialement dans (noir) une solution aqueuse (tampon PBS) et (rouge) un mélange eau/Méthanol (70:30). En insert, un zoom mettant en évidence la présence des pics caractéristiques de l'Apo-Myoglobine (notées $a8^+$ et $a7^+$). Le pic de l'Hème (616.2 Da) n'est montré.

Enfin, l'ouverture partielle de la Myoglobine a été confirmée par dichroïsme circulaire : l'analyse des spectres de dichroïsme circulaire de la Myoglobine dans un mélange Eau (PBS) / Méthanol montre une altération partielle de la structure secondaire de la protéine (Figure 4.15 et Table 4.3). Cette altération est très importante lorsque la proportion en méthanol est grande (20% d'eau, 80% de Méthanol), mais elle est également bien détectable lorsque cette proportion est moindre (70% d'eau, 30% de Méthanol).

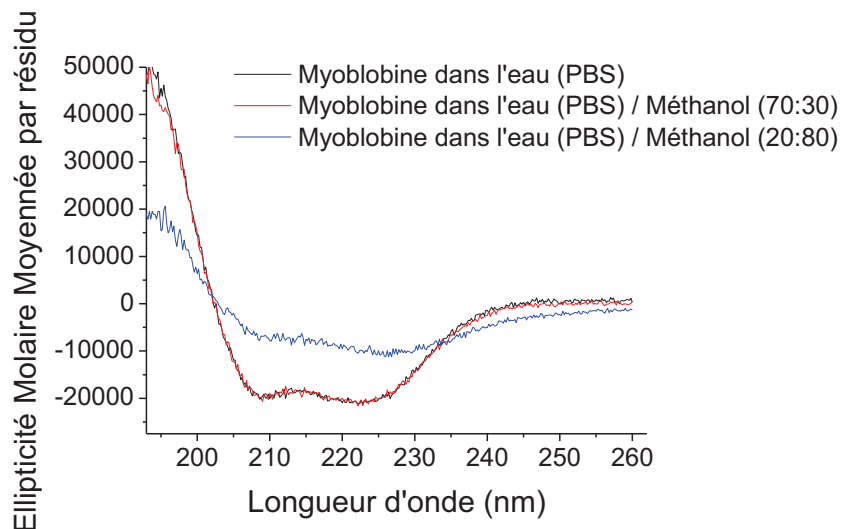


Figure 4.15: Spectre de dichroïsme circulaire de la Myoglobine dans différents solvants.

Table 4.2: Structure secondaire de la Myoglobine dans différents solvants.

	% Hélice Alpha	% Feuillet Bêta	% Coude	% Désordre
Dans l'eau (PBS)	70.4	3.6	7.7	18.6
Dans l'eau (PBS) / Méthanol (70 :30)	67	3.7	8.5	20.5
Dans l'eau (PBS) / Méthanol (20 :80)	36.4	17.3	17.4	28.4

Toutes ces considérations sont favorables à un dépliement partiel de la protéine induisant une augmentation de son rayon hydrodynamique. Si bien qu'une baisse de l'anisotropie de fluorescence ne peut être expliquée que par l'ouverture partielle de la protéine autorisant le chromophore à bouger librement et à tourner indépendamment de la protéine (Figure 4.16). [50].

Plusieurs modèles théoriques ont été développés dans la littérature afin de discuter de ces processus où la rotation indépendante du moment dipolaire d'émission (mouvement d'une chaîne peptidique de la protéine ou d'un chromophore greffé de façon covalente) est considérée [51], [52], [53]. Ce phénomène a déjà été observé lors de la dépolérisation de l'émission UV du Tryptophane. En effet, cette diminution a été attribuée à un dépliement de la protéine libérant le résidu du corps hydrophobe de la protéine autorisant le cycle aromatique du Tryptophane à tourner indépendamment de la protéine [33].

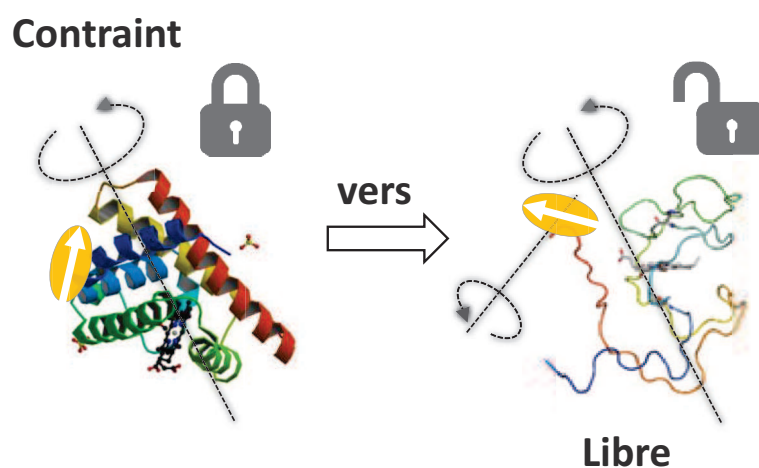


Figure 4.16: Représentation du concept justifiant la perte d'anisotropie de fluorescence. La transition d'un état « contraint » (à forte anisotropie) vers un état « libre » (à faible anisotropie) de la rotation du chromophore (ici symbolisé par une ellipse jaune) en mis en évidence.

Enfin, on peut noter que la valeur de l'anisotropie de fluorescence du système reste significativement plus élevée que celle du chromophore seul en solution. Cela est dû au fait que le chromophore reste attaché de façon covalente à la protéine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mené l'étude suivante ; pour détecter la « fuite » possible du chromophore induit par l'introduction du Méthanol, nous avons dialysé dans le PBS deux solutions de complexe de même concentration. La première est une solution de Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate dans le PBS et la seconde est une solution de Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate dans un mélange eau (PBS) / Méthanol. Après dialyse, les deux échantillons se retrouvent donc dans le même solvant (PBS) mais ont une histoire différente.

Les mesures du spectre d'absorption (Figure 4.17) de ces deux échantillons montrent que la bande d'absorption de la Rhodamine B Isothiocyanate reste inchangée : la concentration en chromophore après la dialyse n'a pas changé malgré la présence de Méthanol confirmant que le Méthanol n'a pas brisé la liaison entre le chromophore et la protéine. De plus, l'intensité de la bande de Soret a diminué en présence de Méthanol signifiant que quelques Myoglobines ont perdu leur groupement Hème par le dépliement partiel de la protéine.

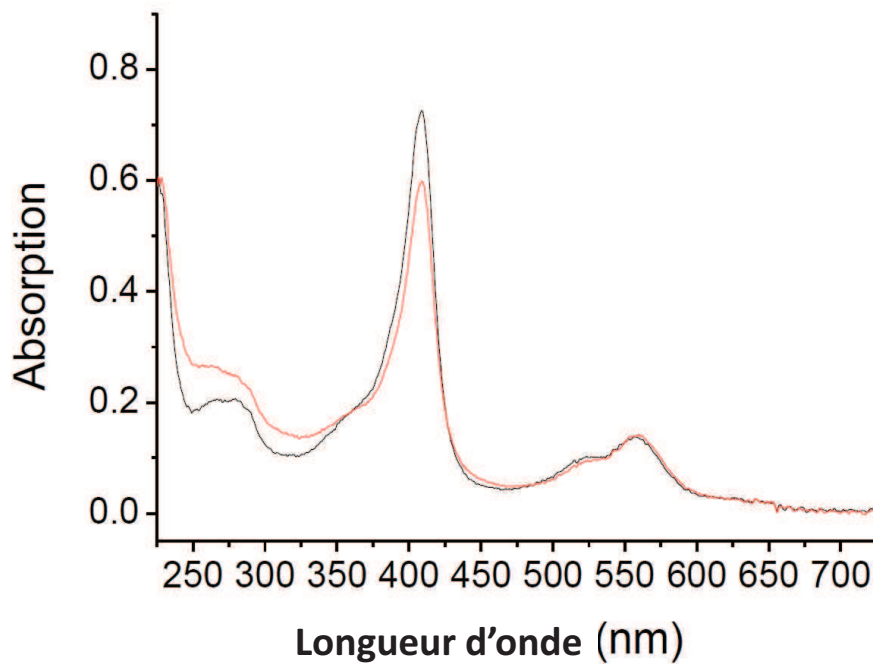


Figure 4.17: Spectre d'absorption dans un tampon PBS de (noir) la solution de Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate et de (rouge) la solution Myoglobine marquée par la Rhodamine B Isothiocyanate passée préalablement dans un mélange eau/Méthanol.

Conclusion et perspectives

Nous avons décrit une synthèse simple de greffage d'un chromophore organique sur une protéine. Une caractérisation optique complète de ce système a été menée à travers des mesures de spectroscopie en absorption dans le domaine visible, de spectrométrie de masse, de dichroïsme circulaire, de durée de vie et d'anisotropie de fluorescence. Il a été démontré qu'une seule Rhodamine B Isothiocyanate a été greffée sur la Myoglobine afin d'éviter toute interaction possible au sein d'une même protéine. De plus, aucun effet de la présence du chromophore sur la structure de la protéine n'a pu être détecté. Le dépliement de la protéine induit par un solvant organique dénaturant, le Méthanol, a pu être sondé par des mesures d'anisotropie de fluorescence. Ces changements conformationnels de la protéine ont été révélés par une transition d'un état « contraint » vers un état « libre » de la rotation du chromophore attaché de façon covalente à la protéine.

Cette étude menée en solution suggère qu'il serait possible d'utiliser les propriétés de chromophores extrinsèques afin d'obtenir des informations sur la dynamique des protéines, et plus spécifiquement sur des changements conformationnels des protéines dans des milieux atypiques. En particulier, ces mesures d'anisotropie de fluorescence sur des systèmes du type protéine-chromophore seraient directement importables pour l'étude de l'évolution de la conformation des protéines qui subissent une modification rapide de leurs propriétés de solvation dans les sources électrospray. C'est dans cette perspective que les premiers spectres de fluorescence d'une solution de Myoglobine greffée par la Rhodamine B Isothiocyanate ont été mesurés depuis la plume de l'électrospray générée par une source ESI Agilent Jet Stream (Figure 4.18).

Une mesure précise de l'anisotropie de fluorescence impose une stabilité absolue du signal pendant les mesures d'intensité selon les différents axes de polarisation (I_{VV} , I_{VH} , I_{HH} et I_{HV}). Autrement dit, pour chaque point du spray, il est nécessaire de mesurer quatre spectres de fluorescence selon des configurations de polarisation différentes et l'intensité de fluorescence totale ne doit pas varier pendant le temps d'acquisition. Cependant, les fluctuations du signal de fluorescence entre deux acquisitions distinctes (I_{VV} et I_{VH} par exemple) induites par la nature de l'électrospray sont trop grandes et peuvent mener à une valeur de l'anisotropie de fluorescence

absurde. Afin de résoudre ce problème, une stratégie doit être développée : la mesure simultanée du spectre de fluorescence selon une polarisation donnée et celle de l'intensité de fluorescence totale en fonction du temps pendant le temps d'acquisition permettrait d'évaluer les valeurs de I_{VV} , I_{VH} , I_{HH} et I_{HV} de façon relative en normalisant le spectre de fluorescence par l'intégrale de l'intensité de fluorescence totale, nous débarrassant ainsi de toute erreur liée à la fluctuation du signal. Ces modifications expérimentales sont en cours, et nous avons bon espoir de pouvoir réaliser des mesures d'anisotropie en spray prochainement.

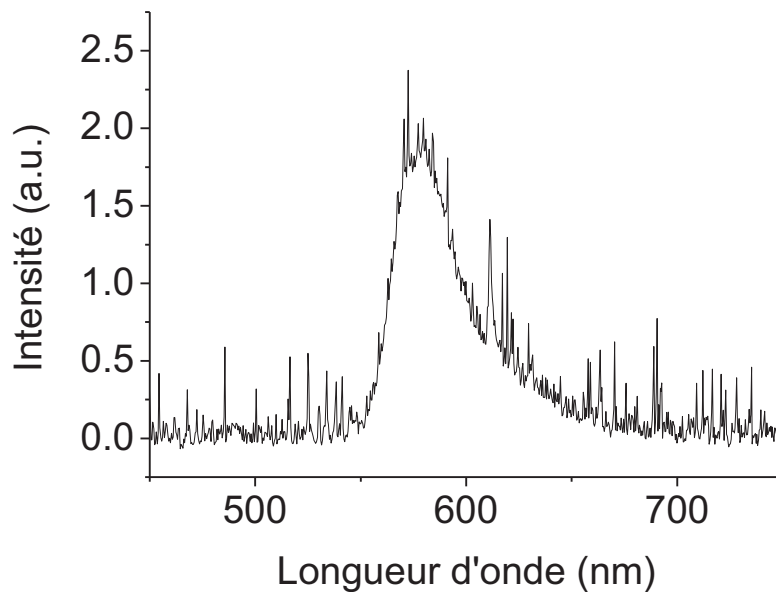


Figure 4.18: Exemple d'un spectre de fluorescence brute d'une solution de Myoglobine greffée par la Rhodamine B isothiocyanate injectée dans la source électrospray à 40 μM dans un mélange eau/Méthanol (20:80). Les polarisations de l'excitation et de l'émission sont verticales (configuration I_{VV}).

Références

- [1] J. Li, C. Santambrogio, S. Brocca, G. Rossetti, P. Carloni, and R. Grandori, “Conformational effects in protein electrospray-ionization mass spectrometry,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 35, no. 1, pp. 111–122, 2016.
- [2] L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, and S. Vahidi, “Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 1, pp. 2–9, Jan. 2013.
- [3] K. Wuthrich, “The way to NMR structures of proteins,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 8, no. 11, pp. 923–925, Nov. 2001.
- [4] N. J. Greenfield, “Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 6, pp. 2876–2890, 2006.
- [5] J. C. KENDREW, G. BODO, H. M. DINTZIS, R. G. PARRISH, H. WYCKOFF, and D. C. PHILLIPS, “A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis,” *Nature*, vol. 181, no. 4610, pp. 662–666, Mar. 1958.
- [6] D. L. Smith and Z. Zhang, “Probing noncovalent structural features of proteins by mass spectrometry,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 13, no. 5–6, pp. 411–429, 1994.
- [7] E. Vandermarliere, E. Stes, K. Gevaert, and L. Martens, “Resolution of protein structure by mass spectrometry,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 35, no. 6, pp. 653–665, 2016.
- [8] D. Wittmer, Y. H. Chen, B. K. Luckenbill, and H. H. Hill, “Electrospray Ionization Ion Mobility Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 66, no. 14, pp. 2348–2355, Jul. 1994.
- [9] F. Lanucara, S. W. Holman, C. J. Gray, and C. E. Eyers, “The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics,” *Nat Chem*, vol. 6, no. 4, pp. 281–294, Apr. 2014.
- [10] T. Meyer, V. Gabelica, H. Grubmüller, and M. Orozco, “Proteins in the gas phase,” *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 408–425, 2013.
- [11] T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman, 1993.
- [12] V. Bellotti and M. Stoppini, “Protein misfolding diseases,” *Open Biol. J.*, vol. 2, pp. 228–

- 234, 2009.
- [13] F. Chiti and C. M. Dobson, “Protein misfolding, functional amyloid, and human disease.,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 75, pp. 333–366, 2006.
- [14] J. R. Lakowicz, Ed., “Protein Fluorescence BT - Principles of Fluorescence Spectroscopy,” Boston, MA: Springer US, 2006, pp. 529–575.
- [15] A. B. T. Ghisaidoobe and S. J. Chung, “Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 12, pp. 22518–22538, Dec. 2014.
- [16] I. A. Kaltashov, C. E. Bobst, and R. R. Abzalimov, “Mass spectrometry-based methods to study protein architecture and dynamics,” *Protein Sci.*, vol. 22, no. 5, pp. 530–544, May 2013.
- [17] F. Wang and X. Tang, “Conformational Heterogeneity and Stability of Apomyoglobin Studied by Hydrogen/Deuterium Exchange and Electrospray Ionization Mass Spectrometry,” *Biochemistry*, vol. 35, no. 13, pp. 4069–4078, Jan. 1996.
- [18] J. Li, J. A. Taraszka, A. E. Counterman, and D. E. Clemmer, “Influence of solvent composition and capillary temperature on the conformations of electrosprayed ions: unfolding of compact ubiquitin conformers from pseudonative and denatured solutions1,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 185–187, pp. 37–47, Apr. 1999.
- [19] J. Liu and L. Konermann, “Irreversible Thermal Denaturation of Cytochrome c Studied by Electrospray Mass Spectrometry,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 20, no. 5, pp. 819–828, May 2009.
- [20] U. A. Mirza, S. L. Cohen, and B. T. Chait, “Heat-induced conformational changes in proteins studied by electrospray ionization mass spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 65, no. 1, pp. 1–6, Jan. 1993.
- [21] J. C. Y. Le Blanc, D. Beuchemin, K. W. M. Siu, R. Guevremont, and S. S. Berman, “Thermal denaturation of some proteins and its effect on their electrospray mass spectrat,” *Org. Mass Spectrom.*, vol. 26, no. 10, pp. 831–839, 1991.

- [22] A. Kharlamova and S. A. McLuckey, “Negative Electrospray Droplet Exposure to Gaseous Bases for the Manipulation of Protein Charge State Distributions,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 1, pp. 431–437, Jan. 2011.
- [23] A. Kharlamova, B. M. Prentice, T.-Y. Huang, and S. A. McLuckey, “Electrospray Droplet Exposure to Gaseous Acids for the Manipulation of Protein Charge State Distributions,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 17, pp. 7422–7429, Sep. 2010.
- [24] M. Girod, R. Antoine, P. Dugourd, C. Love, A. Mordehai, and G. Stafford, “Basic Vapor Exposure for Tuning the Charge State Distribution of Proteins in Negative Electrospray Ionization: Elucidation of Mechanisms by Fluorescence Spectroscopy,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 23, no. 7, pp. 1221–1231, 2012.
- [25] D. N. Mortensen and E. R. Williams, “Investigating Protein Folding and Unfolding in Electrospray Nanodrops Upon Rapid Mixing Using Theta-Glass Emitters,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 2, pp. 1281–1287, Jan. 2015.
- [26] B. T. Ruotolo, J. L. P. Benesch, A. M. Sandercock, S.-J. Hyung, and C. V. Robinson, “Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes,” *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 7, pp. 1139–1152, Jun. 2008.
- [27] M. F. Czar and R. A. Jockusch, “Sensitive probes of protein structure and dynamics in well-controlled environments: combining mass spectrometry with fluorescence spectroscopy,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 34, pp. 123–134, Oct. 2015.
- [28] S. Ideue, K. Sakamoto, K. Honma, and D. E. Clemmer, “Conformational change of electrosprayed cytochrome c studied by laser-induced fluorescence,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 337, no. 1–3, pp. 79–84, Mar. 2001.
- [29] S. E. Rodriguez-Cruz, J. T. Khoury, and J. H. Parks, “Protein fluorescence measurements within electrospray droplets,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 12, no. 6, pp. 716–725, 2001.
- [30] D. E. Schlamadinger, D. I. Kats, and J. E. Kim, “Quenching of Tryptophan Fluorescence in Unfolded Cytochrome c: A Biophysics Experiment for Physical Chemistry Students,” *J. Chem. Educ.*, vol. 87, no. 9, pp. 961–964, Sep. 2010.

- [31] M. R. Eftink, “The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins,” *Biophys. J.*, vol. 66, no. 2, pp. 482–501, 1994.
- [32] O. C. Fiebig, E. Mancini, G. Caputo, and T. D. Vaden, “Quantitative Evaluation of Myoglobin Unfolding in the Presence of Guanidinium Hydrochloride and Ionic Liquids in Solution,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 2, pp. 406–412, Jan. 2014.
- [33] D. Canet, K. Doering, C. M. Dobson, and Y. Dupont, “High-sensitivity fluorescence anisotropy detection of protein-folding events: application to alpha-lactalbumin.,” *Biophys. J.*, vol. 80, no. 4, pp. 1996–2003, Apr. 2001.
- [34] S. Weiss, “Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 7, no. 9, pp. 724–729, Sep. 2000.
- [35] A. Marczak, “Fluorescence anisotropy of membrane fluidity probes in human erythrocytes incubated with anthracyclines and glutaraldehyde,” *Bioelectrochemistry*, vol. 74, no. 2, pp. 236–239, Feb. 2009.
- [36] V. LeTilly and C. A. Royer, “Fluorescence anisotropy assays implicate protein-protein interactions in regulating trp repressor DNA binding,” *Biochemistry*, vol. 32, no. 30, p. 7753–7758, 1993.
- [37] G. Hungerford, J. Benesch, J. F. Mano, and R. L. Reis, “Effect of the labelling ratio on the photophysics of fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to bovine serum albumin,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 152–158, 2007.
- [38] M. Brinkley, “A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 3, no. 1, pp. 2–13, Jan. 1992.
- [39] A. Castro-Forero, D. Jiménez, J. López-Garriga, and M. Torres-Lugo, “Immobilization of Myoglobin from Horse Skeletal Muscle in Hydrophilic Polymer Networks,” *J. Appl. Polym. Sci. Symp.*, vol. 107, no. 2, pp. 881–890, Jan. 2008.
- [40] L. F. Mottram, S. Forbes, B. D. Ackley, and B. R. Peterson, “Hydrophobic analogues of rhodamine B and rhodamine 101: potent fluorescent probes of mitochondria in living *C. elegans*,” *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 8, pp. 2156–2165, Dec. 2012.

- [41] L. Whitmore and B. A. Wallace, "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. Web Server issue, pp. W668–W673, Jul. 2004.
- [42] L. Whitmore and B. A. Wallace, "Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases ," *Biopolymers*, vol. 89, no. 5, pp. 392–400, 2008.
- [43] S. Papadopoulos, K. D. Jürgens, and G. Gros, "Protein Diffusion in Living Skeletal Muscle Fibers: Dependence on Protein Size, Fiber Type, and Contraction," *Biophys. J.*, vol. 79, no. 4, pp. 2084–2094, Oct. 2000.
- [44] M. T. Tyn and T. W. Gusek, "Prediction of diffusion coefficients of proteins," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 35, no. 4, pp. 327–338, 1990.
- [45] S. Z. Mikhail and W. R. Kimel, "Densities and Viscosities of Methanol-Water Mixtures.," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 6, no. 4, pp. 533–537, Oct. 1961.
- [46] T. T. Herskovits, B. Gadegbeku, and H. Jaillet, "On the Structural Stability and Solvent Denaturation of Proteins: I. DENATURATION BY THE ALCOHOLS AND GLYCOLS ," *J. Biol. Chem.* , vol. 245, no. 10, pp. 2588–2598, May 1970.
- [47] S. Hwang, Q. Shao, H. Williams, C. Hilty, and Y. Q. Gao, "Methanol Strengthens Hydrogen Bonds and Weakens Hydrophobic Interactions in Proteins – A Combined Molecular Dynamics and NMR study," *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 20, pp. 6653–6660, May 2011.
- [48] A. Fernández and O. Sinanoğlu, "Denaturation of proteins in methanol/water mixtures," *Biophys. Chem.*, vol. 21, no. 3, pp. 163–166, 1985.
- [49] J. Seo, W. Hoffmann, S. Warnke, M. T. Bowers, K. Pagel, and G. von Helden, "Retention of Native Protein Structures in the Absence of Solvent: A Coupled Ion Mobility and Spectroscopic Study," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 55, no. 45, pp. 14173–14176, 2016.
- [50] A. Soleilhac, F. Bertorelle, P. Dugourd, M. Girod, and R. Antoine, "Monitoring methanol-induced protein unfolding by fluorescence anisotropy measurements of covalently labelled rhodamine probe," *Eur. Phys. J. D*, vol. 71, no. 6, p. 142, 2017.

- [51] Y. Y. GOTTLIEB and P. WAHL, “ETUDE THEORIQUE DE LA POLARISATION DE FLUORESCENCE DES MACROMOLECULES PORTANT UN GROUPE EMETTEUR MOBILE AROUND DUN AXE DE ROTATION,” *J. Chim. Phys. PHYSICO-CHIMIE Biol.*, vol. 60, no. 7–8, pp. 849–856, 1963.
- [52] K. Kinosita, S. Kawato, and A. Ikegami, “A theory of fluorescence polarization decay in membranes,” *Biophys. J.*, vol. 20, no. 3, pp. 289–305, 1977.
- [53] G. F. Schröder, U. Alexiev, and H. Grubmüller, “Simulation of Fluorescence Anisotropy Experiments: Probing Protein Dynamics,” *Biophys. J.*, vol. 89, no. 6, pp. 3757–3770, Dec. 2005.
- [54] V. Frankevich, K. Barylyuk, K. Chingin, R. Nieckarz, and R. Zenobi, “Native Biomolecules in the Gas Phase? The Case of Green Fluorescent Protein,” *ChemPhysChem*, vol. 14, no. 5, pp. 929–935, 2013.

Chapitre 5 : ERTIGO : vers des mesures de température en conditions extrêmes.

Table des matières

Préambule.....	175
Introduction	176
5.1 Fusion nucléaire initiée par absorption laser.....	180
5.1.1 Explosion coulombienne.....	182
5.1.2 Nanoparticules fonctionnalisées pour des réactions nucléaires	185
5.2 Lyon - Bordeaux : Développement d'une source spray de nanoparticule	188
5.2.1 Montage expérimental	189
Installation laser	189
Source spray.....	190
Détecteurs	191
5.2.2 Premiers résultats	192
Caractérisation de la source spray.....	192
Interaction laser - gouttelettes	193
5.2.3 Conclusion	195
5.3 Lyon – Saint-Etienne : Nanoparticule et cavitation	196
5.3.1 Montage expérimental	198
Génération du faisceau de Bessel.....	198
Microscopie résolue en temps.....	200
5.3.2 Dynamique Ultra-rapide : la formation d'une microbulle par nano-cavitation	201
5.3.3 Les limites de l'imagerie optique pompe-sonde	206
5.3.4 Le laser Aléatoire	207
Principe	208
Propriétés	211
Implémentation	215
5.3.5 Dynamique de la microbulle en présence de nanoparticules	217
En présence de nanoparticules de latex.....	224
En présence de nanoparticules d'or	227
5.3.7 Discussion	234
Conclusion.....	236
Références	237

Préambule

Les chapitres décrits précédemment sont en fait un travail de fond, introductif et exploratoire à un plus vaste projet : le projet ERTIGO¹. L'aspect « thermographie » développé à travers des nanoparticules fonctionnalisées pour des mesures de température multi-échelles et l'étude de profil en température d'aérosol, a permis de proposer des solutions d'outils thermographiques pour aller vers des mesures en conditions extrêmes. En particulier, nous verrons que le projet ERTIGO est un projet ambitieux basé sur un développement instrumental important, mené sur trois sites –Lyon, Saint-Etienne et Bordeaux– autour des sources aérosols d'une part, et de l'imagerie optique d'autre part, sur lequel j'ai été fortement impliqué. Même si l'aspect thermodynamique prend une place importante dans ce projet, cette étude n'a malheureusement pas pu être encore réalisée. Cependant, les outils thermographiques que nous avons employés précédemment pourront être adaptés et réutilisés pour la caractérisation de ces nouveaux systèmes.

¹ Afin de combler la lacune sémantique qui existait pour l'échelle nucléaire, François Bayard (C2P2, Lyon) a proposé en 2008 le concept « ERTIGO » qui résulte de la concaténation des mots « énergie, vertige et virgo ».

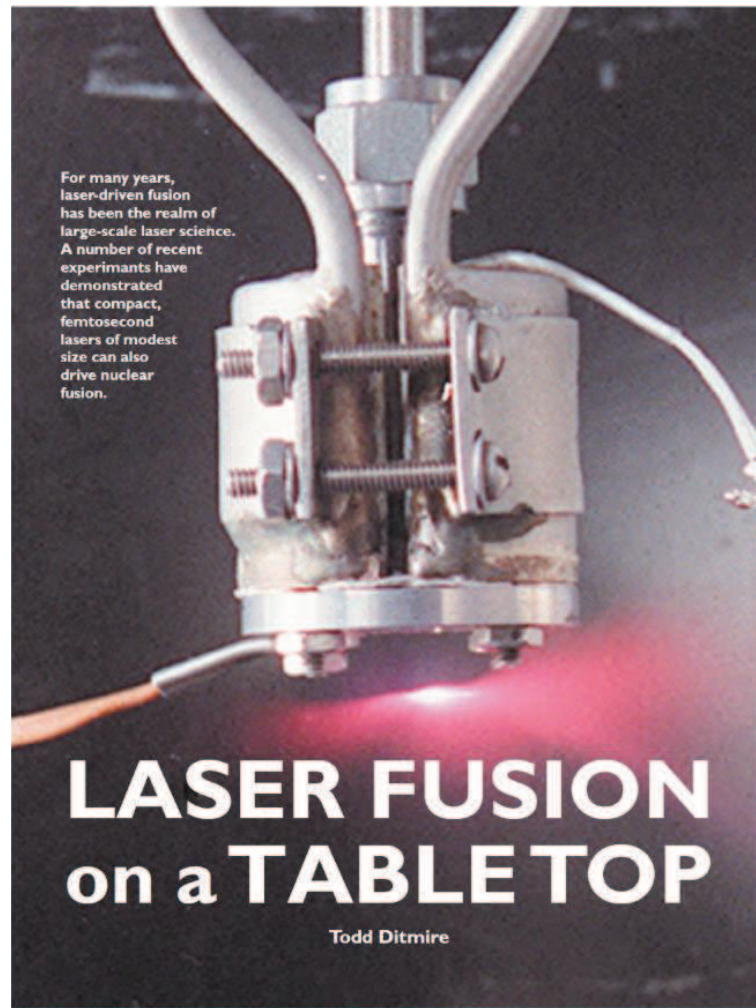
Introduction

ERTIGO: “Passing the activation barriers at all scales. Extension of the concept of catalyst for the induction of nuclear fusion reactions”.

Le passage des barrières d’activation est un phénomène général qui se retrouve à plusieurs échelles. A chaque fois des médiateurs sont possibles pour faciliter le franchissement de ces barrières énergétiques. Le critère de Lawson fut proposé en 1955. Il permet d’établir les conditions thermodynamiques permettant l’initiation de la fusion nucléaire contrôlée. Il est à la base des recherches commencées dans les années 50 concernant ce domaine : réalisation de confinement magnétique de plasma (Tomawaks, JET, ITER) et confinement inertiel d’une cible deutérée à l’aide d’une multitude de lasers haute puissance (LMJ CEA France, Lawrence Livermore National Laboratory USA).

Les explosions coulombiennes résultant de l’action de lasers femtosecondes sur des nanoparticules permettent une accélération des protons et peuvent conduire à la réalisation de réactions nucléaires. Nous nous proposons de considérer ces réactions non pas en privilégiant l’activation thermique comme l’a effectué Lawson mais en prenant en considération le caractère microscopique de ces phénomènes. L’avènement des lasers pulsés a permis de disposer d’impulsions énergétiques ultracourtes à l’échelle de la femtoseconde pouvant atteindre des densités énergétiques sans précédents ($I > 10^{19} W \cdot cm^{-2}$). A ce niveau d’énergie on observe un dépouillement des électrons par l’impulsion laser. Les noyaux en présence n’étant plus équilibrés par l’apport des électrons vont être éjectés par la répulsion électrostatique au cours d’une explosion coulombienne. La libération de protons de haute énergie et leur interaction avec d’autres noyaux va conduire à l’induction de réactions nucléaires.

Durant les 20 dernières années, l’étude grandissante de l’interaction lasers à impulsion ultra-courte avec des agrégats atomiques a permis de développer cette physique nouvelle. En particulier, l’observation de réactions de fusion nucléaire induites par laser sur des objets nanométriques a pu être mise en évidence par Ditmire *et al.* en 1999 [1] (comme montré ci-après sur la page de couverture de la revue Nature).



Le projet ERTIGO tente de poursuivre l'investigation initiée par ces résultats. Il trouve son origine dans une collaboration entre quatre laboratoires Français : l'Institut Lumière Matière (ILM, UMR 5306 Université Claude Bernard Lyon1 – CNRS, Lyon), le Laboratoire Hubert Curien (LHC, UMR 5516 Université Jean Monnet Saint Etienne - CNRS, Saint-Etienne), le Centre Intense Lasers and Applications (CELIA, UMR 5107 Université de Bordeaux - CEA - CNRS, Bordeaux) et le laboratoire de Chimie Catalyse Polymères et Procédés (C2P2, UMR 5265 Université Claude Bernard Lyon1 - Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique de Lyon - CNRS, Villeurbanne). Ce consortium regroupant, chimistes de nanoparticules polymères, physico-chimistes, laseristes, et physiciens des hautes énergies rassemble l'expertise nécessaire pour mener à bien ce projet. L'idée « technologique » est de proposer des nano-objets comprenant à la fois suffisamment d'hydrogène précurseurs des protons de haute énergie et des atomes cibles plus lourds permettant de réaliser des réactions nucléaires de fusion.

Cette collaboration, financée au niveau Lyon-Saint-Etienne par le Programme Avenir Lyon-Saint-Etienne (PALSE, projet émergent 2013-2015) et au niveau Lyon-Bordeaux à travers le Labex LAPHIA (Risky project, 2014) a permis de mieux réfléchir au concept d'un réacteur utilisant des réactions de fusion nucléaire pour réaliser des échauffements très localisés et très intenses à partir de l'interaction d'un faisceau laser ultra-court et ultra-intense avec des nanoparticules de polymères fonctionnalisées dopées en Bore synthétisées chimiquement. Pour que cette interaction soit efficace, l'irradiation laser doit être faite dans un environnement contrôlé : les nanoparticules doivent être désolvatées (i.e. sous vide ou à défaut, générées en phase gazeuse). Deux approches complémentaires ont alors été proposées afin de générer des nanoparticules en milieu isolé.

La première approche a consisté à développer une source aérosol permettant la génération sous vide des nanoparticules. C'est par une étroite collaboration entre l'Institut Lumière Matière (Lyon) et le Centre Intense Lasers and Applications (Bordeaux) que les mécanismes d'absorption d'un faisceau laser femtoseconde ultra-intense en interaction avec une cible aérosol pulsée ont pu être étudiés.

La seconde approche a été de réaliser cette irradiation dans une solution colloïdale de nanoparticules. Ce concept a fait l'objet d'un dépôt de brevet dont la propriété est partagée par le CNRS, le CEA, les universités de Bordeaux et de Lyon 1 Claude Bernard et l'Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique de Lyon. Ce réacteur fonctionne sur le principe d'une double absorption laser sous la surface d'une solution :

- Une première impulsion, typiquement d'une durée de quelques picosecondes, crée par cavitation une bulle dans la solution colloïdale. Les nanoparticules devraient alors être piégées par inertie dans le milieu raréfié de la bulle.
- Une seconde impulsion, d'une durée de quelques dizaines de femtosecondes est focalisée dans la bulle avec un retard réglable par rapport à la première impulsion (typiquement de l'ordre de la microseconde) et engendre alors l'explosion coulombienne des nanoparticules en phase « gazeuse », précurseur des réactions de fusion nucléaire.

Ce concept a pu être étudié grâce à la collaboration entre les parties Lyonnaises (le C2P2 pour la synthèse des objets et l'ILM pour le développement instrumental) et Saint-Etienne dans le cadre du programme « projets émergents » du PALSE. Une question ouverte et qui est au cœur de ce

projet était de savoir si les nanoparticules restaient confinées dans la microbulle ou bien si elles en étaient « chassées » sous l'impulsion de la dynamique de la microbulle. Nous verrons que pour répondre à cette question, il a fallu deux années et développer des outils pour la microscopie innovants et adaptés, et notamment il a fallu aller vers une microscopie « tir laser unique » en développant des sources non-cohérentes de lumière de type « laser aléatoire ».

C'est dans ce contexte que ce chapitre s'inscrit. Trois parties distinctes et intimement liées au projet ERTIGO seront explorées. Dans la première, nous détaillerons de façon qualitative les processus mis en jeu lors de la production de réactions de fusion nucléaire induites par l'irradiation laser de nanoparticules fonctionnalisées dopées en Bore. En seconde partie, nous présenterons l'installation utilisée pour l'interaction laser femtoseconde ultra-intense avec une cible aérosol développée dans le cadre de ce projet (première approche – Bordeaux) ainsi que les premiers résultats montrant la génération de particules chargées accélérées à haute énergie. Enfin, dans une troisième partie, nous tenterons de caractériser par microscopie optique résolue en temps la microbulle définissant le confinement du réacteur (seconde approche – Saint Etienne). Cette caractérisation fait intervenir une physique à différentes échelles, qui va de la génération de la microbulle sous la surface de la solution par irradiation laser, en passant par l'étude de la dynamique de la bulle, jusqu'au comportement de nanoparticules colloïdales d'or au cours de la formation de la bulle.

5.1 Fusion nucléaire initiée par absorption laser

La fusion nucléaire est un processus où deux noyaux atomiques légers s'assemblent pour former un noyau plus lourd. La masse de ce nouveau noyau est plus petite que la somme des masses des deux noyaux légers. Autrement dit, lors du processus de fusion, une partie de la masse a été transformée en énergie selon la formule d'Einstein,

$$E = mc^2 \tag{5.1}$$

Où E est l'énergie libérée par la réaction, m la perte de masse et c , la vitesse de la lumière dans le vide. Cependant, pour qu'une réaction de fusion nucléaire soit possible, il faut que les deux noyaux mis en jeu s'interpénètrent : il est donc nécessaire de surmonter la répulsion électrostatique des deux noyaux chargés positivement (barrière coulombienne). Cette barrière d'activation est considérablement élevée (plusieurs dizaine de keV), mais elle peut être atteinte pour des grandes valeurs de température et de pression. Ces conditions extrêmes de pression et de température sont rencontrées naturellement au sein des étoiles. Ce sont les chaînes de réactions de fusion nucléaire qui permettent la nucléosynthèse d'éléments lourds en milieu stellaire. En laboratoire, afin d'initier des réactions de fusion nucléaire contrôlées, différentes stratégies sont explorées pour réaliser les conditions de densité et de température nécessaires en confinant le milieu de réaction. Notamment, les réactions de fusion Deutérium-Tritium par confinement magnétique ou par confinement inertiel sont aujourd'hui encore en cours d'élaboration.

Grâce au développement des technologies laser à impulsions courtes et intenses, il est possible d'envisager la production d'énergie par la fusion nucléaire de façon différente. De nouveaux schémas de fusion peuvent être conçus dans lesquels les réactions de fusion seraient produites hors équilibre thermique. L'absorption d'un faisceau laser ultra-court, ultra-intense sur une cible indirecte a permis la génération de particules à très haute énergie, précurseur de réaction de fusion nucléaire [2]. Certaines de ces nouvelles technologies laser permettent d'atteindre des intensités lasers de l'ordre de $10^{22} W.cm^{-2}$, suffisante pour pouvoir accélérer des électrons à des énergies proches du GeV.

De cette façon, les réactions nucléaires difficilement accessibles à l'équilibre thermique à cause de leur température de réactivité trop élevée deviennent réalisables hors équilibre. En particulier, la réaction de fusion nucléaire du couple proton-Bore est l'une des réactions de fusion aneutronique les plus attractives puisqu'elle ne fait pas intervenir des neutrons de fusion qui peuvent être néfastes.



A titre de comparaison, la section efficace de la réaction de fusion Deutérium-Tritium est maximale lorsque l'énergie du centre de masse du système est d'environ 60 keV (soit de 700 millions de Kelvin pour une réaction à l'équilibre thermique) alors que la réaction proton-Bore est maximale lorsque cette énergie est de 600 keV (soit de 7 milliards de Kelvin pour une réaction à l'équilibre thermique) [3].

5.1.1 Explosion coulombienne

Afin de pouvoir générer des particules accélérées à des énergies dignes de pouvoir initier des réactions nucléaires, plusieurs stratégies ont été explorées. Un laser ultra-court et ultra-intense d'intensité $I > 10^{19} W \cdot cm^{-2}$ est focalisé sur une cible solide primaire. La formation d'un plasma et l'accélération des électrons de la cible par le champ électrique de l'impulsion laser est alors initiateur d'un faisceau de protons accélérés par TNSA (*Target Normal Sheat Acceleration*) [4], [5] à des énergies de l'ordre de quelque MeV. Ce faisceau de protons entre ensuite en interaction avec une cible secondaire sur laquelle des réactions de fusion nucléaire peuvent se produire [3], [6].

En 1999, le groupe de Ditmire [1] adopte une stratégie différente : des réactions de fusion nucléaire sont alors réalisées grâce à la génération d'ions accélérés à haute énergie par l'interaction entre un faisceau laser ultra-court et ultra-intense avec des objets de taille nanométrique par explosion coulombienne. Cette étude a été menée sur des agrégats atomiques de Deutérium (~5 nm). Pour des intensités laser moins fortes ($I \sim 10^{17} W \cdot cm^{-2}$), l'impulsion laser est focalisée dans un jet d'agrégats de Deutérium (**Figure 5.1 – Non disponible dans la version expurgée**).

Figure 5.1: Représentation du principe établi par le groupe de Ditmire qui a permis pour la première fois d'initier des réactions de fusion nucléaire par explosion coulombienne induite par laser [1].

Le champ électrique intense de l'impulsion éjecte alors les électrons de l'agrégat le rendant très instable. Il s'ensuit une nano-explosion de l'agrégat par répulsion coulombienne : on parle alors d'explosion coulombienne. Les produits de cette explosion sont des noyaux de Deutérium accélérés à très haute énergie. La collision entre deux noyaux est alors probable et si l'énergie du centre de masse du système est supérieure à la barrière coulombienne, un évènement de fusion nucléaire par la réaction : $D + D \rightarrow {}^3\alpha + n [+2.45 \text{ MeV}]$ est alors possible. C'est ainsi qu'a été observé pour la première fois des neutrons produit par des réactions de fusion nucléaire initiées par une impulsion laser d'intensité « modérée » (Figure 5.2– Non disponible dans la version expurgée).

Figure 5.2: (gauche) Principe de l'explosion coulombienne d'un agrégat. L'impulsion laser accélère les électrons de l'agrégat (photo-ionisation intense). Les noyaux, chargés positivement, se repoussent et sont alors éjectés avec une énergie cinétique importante. (droite) Spectre en énergie caractéristique des neutrons produits par la réaction $D + D \rightarrow {}^3\alpha + n [+2.45 \text{ MeV}]$.

Depuis ces premiers résultats, l'augmentation du rendement de la génération de neutron de fusion par explosion coulombienne d'agrégats de Deutérium a été au cœur du développement de sources à neutron performantes. En particulier, le groupe de Z.Z. Xu [7] a démontré expérimentalement que l'utilisation d'agrégats de grande taille de méthane deutéré hétéronucléaire $(\text{CD}_4)_N$ permettait une conversion de 2.1×10^6 neutrons/J avec une impulsion laser de 70 fs, d'énergie 120 mJ.

Enfin, il est important de noter que l'énergie cinétique des éléments générés par l'explosion coulombienne dépend de la taille de l'agrégat. Ainsi, plus l'agrégat est grand, plus l'énergie des produits de l'explosion sera grande avec une tendance donnée en Figure 5.3– Non disponible dans la version expurgée. Jortner *et al.* décrit alors la dépendance du maximum de l'énergie cinétique du centre de masse des produits de l'explosion coulombienne de différents objets par une impulsion

laser gaussienne. Les objets étudiés couvrent des tailles de plusieurs ordres de grandeur : ce sont des agrégats, des nano-gouttelettes et des microgouttelettes de deutérium de dimension fini R_0 . Ces résultats ont été obtenus par des simulations de Dynamique Moléculaire pour les agrégats avec $R_0 = 2 - 5 \text{ nm}$ et par des simulations SEID (*Scaled Electron and Ion Dynamics*) pour les plus gros objets selon différentes conditions d'excitation laser. La dépendance du maximum de l'énergie cinétique E_M obéit à la loi d'échelle [8]:

$$E_M = \frac{4\pi}{3} B q^2 \rho R_0^2 \tag{5.3}$$

Où E_M est donné en keV , R_0 le rayon de l'objet en nm , $B = 1.44 \times 10^{-3} keV \cdot nm$, q est la charge de l'ion et ρ la densité initiale du système.

De cette façon, pour les objets plus gros (type nanoparticule et microgouttelettes), il est alors possible d'atteindre des énergies suffisantes pour initier des réactions de fusion nucléaire aneutronique proton-Bore par explosion coulombienne. Ainsi, la barrière d'activation de la réaction proton-Bore, ou autrement dit, l'énergie du centre de masse du système correspondant au maximum de la section efficace d'interaction de la réaction proton-Bore peut être atteinte grâce à l'explosion coulombienne d'objets de taille de l'ordre de la centaine de nanomètres.

Figure 5.3: Evolution de l'énergie du centre de masse libérée lors d'une explosion coulombienne d'un système Deutérium en fonction de la taille de ce système (agrégat, nano-gouttelette, micro-gouttelette) pour différentes intensités laser. La droite représente la loi d'échelle (Equation 3) [8].

5.1.2 Nanoparticules fonctionnalisées pour des réactions nucléaires

L'explosion coulombienne d'objets de quelques centaines de nanomètres permettrait la génération de particule suffisamment énergétique pour dépasser la barrière d'activation de la réaction aneutronique du couple proton-Bore ($p + {}^{11}_5B \rightarrow 3\alpha$ [$+8.7$ MeV]). C'est dans cette perspective que des nanoparticules dopées en Bore ont été synthétisées : elles joueraient alors le rôle de nano-combustibles nucléaires sous irradiation laser. Très brièvement afin d'obtenir des nanoparticules stables de taille comprise entre 300 et 600 nm, plusieurs techniques de synthèse ont été explorées et réalisées par le laboratoire de Chimie Catalyse Polymères et Procédés (C2P2, Villeurbanne). En particulier, des synthèses ont été effectuées par polymérisation de monomère boré en émulsion ou en dispersion en milieu hétérogène avec différents co-monomères comme le styrène ou le méthacrylate méthyl en en faisant varier la nature ionique de l'initiateur et les différents paramètres de polymérisation.

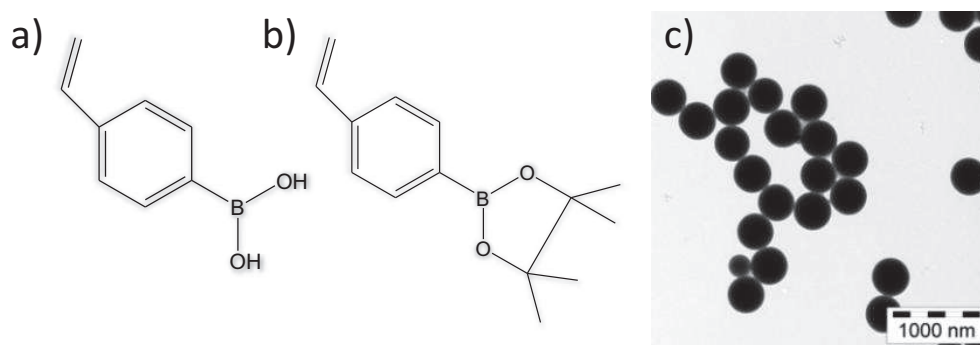


Figure 5.4 : Structure moléculaire du (a) 4-VPBA et du (b) 4-VPBAPin.

(c) Image TEM des nanoparticules de latex dopées en Bore.

Quelques résultats de synthèses sont résumés en **Table 5.1**. Par exemple, pour l'échantillon 2, l'acide 4-vinylphénylboronique (4-VPBA - **Figure 5.4.a**) a été chimiquement modifié pour donner l'acide pinacol ester 4-vinylphénylboronique (4-VPBAPin - **Figure 5.4.b**) afin de le rendre soluble dans le styrène. La polymérisation du monomère boré par polymérisation en émulsion sans tensio-actif en présence de styrène (25% de 4-VPBAPin et 75% de styrène) dans de l'eau initié par du Persulfate de Potassium (KPS) a permis la synthèse de nanoparticules riches en Bore. Le diamètre de ces nanoparticules mesuré par Microscopie Electronique en Transmission (**Figure 5.4.c**) est estimé à $D_n = 420$ nm avec un indice de polydispersité $IPD = 1.01$ et une concentration en 4-VPDAin de 25 mol%.

Table 5.1: Exemple de synthèse de nanoparticules dopées en Bore par polymérisation en émulsion sans tensio-actif en présence de styrène. Le taux de conversion est déterminé par gravimétrie

Echantillon	Initiateur	4-VPBAin (mol%)	Conversion (%)	D_n , TEM (nm)	IPD
1	ADIBA	25	75	340	1.06
2	KPS	25	70	420	1.01
3	KPS	50	20	180	1.70
4	KPS	100	20	165	1.65

Pour une interpénétration optimale des produits de l'explosion coulombienne des nanoparticules, un concept de nanoparticules basé sur une approche cœur-coquille a également été envisagé. La synthèse d'une nanoparticule au cœur hydrogéné avec une couronne dopée en Bore permettrait alors une collision plus efficace des protons éjectés du cœur de la nanoparticule vers les noyaux de Bore en périphérie de cette dernière. Les nanoparticules de latex, riche en proton sont donc fonctionnalisées par une couronne de poly(glycérol monométhacrylate) qui est ensuite chimiquement dopé en Bore (Figure 5.5).

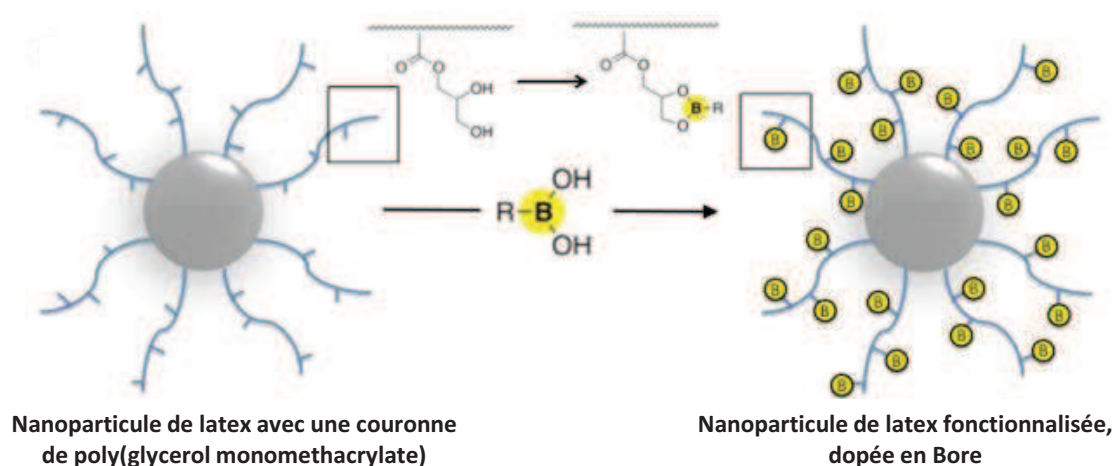


Figure 5.5: Principe de fonctionnalisation d'une nanoparticule de type cœur-coquille

En conclusion de cette partie « synthèse chimique », nous proposons l'utilisation de précurseurs « nanoparticulaires » et d'explosions coulombiennes comme médiateurs dans le franchissement des barrières d'activation de la fusion nucléaire. La structuration des nanoparticules par synthèse chimique, a été validée, et ouvre la voie à la réalisation d'une famille d'objets parfaitement capables d'assurer cette fonction. Par opposition au concept à deux cibles solides décrit dans le paragraphe

précédent, l'intensité laser requise est moindre et les nanoparticules sont à la fois la source de protons accélérés et cible de réactions de fusion nucléaire.

Cependant, deux contraintes majeures doivent être respectées. D'une part, il doit y avoir une interaction efficace entre l'impulsion laser ultra-courte, ultra-intense et les nanoparticules. D'autre part, les protons accélérés par l'explosion coulombienne doivent pouvoir interagir efficacement avec les noyaux de Bore. Si ces deux contraintes ne sont pas respectées, l'absorption laser par les nanoparticules peut ne pas être suffisamment importante pour initier l'explosion coulombienne. Et même si les protons sont effectivement accélérés, ils peuvent être ralentis par le milieu avant que la réaction de fusion avec le Bore puisse avoir lieu. Pour cela, l'interaction lumière-nanoparticule doit se faire en milieu isolé : les particules de nano-combustible doivent être générées en environnement contrôlé et avec une grande densité afin d'augmenter les probabilités de réaction. Autrement dit, l'interaction laser idéale doit se faire de façon localisée avec des nanoparticules générées sous vide. La génération de nanoparticule en milieu isolé n'est pas triviale. Deux stratégies complémentaires ont alors été envisagées au sein du projet ERTIGO et seront détaillées dans la suite de ce chapitre.

5.2 Lyon - Bordeaux : Développement d'une source spray de nanoparticule

La première stratégie se base sur notre expertise des sources aérosols pour le développement d'une nouvelle cible aérosol pulsée synchronisée avec une impulsion laser ultra-courte et ultra-intense. Les nanoparticules dispersées en solution sont alors générées dans des gouttelettes micrométriques de solvant. Elles sont ensuite désolvatées très rapidement sous vide. Ce jet de nanoparticules désolvatées généré sous vide entre alors en interaction avec le faisceau laser. Cette stratégie a été développée en collaboration avec le Centre Intense Lasers and Applications (CELIA, Bordeaux). Ma contribution a consisté à installer la source aérosol développée par l'ILM sur l'expérience ECLIPSE et à en effectuer les premiers essais de caractérisation durant mes séjours à Bordeaux (financements GDR EMIE 2015 et 2016).

5.2.1 Montage expérimental

Installation laser

Le CELIA dispose du laser ECLIPSE. Cette installation peut délivrer des impulsions laser ultra-courtes et ultra-intenses nécessaires pour les besoins du projet ERTIGO. En effet, la durée de l'impulsion laser est de 36 fs pour une énergie transmise de 200 mJ par impulsion de longueur d'onde centrée à 1 μm . La dimension de la tâche focale du laser est de l'ordre de la dizaine de μm , autorisant la génération d'intensité laser de $I > 10^{18} \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$. Dans ce régime d'intensité laser, afin d'éviter toute interaction entre l'air et le faisceau laser pouvant conduire à des phénomènes de « claquage optique » (voir plus loin pour plus de détails, [Paragraphe 5.3.2](#)), le chemin optique du faisceau laser après compression temporelle est mis sous vide. De la même façon, la pression de la chambre d'interaction où le faisceau laser est focalisé est contrôlée et est fixée entre 10^{-4} et 10^{-5} mBar (vide secondaire). Ce vide secondaire est assuré par un jeu de pompe turbo.

La chambre d'interaction ([Figure 5.6](#)) est une chambre de 500 mm de rayon pour une hauteur d'environ 600 mm. Elle comprend plusieurs optiques pour le guidage et la focalisation du faisceau laser femtoseconde. De nombreux hublots sont disponibles pour les différents diagnostics : ils permettent une visualisation directe de la chambre d'interaction ou le passage de connectiques vers des instruments de détection présent au cœur de la chambre.

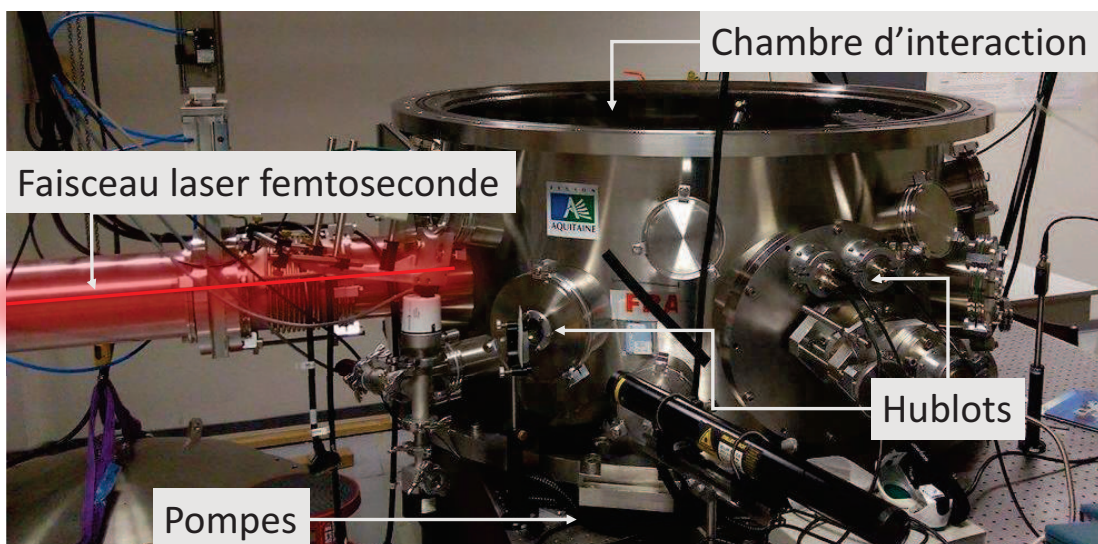


Figure 5.6: Photographie de la chambre d'interaction du laser ECLIPSE.

Source spray

Basé sur le modèle de la source utilisée et brevetée par l'équipe de S. Ter-Avetisyan [9], la source aérosol pulsée est montée sur une platine amovible et est placée au centre de la chambre d'interaction. Ce dispositif expérimental a été développé à l'ILM et usiné et conçu par la société SMGOP de Grenoble. Cette source est constituée d'une électrovanne Série 9 Pulse Valves (First Sensor) refroidie par un circuit hydraulique et alimentée par une boîte d'alimentation Iota One (Parker Hannifin Corporation). En sortie de cette électrovanne, une tuyère régulée en température, permet le chauffage de la tête de la source aérosol. Cette régulation en température (jusqu'à 110°C) est assurée par un contrôle précis de la température grâce à un thermorégulateur connecté à un thermocouple PT100 inséré dans la structure et à un fil chauffant (Thermocoax) enroulé autour de la tuyère, protégé par un sarcophage (Figure 5.7). Ce chauffage favorise la génération de gouttelette en sortie de l'électrovanne par dilatation et augmentation de la température du solvant. Un réservoir en aluminium mis sous pression (de 5 à 30 Bar) est monté en amont de l'électrovanne et permet l'injection de la solution contenant les nanoparticules dopées en Bore par l'électrovanne.

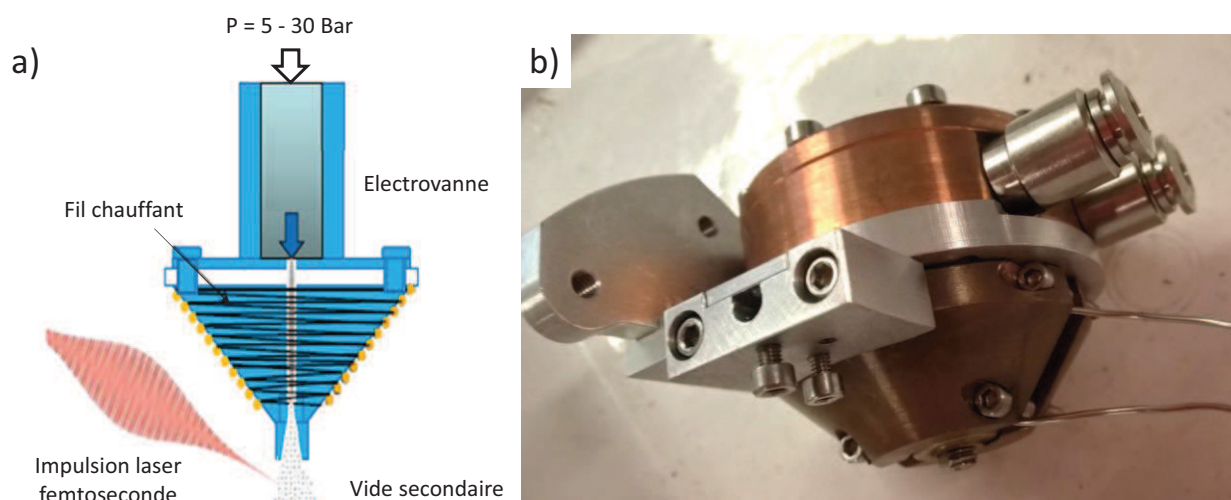


Figure 5.7: (a) Schéma de principe et (b) photographie de la source aérosol.

Dans des conditions classiques de fonctionnement, la pression du réservoir est fixée à 25 Bar, la température de la tête de la source aérosol est de 100°C. L'ouverture de l'électrovanne est déclenchée par un « signal porte » d'une dizaine de milliseconde. Une synchronisation grâce à une ligne à retard électronique entre l'impulsion laser femtoseconde et l'ouverture de l'électrovanne permet l'injection de l'aérosol dans la chambre d'interaction pour une irradiation laser efficace.

L'apport de matière a tendance à faire remonter la pression dans la chambre d'interaction imposant une cadence laser faible (environ un coup toute les 30 secondes).

Détecteurs

La détection de particules chargées accélérées se fait à l'intérieur de la chambre d'interaction (Figure 5.8) grâce à une parabole de Thomson avec un collimateur de $100\ \mu\text{m}$, placée à $100\ \text{mm}$ du point focal d'interaction. La parabole de Thomson est constituée d'un aimant permanent de longueur $l = 58\ \text{mm}$ générant un champ magnétique \vec{B} avec $B = 0.6\ \text{T}$ et de deux électrodes mises sous haute tension générant un champ électrique \vec{E} . Les particules sont détectées sur une plaque située à une distance $D = 55\ \text{mm}$ (*Imaging Plate*) recouverte d'un chromophore phosphorescent qui peut être excité par l'impact des particules chargées accélérées. La position de l'impact sur la plaque est alors connue après analyse du signal 2D de la phosphorescence de la plaque. Les particules chargées de charge q et de vitesse \vec{v} sont déviées par la force de Lorentz donnée par

$$\vec{F} = q(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}) \quad (5.4)$$

On notera que pour des soucis de qualité de signal, la parabole de Thomson n'a été utilisée qu'en tant que spectromètre magnétique : les électrodes n'ont pas été mises sous tension. On a alors $E = 0\ \text{V.m}^{-1}$. De cette façon, les particules ne sont déviées que selon le plan normal au champ magnétique de l'aimant permanent selon la relation

$$y = \frac{qDlB}{mv} \quad (5.5)$$

Où y est la déviation de la particule, D est la distance entre l'aimant et la plaque, l est la longueur de l'aimant, B est le champ magnétique de l'aimant, m la masse de la particule, q sa charge et v sa vitesse. On peut alors de cette façon reconstruire le spectre en énergie des particules détectées.

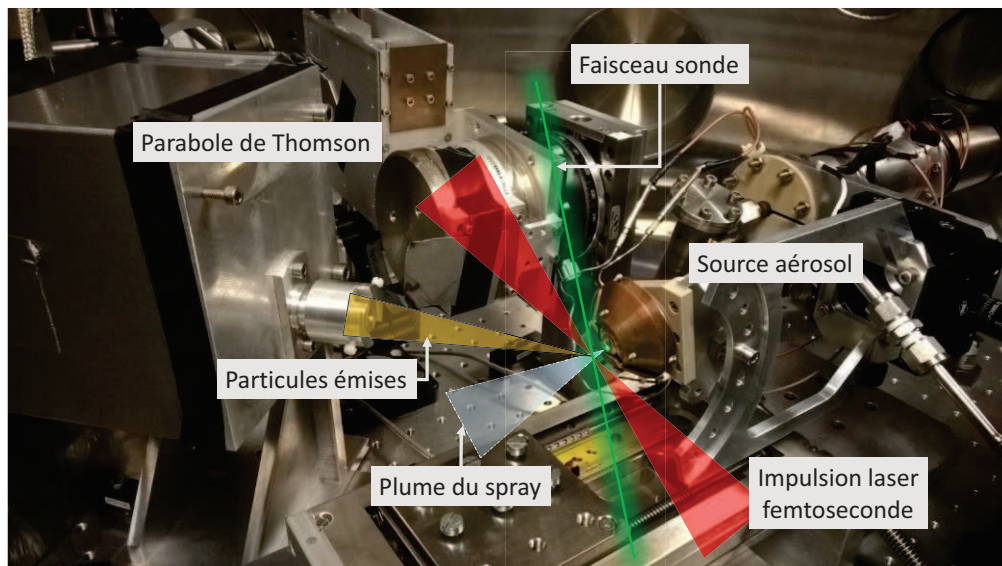


Figure 5.8: Photographie de l'intérieur de la chambre d'interaction.

5.2.2 Premiers résultats

Les premiers tests de la source aérosol ont été effectués sans l'utilisation de nanoparticules dopées en Bore. Une solution d'Ethanol pure est utilisée comme cible aérosol pour l'interaction avec le faisceau laser femtoseconde.

Caractérisation de la source spray

Je me suis particulièrement investi dans la caractérisation de la source electrospray par mesure de diffusion de lumière. Afin de déterminer le profil spatial et temporel de la source aérosol pulsée, un laser continu Hélium-Néon à 633 nm est injecté à travers un hublot et passe au centre de la chambre d'interaction pour être aligné avec la sortie de la tuyère de la source spray. Ce faisceau laser « sonde » est ensuite guidé sur un photo-détecteur (Thorlabs) à l'extérieur de la chambre d'interaction. Le signal du photo-détecteur nous donne alors une information sur la transmission du faisceau laser sonde.

Le signal du photo-détecteur est donné en Figure 5.9. Il décrit la transmission du faisceau laser Hélium-néon aligné avec la sortie de la tuyère de la source aérosol. La forte diminution du signal de transmission indique la présence d'objet diffusant dans l'axe du faisceau laser attribué aux gouttelettes d'Ethanol. L'extension temporelle de la plume de la source aérosol pulsée est alors

estimée à 4 ms pour une impulsion électrique envoyée à l'électrovanne de 18 ms. La forte diffusion du faisceau laser sonde révèle une génération de gouttelettes efficace et de grande densité. De plus, ce système de détection permet une synchronisation directe entre l'impulsion laser femtoseconde avec la source aérosol grâce à la visualisation de l'impulsion laser par le photo-détecteur (plus précisément, c'est la luminescence du plasma induit par l'impulsion laser ultra-intense qui est détectée). Cette visualisation directe permet de confirmer l'interaction entre le faisceau laser femtoseconde et la cible aérosol pulsée.

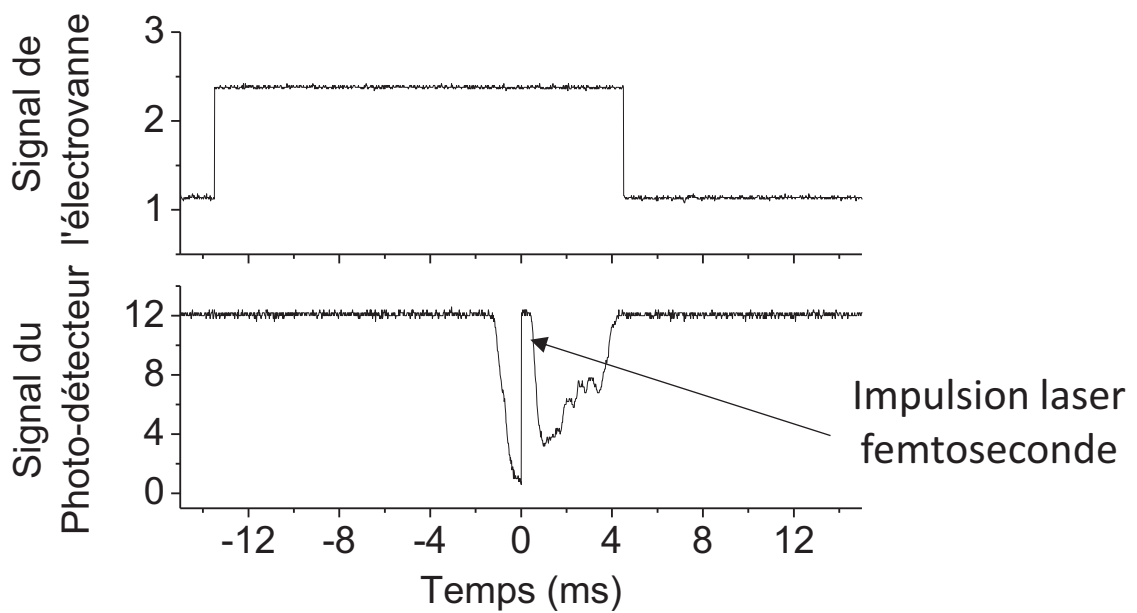


Figure 5.9: (haut) Signal d'entrée de l'électrovanne. (bas) Signal du photo-détecteur mettant en évidence le profil temporel du spray pulsé.

Interaction laser - gouttelettes

La Figure 5.10.a. donne l'analyse 2D de la plaque de détection de la parabole de Thomson. La tâche centrale, ronde et intense est attribuée à la présence de génération de rayons X. En effet, les électrons des gouttelettes sont accélérés par le champ électrique de l'impulsion laser ultra-courte et ultra-intense. En ralentissant, les électrons émettent des photons d'énergie typiquement compris dans le domaine des rayons X. Ces photons ne sont pas déviés par le champ magnétique de la parabole de Thomson et viennent exciter la substance phosphorescente de la plaque de détection.

Ils définissent alors l'axe de déviation nulle. La bande déviée indique très clairement la présence de particules très énergétiques chargées. La projection de cette bande en fonction de la déviation est donnée en **Figure 5.10.b**. Cette bande serait caractéristique de la présence de protons accélérés. Afin de lever toute ambiguïté sur la nature de ces objets, l'utilisation d'un champ électrique est nécessaire pour permettre d'avoir une résolution en masse de ces particules, mais dans cette configuration de la parabole de Thomson, le nombre d'impacts détectés serait insuffisant pour avoir un signal de bonne qualité.

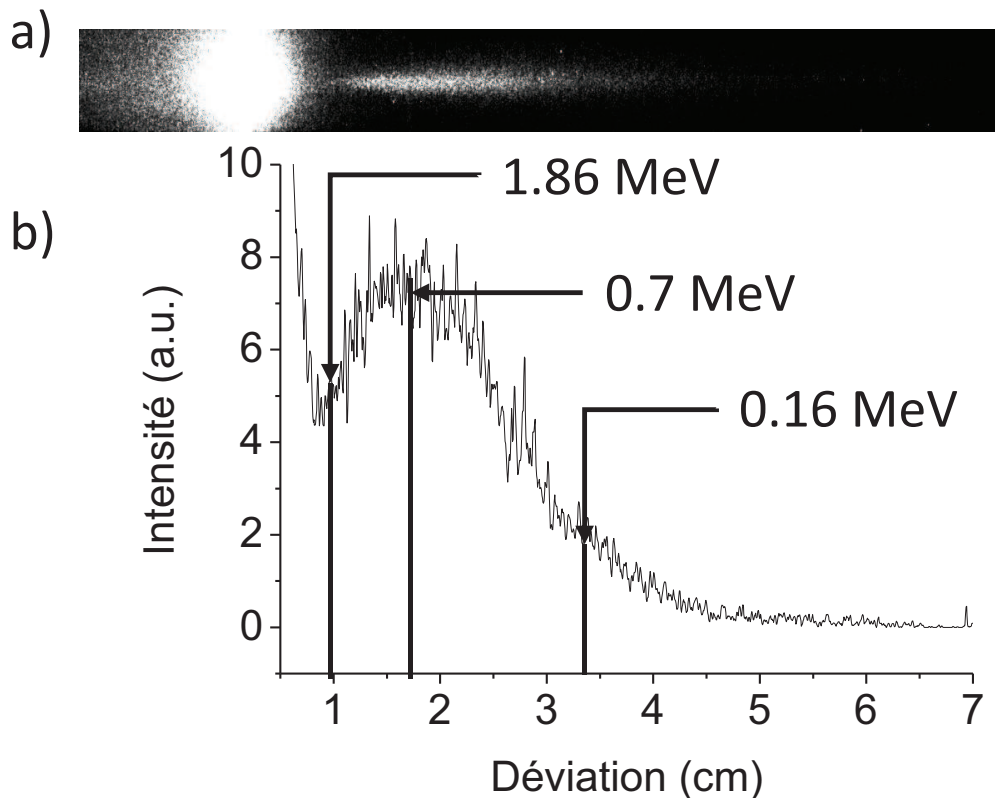


Figure 5.10: (a) Analyse 2D de la plaque de détection de la parabole de Thomson. (b) Projection de l'intensité de la bande déviée.

Grâce à l'Equation 5 une première estimation de l'énergie de ces objets est possible si on suppose que ce sont bien des protons. On montre alors que leur pic en énergie est centré autour de 0.7 MeV environ. Ces valeurs en énergie correspondent bien aux énergies de protons éjectés par explosion coulombienne de gouttelette sub-micrométriques d'après les prédictions faites par Jortner *et al.* [8].

5.2.3 Conclusion

Les premiers résultats d'une cible aérosol pour l'interaction lumière intense – matière semblent prometteurs. Un spectre de particules chargées et accélérées à des énergies proches du MeV compatible avec l'hypothèse d'explosions coulombiennes de gouttelettes sub-micrométriques d'Ethanol par une irradiation laser ultra-intense a pu être détecté. Cette première validation du concept de la source aérosol nous ouvre les portes pour l'utilisation de nanoparticules fonctionnalisées dopées en Bore pour initier des événements de fusion nucléaire.

Cependant, une caractérisation systématique de la source aérosol en fonction des paramètres de fonctionnement doit encore être menée afin d'être en mesure de contrôler la reproductibilité de la génération des gouttelettes et de nanoparticules. En particulier, une mesure en taille et en densité des objets générés est à envisager et devra être implémentée sur l'expérience. Cette caractérisation pourra être effectuée selon le modèle proposé par Ter-Avetisyan *et al.* ou selon le modèle développé dans le **Chapitre 3** de ce manuscrit. La taille des gouttelettes peut être déterminée par diffusion de Mie : la dépendance de l'intensité de la lumière diffusée par les gouttelettes de l'aérosol en fonction de l'angle de diffusion permet alors de caractériser les gouttelettes en taille. La densité de l'aérosol correspondant au nombre de gouttelette générée par unité de volume peut également être estimée grâce à la détermination de l'extension spatiale de la plume de l'aérosol complétée par des mesures de transmission de la plume [10]. De plus, une mesure quantitative du nombre de particules accélérées générées par explosion coulombienne de gouttelettes de solvant ou de nanoparticules permettra de pouvoir comparer « quantitativement » l'efficacité des cibles aérosols avec celle des cibles solides, plus traditionnelles.

5.3 Lyon – Saint-Etienne : Nanoparticule et cavitation

La seconde stratégie (Figure 5.11) pour la génération de nanoparticules en phase gazeuse a été développée en collaboration avec le Laboratoire Hubert Curien (LHC, Saint-Etienne) grâce à leur expertise en imagerie optique et à leurs connaissances sur les phénomènes d'absorption laser intense. Le concept de microréacteur pour la génération de nanoparticules fonctionnalisées en phase gazeuse a été développé au cœur du projet « ERTIGO » en utilisant deux impulsions lasers synchronisées temporellement. Ce concept consiste à piéger des nanoparticules initialement dispersées en solution dans une bulle de nano-cavitation induite par laser. La génération contrôlée d'une bulle micrométrique dans une solution colloïdale pourrait permettre le piège d'un certain nombre de nanoparticules par inertie à l'intérieur de cette microbulle pendant la phase d'expansion. Une seconde impulsion laser ultra-courte et ultra-intense synchronisée avec la durée de vie de la bulle sera alors focalisée au centre de celle-ci et viendra initier l'explosion coulombienne des nanoparticules ainsi générées en phase gazeuse. Les particules de forte énergie engendrées par l'explosion des nano – objets se propagent dans le milieu raréfié de la bulle et interagissent pour donner place à des réactions de fusion nucléaire.

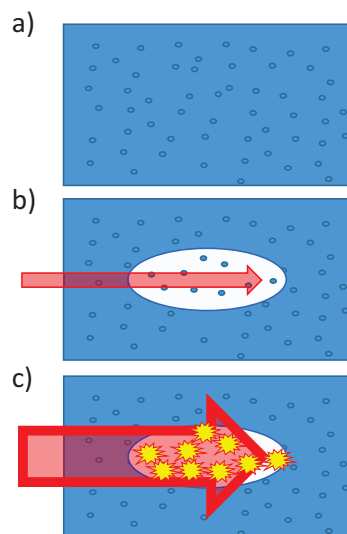


Figure 5.11: Schéma de principe. (a) Les nanoparticules sont dispersées en solution. (b) une première impulsion laser vient générer une bulle par nano-cavitation laser, piégeant les nanoparticules en milieu raréfié. (c) une seconde impulsion laser intense vient initier les explosions coulombiennes des nanoparticules, à l'origine des réactions de fusion nucléaire.

Une compréhension précise et approfondie des mécanismes d'absorption suivant la première impulsion laser permettra d'obtenir un aperçu des paramètres clés nécessaires pour une réaction de fusion efficace lors de la seconde impulsion laser. C'est pourquoi l'étude des aspects dynamiques de ce système complexe « pré-impulsion ultra-intense » est importante. En particulier, la dynamique de la bulle micrométrique ainsi que la localisation des nanoparticules lors de la formation de la bulle par cavitation ont été examinées par microscopie optique résolue en temps avec une question ouverte qui est au cœur de ce projet, est de savoir si les nanoparticules restaient confinées dans la microbulle ou bien si elles en étaient « chassées » sous l'impulsion de la dynamique de la microbulle. Un montage de « pompe-sonde » est utilisé. La première impulsion « pompe » génère la bulle qui va se détendre et une deuxième impulsion « sonde » synchronisée et décalée dans le temps par rapport à la première permet d'imager la bulle à un temps donné.

5.3.1 Montage expérimental

Un montage pour la microscopie optique de type pompe-sonde avait déjà été développé au Laboratoire Hubert Curien pour l'étude de la dynamique de dépôt d'énergie localisé spatialement et temporellement par irradiation laser par un faisceau de Bessel dans des milieux diélectriques (Figure 5.12) [11]. Ce montage expérimental a dans un premier temps été utilisé avec de légères modifications pour l'introduction d'une cellule contenant du liquide, pour l'étude de la formation d'une bulle générée par cavitation induite par laser.

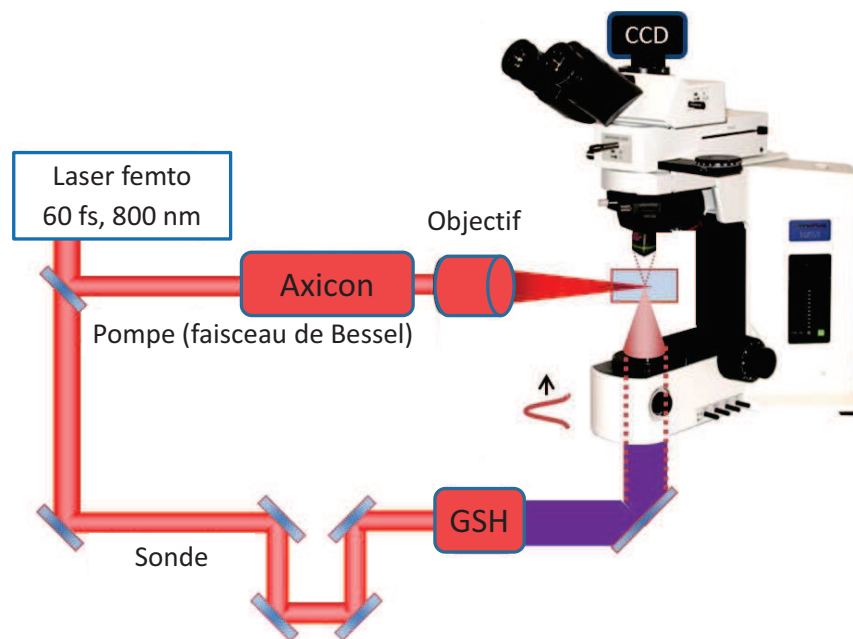


Figure 5.12: Montage expérimental avec une observation pompe-sonde résolue en temps.

Génération du faisceau de Bessel

Un laser Ti:Sapphire amplifié ultra-rapide est utilisé comme système d'illumination. La durée de l'impulsion laser est de 60 fs et est centrée à 800 nm avec un taux de répétition de 1 kHz (Legend, Coherent). La génération d'impulsion unique est possible grâce à un système d'obturateurs optoélectroniques et mécaniques. L'enveloppe temporelle des impulsions peut être contrôlée de 60 fs à quelques picosecondes via le compresseur. En fonction des conditions de tir laser, l'énergie d'une impulsion est de quelques dizaines de μJ .

Parmi les différentes méthodes pour générer des faisceaux non-diffractant par intersection conique [12], l'ordre zéro d'un faisceau de Bessel [13] a été utilisé. C'est un faisceau laser « non-propagatif » étroit et intense généré depuis un faisceau gaussien par une lentille axicon (angle de la pointe de l'axicon est de 179°). La forme conique de l'axicon permet alors une superposition d'ondes planes générant le faisceau laser de Bessel par interférences constructives (Figure 5.13).

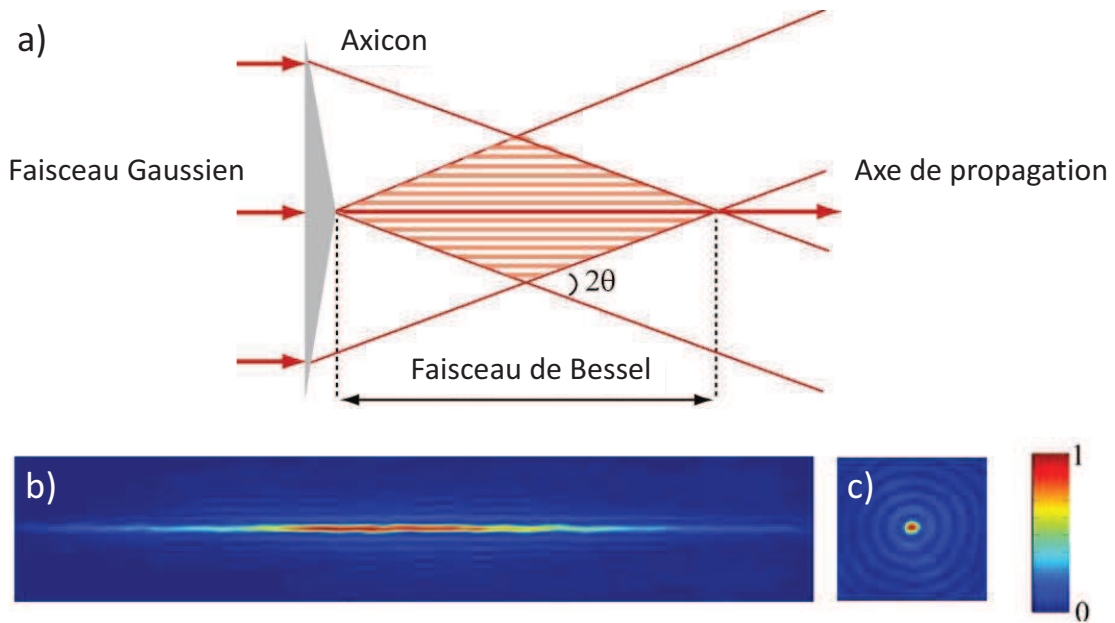


Figure 5.13: Description d'un faisceau de Bessel. (a) Principe de fonctionnement de l'axicon. Cette optique conique permet la génération d'un faisceau de Bessel depuis un faisceau Gaussien par interférences constructives. Simulation de l'intensité d'un faisceau de Bessel projetée (b) selon l'axe de propagation et (c) selon un plan transversal à l'axe de propagation du faisceau laser.

Le cœur du faisceau de Bessel est élargi puis focalisé dans l'échantillon en utilisant un système d'imagerie afocal $4f$ [11] avec un objectif de microscope comme élément final d'imagerie. Un filtrage spatial a permis de ne pas provoquer de pertes dues à la pointe de l'axicon. Différentes conditions de focalisation ont été explorées : lorsque la focalisation est modérée, l'ouverture numérique de l'objectif utilisé est de 0.28, avec $\theta = 8.7^\circ$ et un diamètre du faisceau de Bessel de $1.5 \mu\text{m}$. Lorsque la focalisation est étroite, l'ouverture numérique de l'objectif utilisé est de $\text{NA} = 0.42$, avec $\theta = 16.5^\circ$ et un diamètre du faisceau de Bessel de $0.7 \mu\text{m}$.

Microscopie résolue en temps

L'observation est faite par microscopie optique en utilisant un système de type pompe-sonde à deux couleurs résolue en temps. L'installation pour l'imagerie est basée sur un microscope optique vertical (Olympus BX-51) fonctionnant en mode d'éclairage diascopie en transmission optique ou en contraste de phase. Un objectif d'ouverture numérique de 0.4 a été utilisé pour l'observation permettant une résolution spatiale de 600 nm pour une longueur d'observation à 400 nm. En microscopie par transmission optique, les régions diffusantes ou absorbantes apparaissent sombres sur un fond clair. En microscopie par contraste de phase, les modifications de la phase du faisceau sonde induites par un changement d'indice de réfraction de l'échantillon Δn négatif (respectivement Δn positif) apparaissent brillants (respectivement sombre) ou sur un fond gris.

Pour la technique d'imagerie pompe-sonde, le faisceau laser pulsé est séparé en deux par un diviseur de faisceau. Le faisceau pompe à 800 nm est utilisé pour la génération du plasma dans l'échantillon, et le faisceau sonde est utilisé pour l'imagerie. La fréquence du faisceau sonde est doublée par Génération de Seconde Harmonique (GSH) avec un cristal de β -borate de baryum (BBO). Le chemin optique du faisceau sonde (ligne à retard) est différent que celui du faisceau pompe : le contrôle de la longueur de ce chemin optique permet d'induire un retard entre la génération du plasma (la pompe) et l'acquisition de l'image de l'échantillon (la sonde) avec une précision de l'ordre de la picoseconde (l'impulsion laser parcourt 300 millimètres en 1000 picoseconde). Ce retard temporel est piloté par une platine de translation motorisée. Cette technique permet alors une analyse dynamique résolue en temps par une illumination stroboscopique. Le faisceau pompe et le faisceau sonde ont la même durée d'impulsion, cependant, la dynamique du système étudié est beaucoup plus longue que la durée de l'impulsion, ce qui n'influence en rien la résolution temporelle de la mesure.

L'échantillon est imagé à la perpendiculaire de l'axe d'excitation (autrement dit, le faisceau pompe se propage selon l'horizontale et le faisceau sonde, selon la verticale) en utilisant une technique d'illumination de Köhler, nous donnant une information à la fois sur l'amplitude et sur la phase du signal. L'utilisation de diffuseur monté en rotation sur le trajet optique du faisceau sonde permet de réduire sa cohérence spatiale, augmentant ainsi l'uniformité de l'illumination. Le faisceau sonde entre dans le microscope par le condenseur du microscope. Les images (microscopie en

transmission optique et microscopie en contraste de phase) sont enregistrées dans le plan focal image par une caméra EMCCD (ANDOR iXon Ultra 897) à rétroéclairage électronique. Un filtre d'émission passe-bande ± 5 nm centré sur la longueur d'onde du faisceau sonde (ici, à 400 nm) est utilisé pour couper toute lumière parasite provenant de la diffusion du faisceau pompe à 800 nm, ou de l'émission de l'échantillon (la luminescence du plasma par exemple). La cohérence spatiale et temporelle du faisceau sonde induit la présence de tâches lumineuses, appelée aussi « tavelures », « speckles » ou « points chauds » ce qui impose que l'on superpose 50 acquisitions afin de « gommer » ces tâches et d'obtenir une image correcte.

Des cuvettes scellées en quartz de chemin optique 5 mm x 5 mm et de 1.25 mm d'épaisseur de paroi (101.057-QS, Hellma Analytics) ont été utilisées. La cuvette est placée à l'horizontale directement sur le porte-échantillon du microscope monté sur des platines de rotation utilisées pour l'alignement fin de la cuvette par rapport à l'axe du laser d'excitation.

5.3.2 Dynamique Ultra-rapide : la formation d'une microbulle par nano-cavitation

Les matériaux tels que l'air, l'eau ou certains types de verres sont transparents : ils laissent passer la lumière. Mais si la lumière devient trop intense, il peut se produire un « claquage optique » [14], [15]. En effet, un matériau est transparent si la différence d'énergie entre le niveau de valence et le niveau de conduction est plus grande que l'énergie d'un photon. Cependant, en augmentant l'intensité lumineuse, l'absorption simultanée de plusieurs photons devient possible et permet d'exciter des électrons de la bande de valence vers la bande de conduction. Ces électrons de haute énergie peuvent continuer d'absorber d'autres photons de telle sorte que leur énergie devienne suffisamment grande pour exciter un autre électron de la bande de valence. La répétition de ce processus conduit à une cascade d'ionisation : les électrons acquièrent globalement une grande énergie et ne sont plus liés à leur atome respectif. On se retrouve alors avec un nouvel état de la matière chaude et dense : un plasma.

L'utilisation de faisceaux lasers pulsés, de l'ordre de la centaine de femtoseconde, permet d'atteindre des intensités lumineuses importantes et de générer un plasma de façon très localisée spatialement et temporellement : la focalisation du faisceau laser permet d'atteindre une très grande intensité lumineuse au point focal du laser pendant la durée de l'impulsion, générant ainsi un

plasma focalisé très chaud. Sans source externe d'excitation, le plasma se relaxe : par recombinaison, les électrons retournent progressivement dans leur état fondamental par émission d'un photon ; le plasma se refroidit et se dilate très rapidement. Si le faisceau laser est focalisé dans un milieu liquide, la relaxation rapide du plasma, les changements brutaux des conditions de température et de pression induisent la formation d'une bulle par cavitation [16],[17].

Un faisceau de durée d'impulsion de 5.6 ps avec une énergie de 18 μJ en condition de focalisation étroite est focalisé dans une cuvette contenant de l'eau, le diamètre du faisceau de Bessel au point focal est estimé à 0.7 μm , ce qui correspond à une intensité d'environ $I = 10^{14} \text{ W.cm}^{-2}$. Lorsque le faisceau sonde est bloqué et en l'absence du filtre d'émission, seuls les photons issus de la luminescence du plasma sont visibles. Dans cette configuration, nous sommes capables de visualiser le plasma directement permettant l'alignement du système de détection (Figure 5.14.a). L'extension spatiale selon l'axe longitudinal du plasma ainsi générée est due à l'utilisation de faisceaux de Bessel. En effet, le point focal d'un faisceau de Bessel n'est pas à proprement parlé un point, mais une droite, dirigée dans le sens de propagation. Afin d'observer la microbulle, le retard du faisceau sonde est fixé à 17.5 ns (retard optique maximum compte tenu de la dimension du montage expérimentale). La superposition de 50 acquisitions (correspondant à la moyenne de 50 microbulles générées par 50 impulsions lasers différentes) donne l'image de la microbulle 17.5 ns après la formation du plasma (Figure 5.14.b). L'acquisition de cette image est donc étalée sur plusieurs minutes : entre deux tirs laser consécutifs, il faut attendre le retour du système à l'équilibre et le temps d'acquisition informatique d'une image. Plusieurs remarques peuvent être faites. Bien que cette image soit le résultat de la superposition de plusieurs dizaines d'acquisitions, les contours de l'objet observé sont assez bien définis, montrant la reproductibilité et la stabilité du montage expérimental. De plus, la forme de la bulle correspond à l'extension spatiale du plasma : la bulle générée n'est pas sphérique mais ellipsoïdale, avec comme grand axe, l'axe de propagation du faisceau de Bessel. A 17.5 ns, le diamètre du grand axe est d'environ 150 μm , et celui du petit axe est de 12 μm . De plus, la propagation d'une onde de pression est visible de part et d'autre de la bulle. Compte tenu de la distance entre le front d'onde et le centre de la bulle (i.e. l'axe de l'excitation laser), on peut estimer que la vitesse de propagation de cette onde de pression est au maximum de 2000 m.s^{-1} , ce qui est plus rapide que la vitesse de propagation du son dans l'eau

[18]. Cette onde de pression est induite par les modifications brutales des conditions de température et de pression à la relaxation du plasma, à l'origine de la cavitation [19].

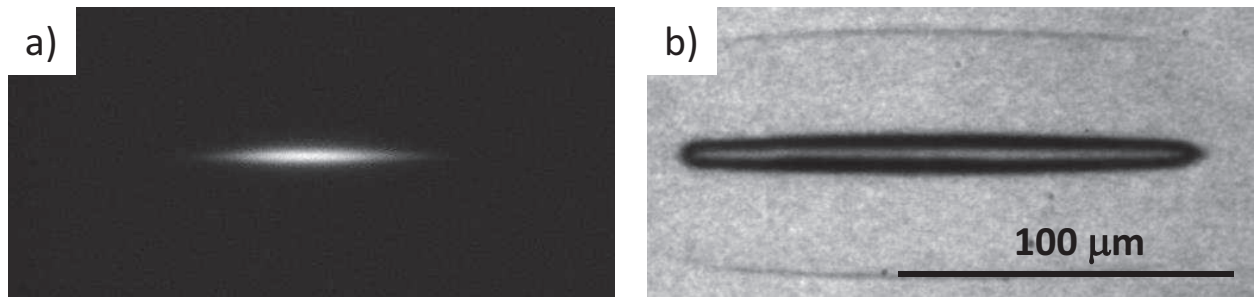


Figure 5.14: (a) Image du plasma généré par un faisceau laser de 5.6 ps et d'énergie 18 μJ en condition de focalisation étroite. (b) Image de la bulle micrométrique générée par nano-cavitation 17.5 ns après l'impulsion laser. 50 acquisitions ont été superposées. La bulle au centre et son onde de pression associée sont clairement visibles.

La forme de la bulle a pu être caractérisée à 17.5 ns pour différentes excitations (Figure 5.15), en faisant varier l'énergie de l'impulsion laser (E_p) ainsi que son enveloppe temporelle (τ_p).

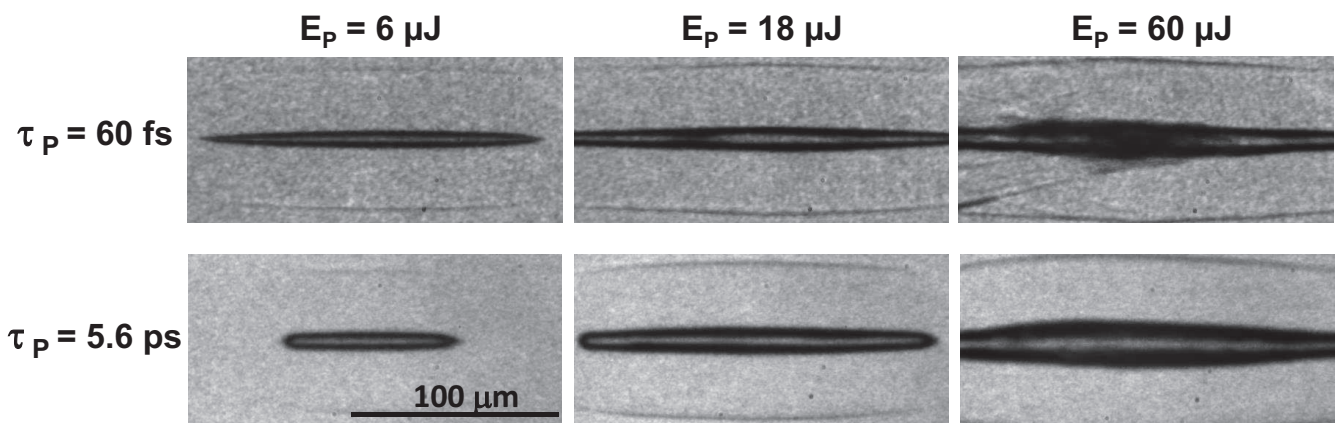


Figure 5.15: Images de la bulle micrométrique à 17.5 ns après l'impulsion laser pour différentes conditions d'excitation laser. 50 acquisitions ont été superposées.

Pour les basses énergies, la dimension de la microbulle est peu affectée par la temporalité de l'excitation. Cependant, on montre alors que lorsque l'impulsion laser est sub-picoseconde, la stabilité de la bulle est compromise pour les hautes énergies. En effet, dès 18 μJ on peut observer une distorsion de la surface de la bulle ainsi qu'une inhomogénéité du front de l'onde de pression. Ce phénomène peut être mis sur le compte des phénomènes de filamentation : pour de telles intensités, l'auto-focalisation du faisceau laser par effet Kerr (effet optique non-linéaire) peut

déformer le profil du faisceau de Bessel et induire une génération de plasma non-uniforme [20]. Ces instabilités peuvent aussi être observées lorsque la durée de l'impulsion laser est de l'ordre de la picoseconde pour les hautes énergies. Afin d'obtenir des microbulles bien caractérisées, nous ne travaillerons que dans une gamme d'énergie pour avec un régime stable.

La Figure 5.16.a et la Figure 5.16.b montrent l'existence d'un seuil de cavitation : c'est l'énergie minimum de l'impulsion laser nécessaire pour la formation d'une microbulle par cavitation. Ce seuil est caractérisé avec une observation à 17.5 ns et est estimé à 0.9 μJ pour une impulsion de 60 fs et à 2.5 μJ pour une impulsion de 5.6 ps en condition de focalisation étroite. La Figure 5.16.c montre que cette énergie seuil de cavitation, dépend des conditions d'excitation. L'exploration de ce seuil d'énergie a été menée par deux angles d'axicon différents.

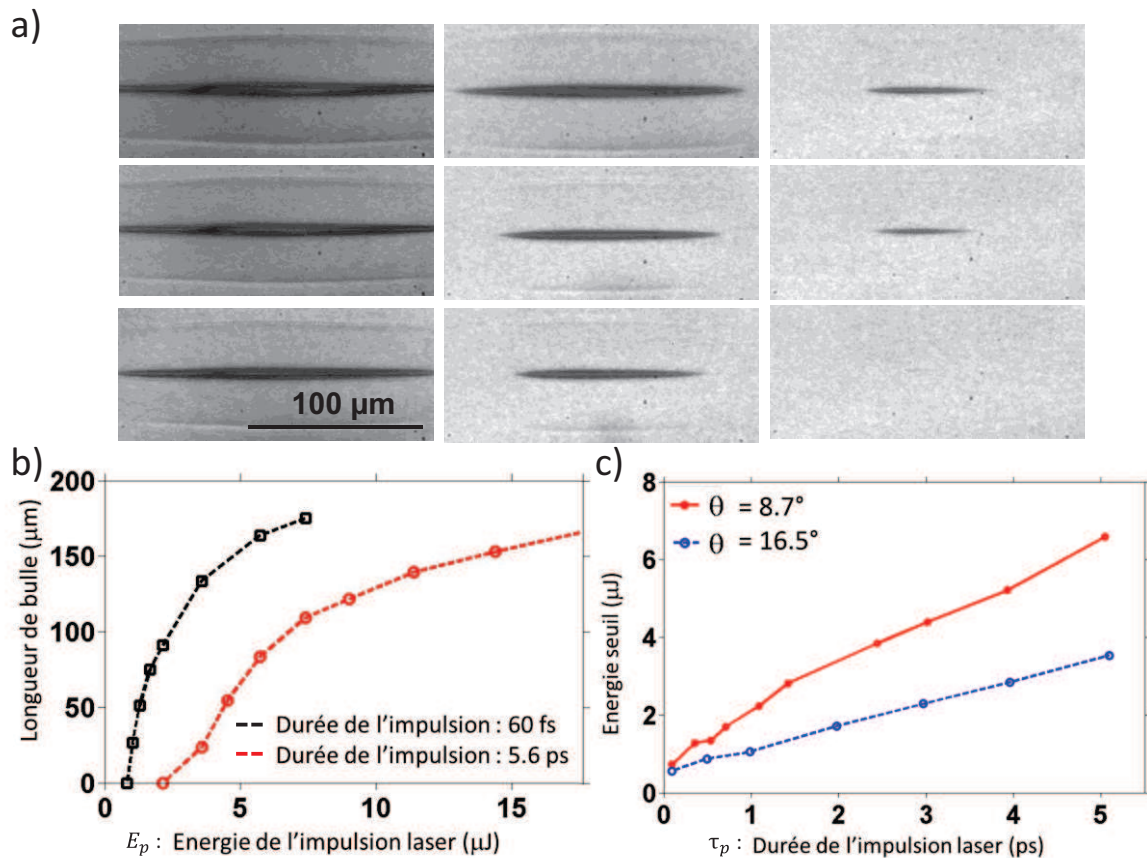


Figure 5.16: (a) Images de la bulle micrométrique à 17.5 ns après l'impulsion laser pour différentes énergies laser pour une impulsion de durée 60 fs. 50 acquisitions ont été superposées. (b) Longueur de la bulle en fonction de l'énergie de l'impulsion laser pour deux durées d'impulsion différentes. (c) Energie seuil de cavitation en fonction de la durée de l'impulsion laser pour deux conditions de focalisation différentes.

Globalement, lorsque la focalisation est étroite (i.e. lorsque $\theta = 16.5^\circ$ et que le diamètre du faisceau de Bessel est de $0.7 \mu\text{m}$), le seuil d'énergie par impulsion est plus bas que lorsque la focalisation est modérée (i.e. lorsque $\theta = 8.7^\circ$ et que le diamètre du faisceau de Bessel est de $1.5 \mu\text{m}$). De plus, l'énergie seuil suit une dépendance linéaire avec la durée de l'impulsion : plus l'impulsion est courte, plus le seuil de claquage est bas. Cela est cohérent avec le fait que le seuil de génération du plasma dépend de l'intensité laser (correspondant à la puissance d'une impulsion par unité de surface). Pour une énergie laser donnée, plus la dimension focale est petite, plus l'intensité est grande, et de la même façon, plus la durée de l'impulsion laser est courte, plus l'intensité laser est grande.

Grâce à la ligne à retard « optique » et à la technique d'illumination stroboscopique, la dynamique ultra-rapide de la formation de la bulle a pu être explorée pour les régimes sub-picoseconde et picoseconde (Figure 5.17). Ainsi, on observe que dès les temps courts, c'est-à-dire pour un retard $< 100 \text{ ps}$, une tache sombre sur l'axe de l'excitation laser est d'ores et déjà visible, c'est l'ouverture de la bulle. Quelques centaines de picosecondes plus tard, la génération et la propagation de l'onde de pression est également observable.

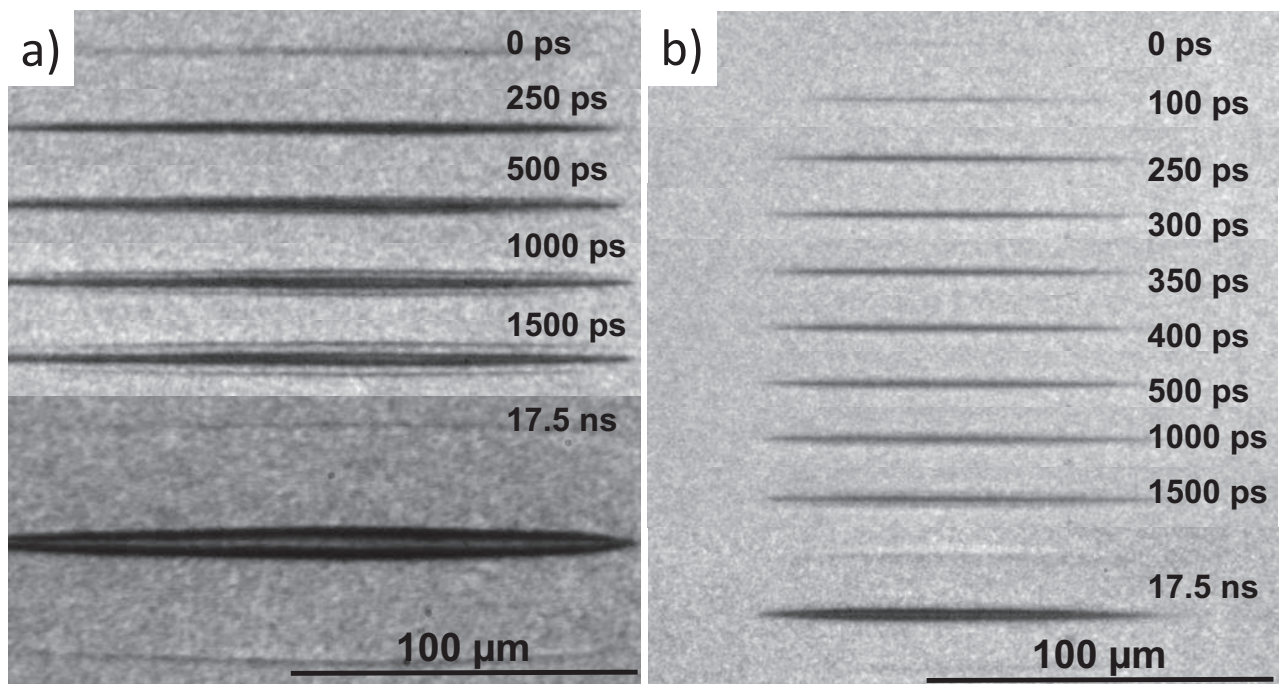


Figure 5.17: Images de la bulle micrométrique à différents temps après l'impulsion laser d'excitation pour une impulsion laser de durée (a) 60 fs et (b) 5.6 ps. 50 acquisitions ont été superposées.

5.3.3 Les limites de l'imagerie optique pompe-sonde

Le montage expérimental pompe-sonde tel qu'il a été présenté est efficace pour explorer la dynamique ultra-rapide de la formation de la microbulle pour des temps inférieurs à nanoseconde jusqu'à quelques nanosecondes. Cependant, cette technique d'imagerie est basée sur la moyenne d'un grand nombre d'acquisitions et d'un grand nombre de tirs laser séparés de plusieurs secondes. Nous rappelons ici que l'objectif de ce projet est l'étude dynamique de la microbulle en présence de nanoparticules. Il faut alors que nous puissions visualiser par microscopie les nanoparticules sur une image. Le mouvement brownien des nanoparticules rend cet exercice impossible dans cette configuration : entre deux acquisitions, le mouvement aléatoire des particules empêche tout suivi. La faible qualité d'une image enregistrée pour une acquisition unique, c'est-à-dire pour un tir laser unique est donnée en **Figure 5.18**.

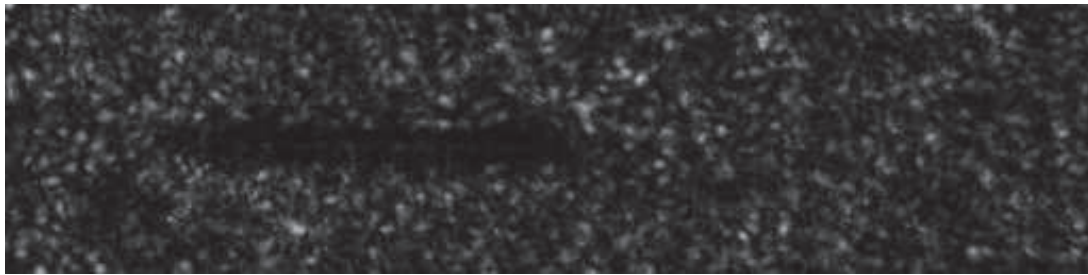


Figure 5.18: Image de la bulle micrométrique obtenue après un tir laser unique (une seule acquisition).

Comme dit précédent, c'est la présence de tavelures (ou speckles) qui entache la qualité de l'image et empêche d'avoir une image extraite depuis un tir laser unique. Cet artéfact aléatoire prend son origine dans le caractère cohérent du faisceau laser utilisé pour l'illumination. En effet, malgré le diffuseur utilisé pour casser la grande cohérence spatiale du faisceau sonde, ce phénomène est dû aux interférences entre les rayons diffusés par chaque point de l'échantillon observé [21]. Afin de pouvoir effectuer l'acquisition d'une image sur un tir laser unique, la nécessité de développer une nouvelle source d'illumination impulsionnelle, intense et non-cohérente vient donc de façon naturelle. Je me suis particulièrement investi dans le développement d'une telle source de lumière durant mon travail de thèse.

5.3.4 Le laser Aléatoire

La variété des sources lumineuses est grande. On peut s'intéresser à classer quelques-unes de ces sources en fonction de leur intensité et de leur cohérence spatiale (Figure 5.19). Par exemple, les lampes à incandescence sont connues pour leur simplicité. La nature thermique de la lumière, par rayonnement du corps noir, impose une décohérence spatiale des trains d'onde de la lumière. Cependant, l'intensité lumineuse de ces lampes est très faible, d'autant plus lorsque l'on souhaite une illumination pulsée de l'ordre de quelques nanosecondes. Les lasers ou les diodes superluminescentes sont quant à eux particulièrement intenses, mais par construction, leur émission est hautement cohérente [22]. Il existe un certain nombre de sources lumineuses pulsées d'intensité élevée et de faible cohérence spatiale. D'une part, on peut citer l'utilisation des diodes pulsées dont le développement est de plus en plus intensif afin d'atteindre des luminosités suffisantes pour l'imagerie [23]. Mais, en générale, cette instrumentation reste soit très onéreuse, soit pas assez performante pour la microscopie optique qui nécessite un éclairage de l'échantillon important. D'autre part, les lampes flash sont basées sur l'émission d'un plasma généré par un arc électrique intense dans un gaz et peuvent atteindre de grandes intensités lumineuses pour une durée de pulse de l'ordre de la dizaine de nanosecondes. Néanmoins, la bande d'émission du plasma des lampes flash est très large, ce qui restreint son domaine d'application lorsque l'on souhaite effectuer une sélection en longueur d'onde de l'émission.

Le laser aléatoire est une technologie laser atypique encore peu exploitée pour l'imagerie optique résolue en temps [24]. Dans ce paragraphe, nous présenterons les principes physiques de base de l'émission d'un laser aléatoire et nous verrons alors que l'émission pulsée d'un laser aléatoire est non-cohérente, très intense et avec une bande d'émission étroite, rendant son utilisation idéale pour des applications en microscopie optique.

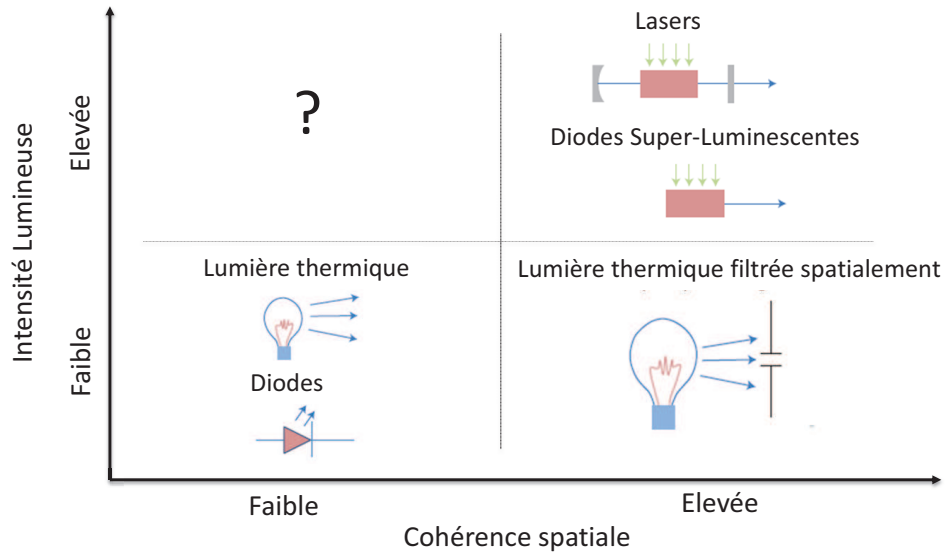


Figure 5.19: Représentation graphique de la problématique des techniques d'illumination pour la microscopie optique. [22]

Principe

Brièvement, en physique des lasers, trois mécanismes fondamentaux sont mis en jeu : l'absorption, l'émission spontanée et l'émission stimulée. Les diagrammes de Jablonski simplifiés de ces mécanismes sont donnés en Figure 5.20. Afin de fixer les idées, considérons un système à quatre niveaux d'énergie.

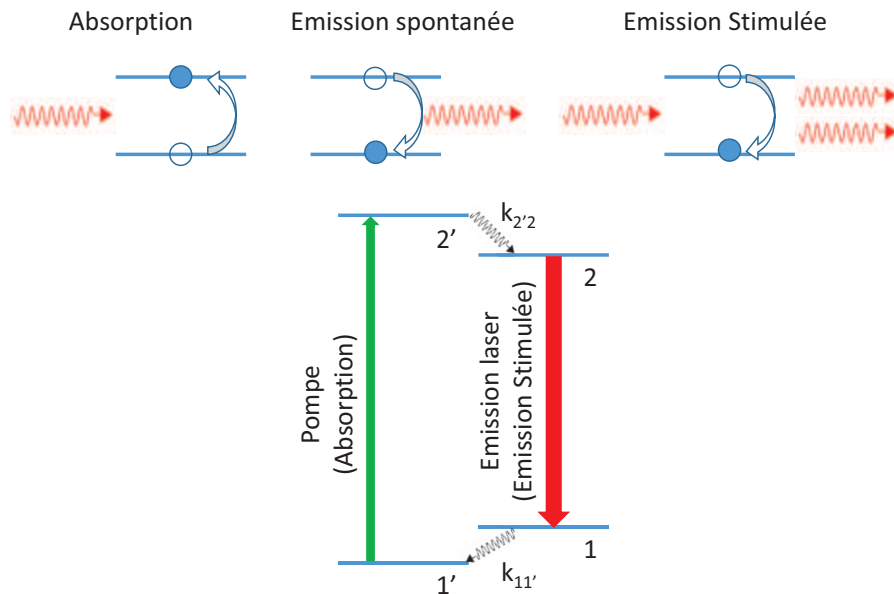


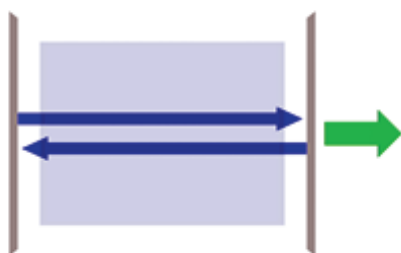
Figure 5.20: Description des mécanismes mis en jeu lors du processus laser accompagné d'un diagramme de Jablonski simplifié pour un système à quatre

Pour que l'effet laser se produise, il est nécessaire que l'état excité de la transition laser (état 2) soit plus peuplé que son état fondamental (état 1). Pour cela, il faut apporter de l'énergie au système à travers l'absorption de photon « pompe » permettant la transition entre l'état 1' et l'état 2'. L'état 2 est alors peuplé par transitions non-radiatives rapides ($k_{2'2}$) depuis l'état 2', et l'état 1 est dépeuplé par transitions non-radiatives rapides ($k_{11'}$). Si l'apport en énergie de la pompe est suffisamment important (existence d'un seuil laser), l'état 2 reste suffisamment peuplé pour que l'émission stimulée soit amplifiée par rétroaction positive : un photon émis après émission spontanée de la transition de l'état 2 vers l'état 1 peut induire une émission stimulée, générant ainsi deux photons, qui peuvent à leur tour induire de nouvelles émissions stimulées, et ainsi de suite.

Dans un laser classique, cette rétroaction qui permet l'amplification de l'émission stimulée est assurée par la présence d'une cavité optique résonnante autour du milieu amplificateur : on parle alors de rétroaction cohérente. Par construction, c'est la présence de cette cavité optique qui impose le caractère cohérent du faisceau laser et l'émission laser est directionnelle selon l'axe de la cavité optique

Prédit par Letokhov *et al* en 1966 [25], le laser aléatoire est une technologie laser sans cavité optique. L'amplification de l'émission stimulée est alors assurée, non pas par une cavité optique, mais par la diffusion multiple et aléatoire des photons dans un milieu amplificateur hautement désordonné. On parle de rétroaction incohérente. L'émission du laser aléatoire se fait alors dans toutes les directions (Figure 5.21).

Milieu
amplificateur dans une cavité optique



Particules diffusantes dans un milieu
amplificateur

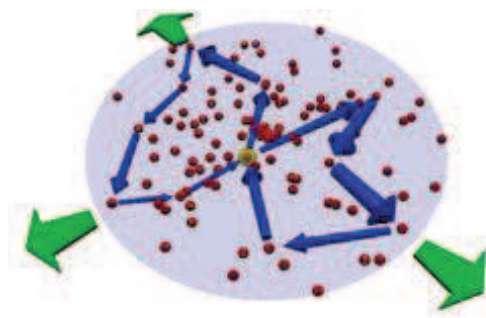


Figure 5.21: A gauche, principe d'un laser « classique ». La rétroaction est assurée par une cavité optique. A droite, principe d'un laser aléatoire. La rétroaction est assurée par les diffusions multiples et successives dans le milieu amplificateur.

Dans le cadre de notre étude, une solution de Rhodamine B dans l’Ethanol avec une concentration de $[RhB] = 5 \text{ mM}$ a été utilisée comme milieu amplificateur. Des nanoparticules de latex de 325 nm de diamètre en suspension colloïdale (synthétisées selon le protocole décrit dans le **Chapitre 2**) à une concentration de $[NP] = 4.10^{15}$ particules par litre (p/L) ont joué le rôle de diffuseur dans le milieu amplificateur. Cette solution est ensuite versée dans une cuvette en quartz 1x10 (110-1-40, Hellma Analytics) et est utilisée comme laser aléatoire. Le pompage du milieu amplificateur a été réalisé par un laser YAG doublé à 532 nm (Q-smart 450, Quantel Laser). La durée de l’impulsion laser de la pompe est de 6 ns opérant à 10 Hz, et la puissance moyenne maximum du système est de 2.2 W. La puissance de sortie de la tête laser peut être pilotée manuellement grâce à un atténuateur de puissance.

La concentration en nanoparticules dans le milieu amplificateur est telle que la pénétration de la lumière dans le milieu est très limitée. En effet, par analogie avec la loi de Beer Lambert, on peut décrire l’atténuation de l’intensité lumineuse I à la position l dans un milieu diffusif par

$$I(l) = I_0 e^{-l/l_d} \tag{5.6}$$

Où I_0 est l’intensité lumineuse à la position $l = 0$ (i.e. avant de pénétré dans l’échantillon) et l_d , la longueur caractéristique de pénétration dans le milieu diffusant définie par

$$l_d = \frac{1}{[NP]\sigma_{np}} \tag{5.7}$$

Où σ_{np} est la section efficace d’une particule de latex de 325 nm de diamètre et $[NP]$ la concentration en nanoparticule dans la solution. La théorie de Mie peut alors donner la section efficace de diffusion d’une lumière à 532 nm par une nanoparticule de latex de 352 nm dans l’Ethanol connaissance l’indice de réfraction de la particule [26]. On a alors $\sigma_{np} = 6.10^{-10} \text{ cm}^2$. La longueur caractéristique de pénétration dans le milieu diffusif peut être estimée à $l_d \sim 5 \mu\text{m}$. Elle correspond à la distance moyenne entre les événements de diffusion Autrement dit, après quelques dizaines de micromètres, la solution est complètement opaque. Le volume du milieu amplificateur pompé est donc très faible et localisé en surface de la cuvette.

Sur le principe, les diffusions multiples à l'origine du phénomène de cavité optique sont aléatoires et non-cohérentes. Cependant, dans certaines conditions de propagation dans le milieu amplificateur, on peut imaginer qu'un photon suive un « cycle de diffusion fermé ». Une rétroaction cohérente est alors observable, on parle de localisation d'Anderson [27], .

Propriétés

Les principales propriétés du laser aléatoire ont été explorées afin de déterminer les éléments clés pour être dans des conditions optimales d'illumination pour la microscopie optique. Comme dit précédemment, le volume du milieu amplificateur pompé est localisé sur la surface de la cuvette. L'émission du laser aléatoire ne se fait alors que dans le demi-espace extérieur à la solution avec un maximum d'émission à la perpendiculaire de la cuvette comme schématisé en **Figure 5.22**. Pour cette raison, l'attaque du faisceau pompe sur la cuvette du laser aléatoire se fait avec un grand angle, et la collection du signal émis se fait selon la normale de la cuvette directement avec un montage similaire au montage décrit pour la détection de la fluorescence statique au **Chapitre 1**. La grandeur physique pour caractériser la puissance fournie au milieu amplificateur par la pompe est la fluence lumineuse. Elle est définie comme l'énergie par impulsion laser par élément de surface (donnée en Joule par centimètre carré – $J.cm^{-2}$) et est indépendante de la durée de l'impulsion.

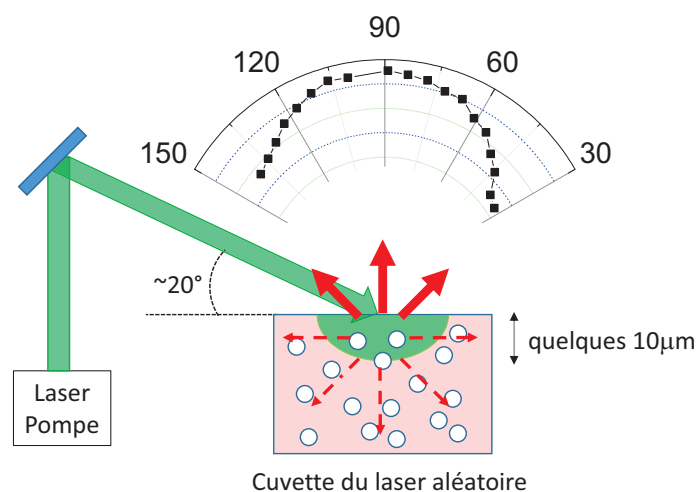


Figure 5.22: Schéma de principe montrant l'anisotropie de l'émission du laser aléatoire. Le graphique représente le maximum de l'émission du laser aléatoire en fonction de l'angle de collection.

Les spectres d'émission du milieu amplificateur en présence ou non de particules de latex sont donnés en **Figure 5.23.a**. Très clairement, plusieurs phénomènes caractéristiques sont visibles. Pour une fluence de pompe identique, on peut observer une amplification du signal d'émission et un rétrécissement de la bande d'émission centrée à 595 nm en présence de nanoparticules. De plus, on observe l'existence d'un seuil de pompage en-dessous duquel l'amplification et le rétrécissement de la bande d'émission ne sont pas visibles (**Figure 5.23.b**). L'amplification, la sélection en longueur d'onde, et la présence d'un seuil de pompage sont des éléments caractéristiques des émissions lasers. La **Figure 5.23.c** montre l'évolution du spectre d'émission en fonction de la fluence de la pompe.

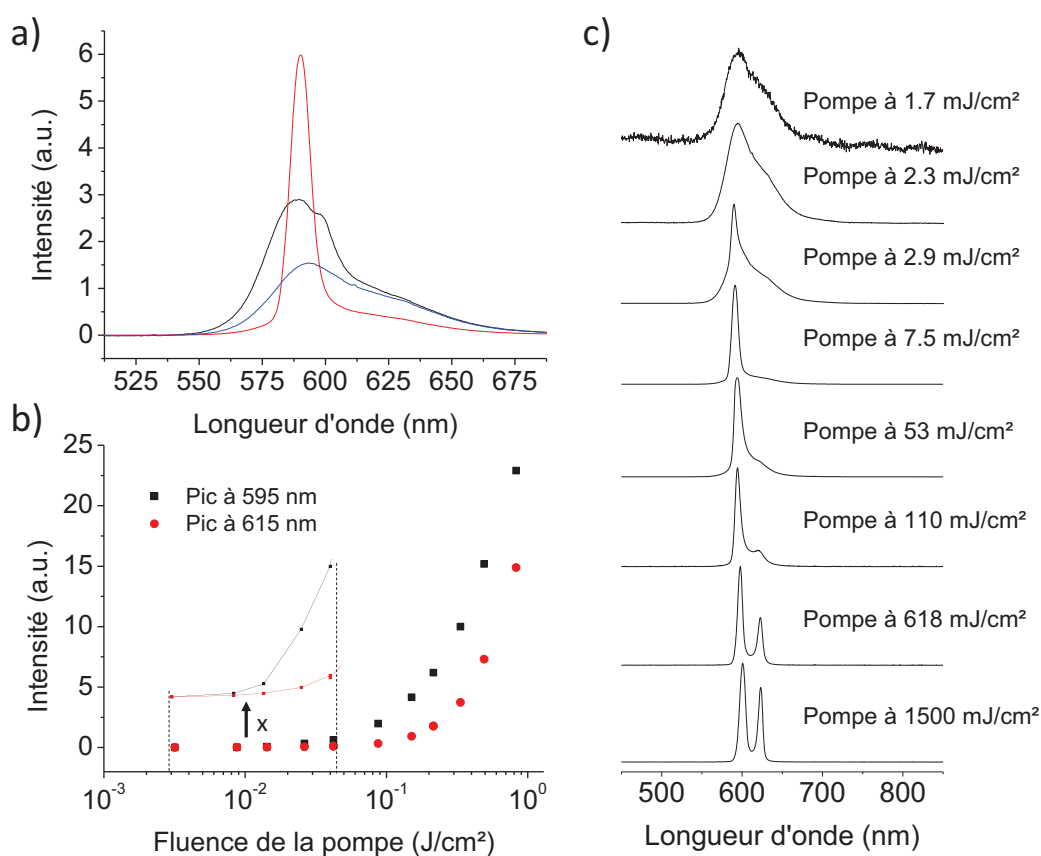


Figure 5.23: (a) Spectres d'émission de (noir) une solution de Rhodamine B à 5 mM pompée à 7.5 mJ/cm², (bleu) une solution de Rhodamine B en présence de nanoparticules pompée à 2.3 mJ/cm² (sous le seuil laser) et (rouge) une solution de Rhodamine B en présence de nanoparticules pompée à 7.5 mJ/cm² (au-dessus du seuil laser) divisée par un facteur 10. (b) Evolution du maximum d'intensité à 595 nm et à 615 nm de l'émission du laser aléatoire (solution de Rhodamine B en présence de nanoparticules) en fonction de la fluence de la pompe. (c) Evolution du spectre d'émission du laser aléatoire (solution de Rhodamine B en présence de nanoparticules) pour différentes fluences de la pompe.

Pour les grandes fluences de la pompe on peut voir l'apparition d'un second pic laser à 615 nm. Ce second pic peut être attribué à l'émission des dimères de Rhodamine B présents en solution dans le milieu amplificateur [28] [29]. Le premier seuil laser est estimé à 3 mJ.cm^{-2} , et celui du second est estimé à 100 mJ.cm^{-2} .

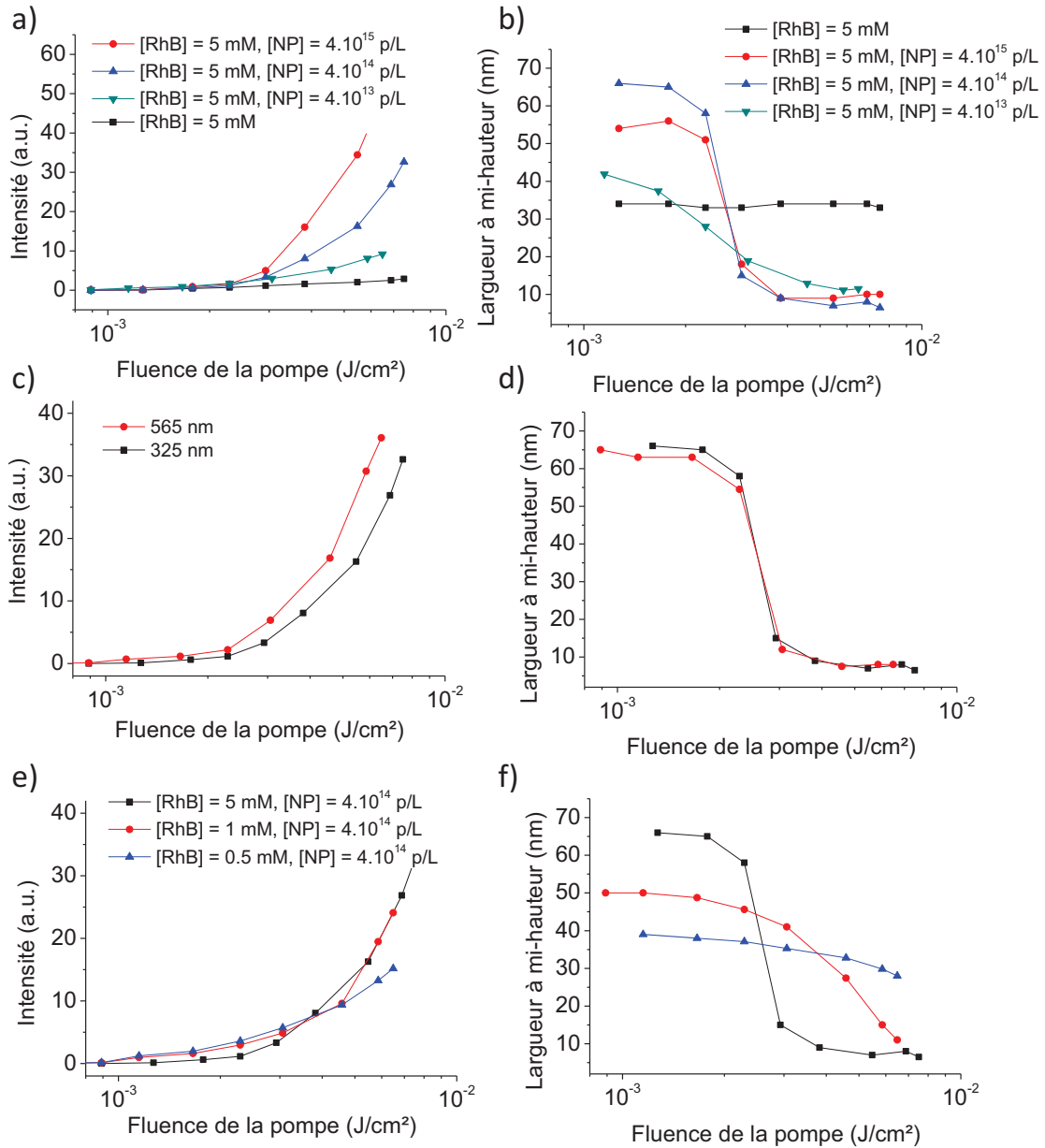


Figure 5.24: (a,c,e) Intensité et (b,d,f) largeur à mi-hauteur du spectre d'émission du laser aléatoire en fonction de la fluence de la pompe pour différents milieux amplificateurs. (a,b) En fonction de la concentration en nanoparticules, (c,d) en fonction du diamètre des nanoparticules et (e,f) en fonction de la concentration en Rhodamine B.

L'intensité de l'émission du laser aléatoire en fonction de la fluence de la pompe est donnée pour différentes concentrations de nanoparticule de latex en suspension dans le milieu amplificateur en [Figure 5.24.a](#). L'existence d'un seuil laser est clairement visible lorsque le milieu amplificateur possède des propriétés diffusives. Ce seuil peut être défini plus précisément grâce à la largeur à mi-hauteur du spectre d'émission qui passe brutalement de 60 nm à environ 8 nm ([Figure 5.24.b](#)).

On montre alors que la solution de Rhodamine B en l'absence de nanoparticule ne présente aucun signe caractéristique d'amplification, ni de rétrécissement de son spectre d'émission lorsque la fluence laser de la pompe augmente. De plus, on remarque que plus la concentration en nanoparticule est grande, plus l'amplification laser est importante. Intuitivement, on comprend que si le nombre d'éléments diffusifs augmente dans le volume du milieu amplificateur pompé, le nombre d'évènements de diffusion augmente. Un photon restera alors plus longtemps piégé dans le milieu amplificateur. De la même façon, plus la taille de la nanoparticule est grande, plus la diffusion sera efficace, et plus l'émission sera amplifiée ([Figure 5.24.c](#)). De plus, la dépendance de l'émission du laser aléatoire en fonction de la concentration en chromophore a été étudiée ([Figure 5.24.e](#)). On montre alors que plus la concentration en chromophore est grande, plus le seuil laser de l'émission du laser aléatoire est bas : le seuil laser est atteint plus facilement puisque le gain du milieu amplificateur est plus grand.

La [Figure 5.25](#) montre l'impact de la dimension de la tâche du laser de pompe sur le seuil laser du milieu amplificateur. A puissance constante, lorsque le diamètre de la tache focale diminue, la fluence lumineuse par impulsion laser augmente, cependant, le volume du milieu amplificateur pompé diminue également et donc le seuil laser est plus difficilement atteint. Un équilibre entre fluence de la pompe et intensité du signal doit alors être trouvé pour optimiser l'émission du laser aléatoire.

Enfin, on peut souligner que la durée de l'impulsion laser YAG doublé utilisé pour le pompage (6 ns) est plus grande que la durée de vie de l'état excité du chromophore utilisé comme milieu amplificateur (la durée de vie de la Rhodamine B est d'environ 2.5 ns dans l'Ethanol). Ainsi, la temporalité de l'impulsion du laser aléatoire est proche de celle de la pompe. Cependant, pour un pompage par une impulsion laser plus courte (typiquement picoseconde), la durée de l'impulsion du laser aléatoire n'est pas triviale et nécessite une étude approfondie [30].

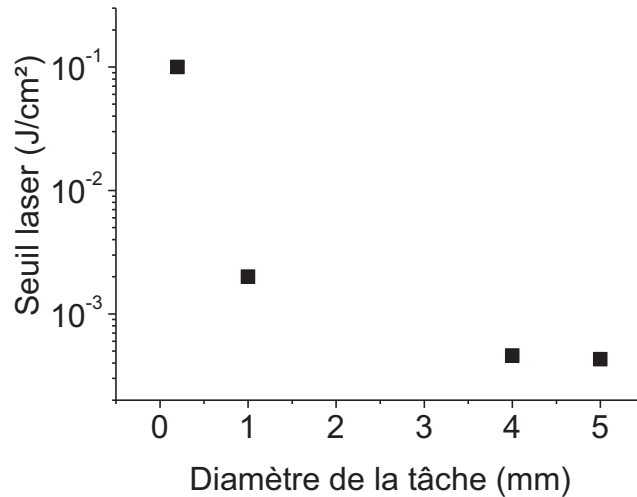


Figure 5.25: Seuil laser en fonction de la dimension de la tâche focale du laser utilisée pour le pompage du milieu amplificateur.

Implémentation

Le faisceau laser utilisé pour le pompage du laser aléatoire attaque la cuvette du laser aléatoire avec un grand angle et est légèrement focalisé afin d'obtenir une tâche focale de 3 mm sur la cuvette du laser aléatoire. Afin de collecter l'émission du laser aléatoire, une grande lentille asphérique condenseur de 75 mm de diamètre et de courte focale (60 mm) a été utilisée (ACL7560U-A, Thorlabs). Cette lentille de collection est placée à 60 mm de la cuvette du laser aléatoire afin de pouvoir injecter la lumière collectée dans le microscope en direction du condenseur pour l'alignement de l'illumination. L'énergie de l'impulsion du laser aléatoire ainsi collectée est alors mesurée par un photo-détecteur (PM10V1, Coherent) fonction de l'énergie de l'impulsion de la pompe (Figure 5.26). On montre alors que pour des valeurs bien au-dessus du seuil laser, l'énergie de l'impulsion du laser aléatoire varie linéairement avec l'énergie de l'impulsion de la pompe. Le rendement du laser aléatoire est alors estimé à 4%.

Compte tenu du faible volume du milieu amplificateur pompé, du volume total de la cuvette et de la grande stabilité de la solution utilisée, la durée de vie du laser aléatoire est très grande : sur toute la durée des expériences effectuées, nous n'avons pas observé de perte d'intensité d'émission du laser aléatoire même en opérant à 10 Hz (cadence de la pompe), tant que la solution était régulièrement mélangée, scellée et convenablement stockée.

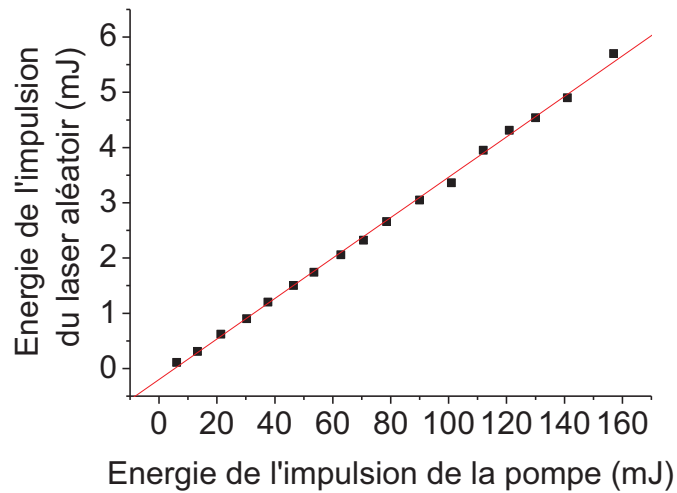


Figure 5.26: Evolution de l'énergie de l'impulsion laser collectée en fonction de l'énergie de l'impulsion laser de la pompe.

La synchronisation des impulsions du laser Ti:Sapphire utilisée pour générer le plasma et du laser YAG double en fréquence utilisé pour le pompage du laser aléatoire est assurée par une ligne à retard électronique. Ainsi les deux impulsions peuvent être déclenchées de façon synchronisée avec un *jitter* électronique d'environ 50 ns avec un retard possible allant de 0 à 100 ms permettant une exploration dynamique importante. La Figure 5.27 donne une représentation schématique du nouveau montage expérimental développé (Figure 5.28).

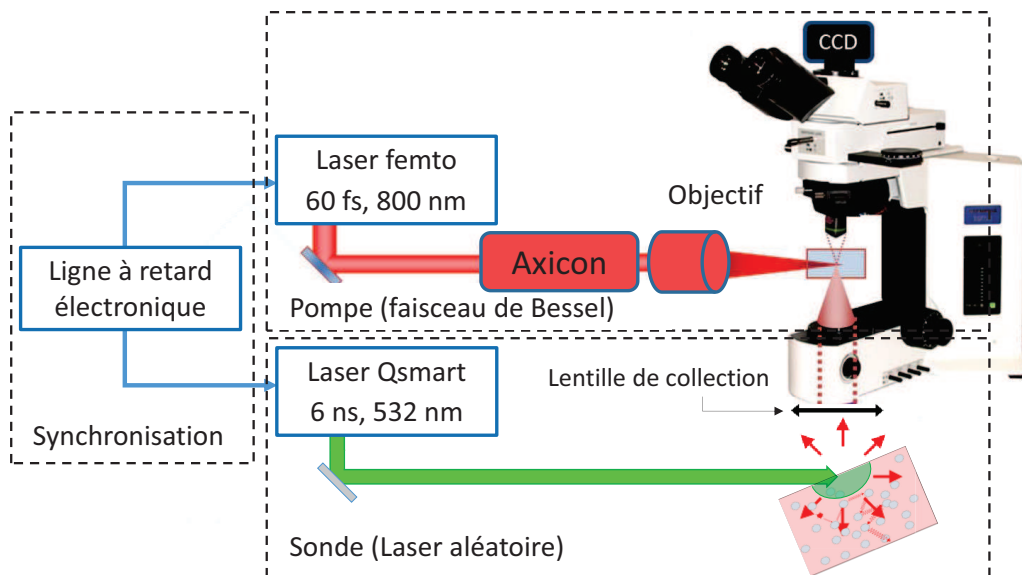


Figure 5.277: Montage expérimental avec une illumination par un laser aléatoire sonde résolue en temps.

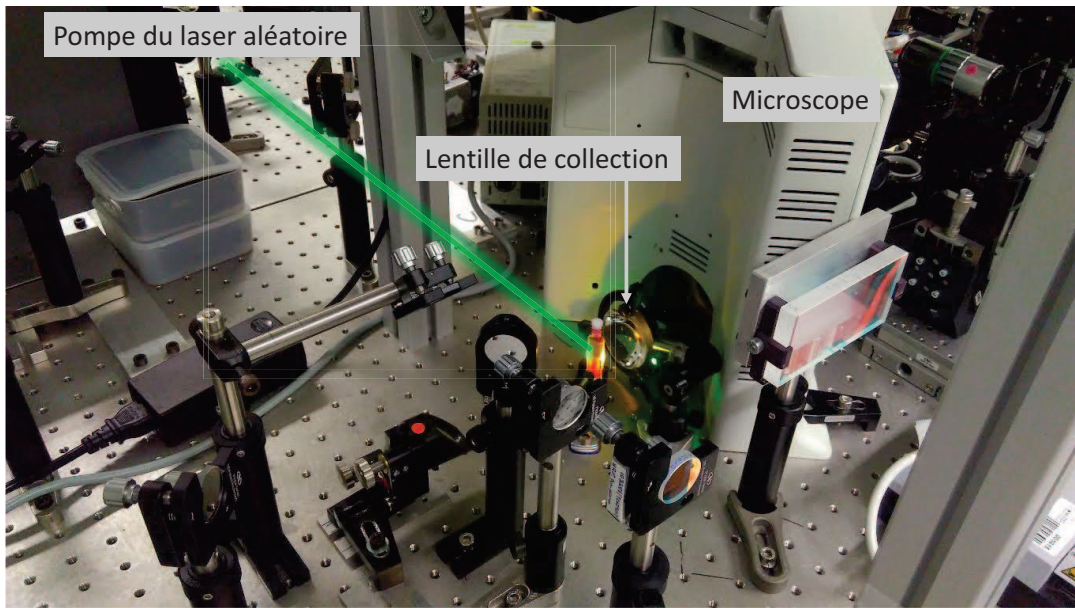


Figure 5.28: Photographie de l'implémentation du laser aléatoire comme source d'illumination pour la microscopie optique.

5.3.5 Dynamique de la microbulle en présence de nanoparticules

Afin d'observer la microbulle par une imagerie avec laser aléatoire, le retard de l'illumination est fixé dans un premier temps à 100 ns. La Figure 5.29 donne l'image exacte de la microbulle 100 ns environ (présence d'un *jitter* électronique) après la formation du plasma. L'acquisition de cette image a été réalisée suite à un unique tir laser dans l'eau avec une durée d'impulsion de 50 fs d'énergie 5.37 μJ en condition de focalisation étroite. L'absence de tavelures est une preuve directe de l'incohérence spatiale de l'illumination du laser aléatoire. Les contours de la bulle observée sont très bien définis : la temporalité de l'illumination est de l'ordre de quelques nanosecondes, ce qui reste petit devant la dynamique de la bulle.

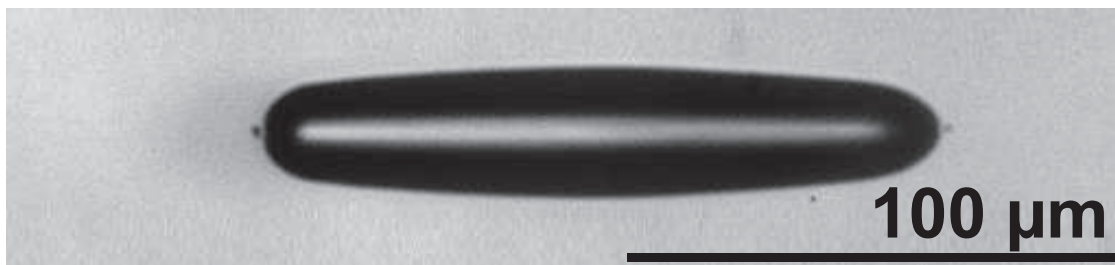


Figure 5.29: Image de la bulle micrométrique générée par nano-cavitation 100 ns après l'impulsion laser. L'acquisition est réalisée suite à un unique tir laser.

On mesure sur cette image tout l'intérêt et le potentiel pour l'imagerie d'utiliser ce type de source de lumière non-cohérente à base de laser à colorant.

L'interface solvant – gaz de la bulle est bien délimitée par une surface sombre. Le cœur de la bulle semble être plus clair que le fond de l'image. Cela peut être dû à un effet de lentille convergente de la surface de la bulle qui se trouve hors du plan focal de l'image. La Figure 5.30 redémontre l'existence du seuil de cavitation pour une excitation femtoseconde à 120 fs et picoseconde à 4 ps caractérisé avec une observation à 100 ns environ.

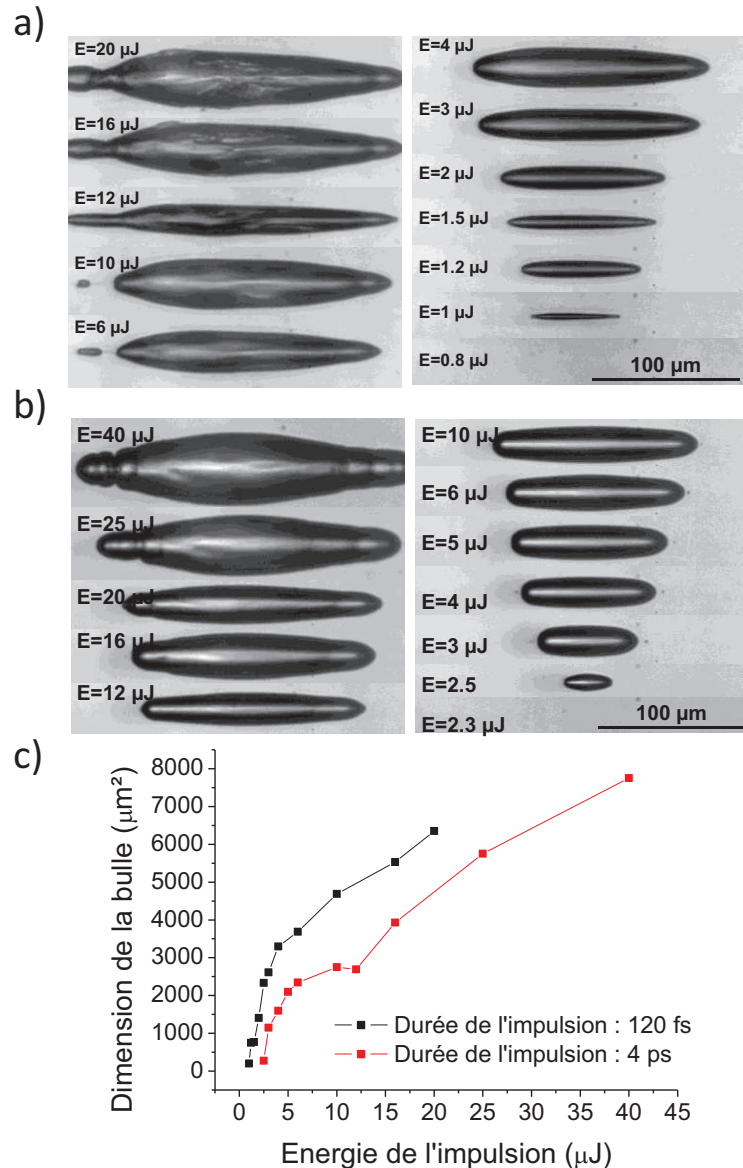


Figure 5.30: Images de la bulle micrométrique à 100 ns après l'impulsion laser pour différentes énergies laser pour une impulsion de durée (a) 120 fs et (b) 4 ps. (c) Dimension de la projection de la bulle en fonction de l'énergie de l'impulsion laser pour ces deux durées d'impulsion différentes.

La qualité des images permet de voir très nettement les instabilités de la microbulle à sa surface pour les hautes énergies. Les valeurs de ces seuils de cavitation pour les excitations sub-picoseconde et picoseconde sont alors de l'ordre de ceux déterminés précédemment (respectivement $1 \mu\text{J}$ et $2.3 \mu\text{J}$), validant cette technique d'illumination.

Grâce à la ligne à retard électronique, la dynamique complète de la microbulle a pu être explorée dans différents solvants pour des tirs laser uniques. La [Figure 5.31](#) et la [Figure 5.32](#) donnent la dynamique des microbulles générées par une impulsion laser de 50 fs avec une énergie de $5.37 \mu\text{J}$ en condition de focalisation étroite dans l'eau et dans un solvant de grande viscosité : l'Ethylène Glycol.

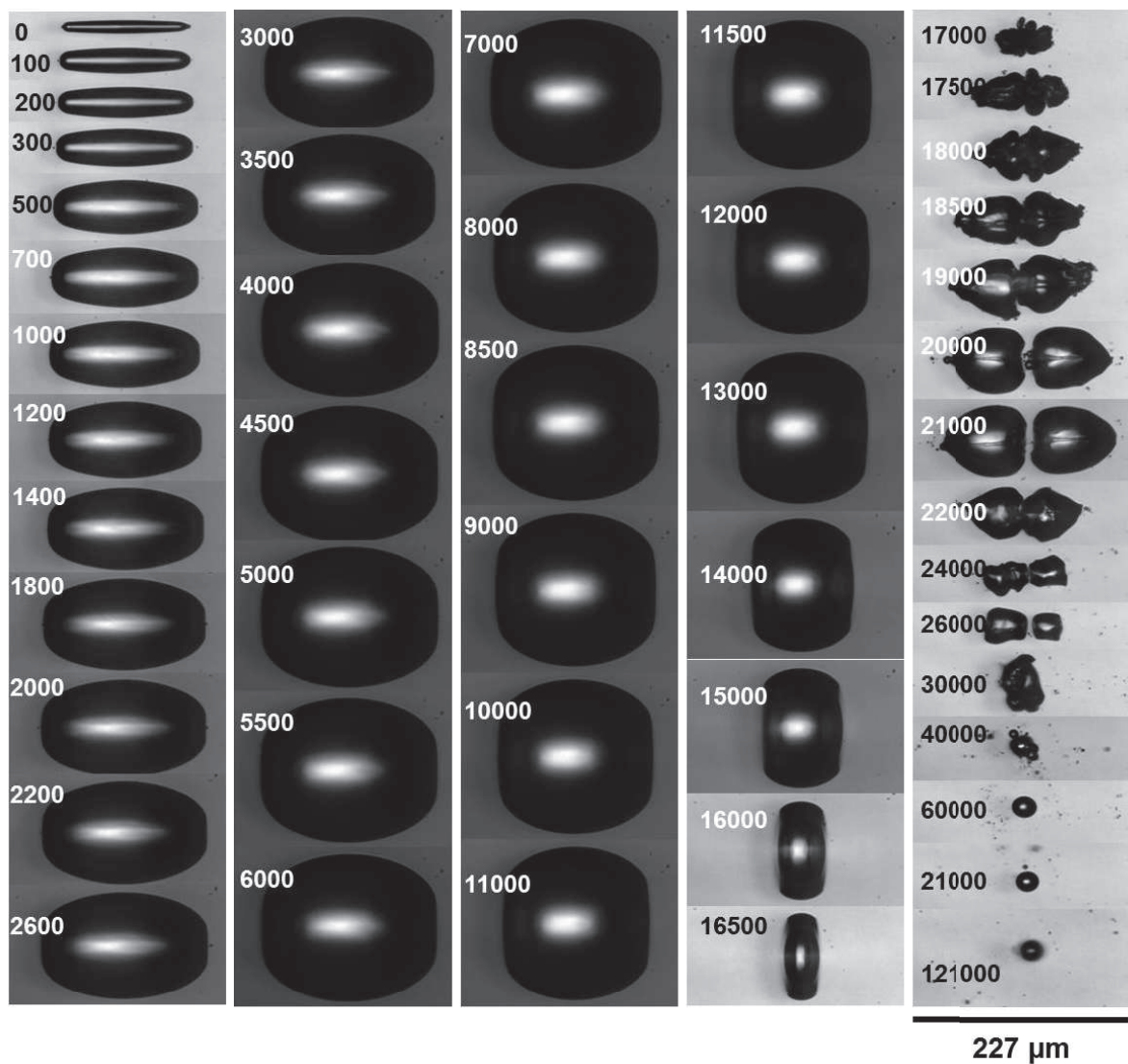


Figure 5.31: Dynamique d'une microbulle générée dans l'eau par une impulsion laser de 50 fs et d'énergie $5.37 \mu\text{J}$. Le délai entre l'excitation laser et l'acquisition de l'image est donné sur chaque image en nanoseconde.

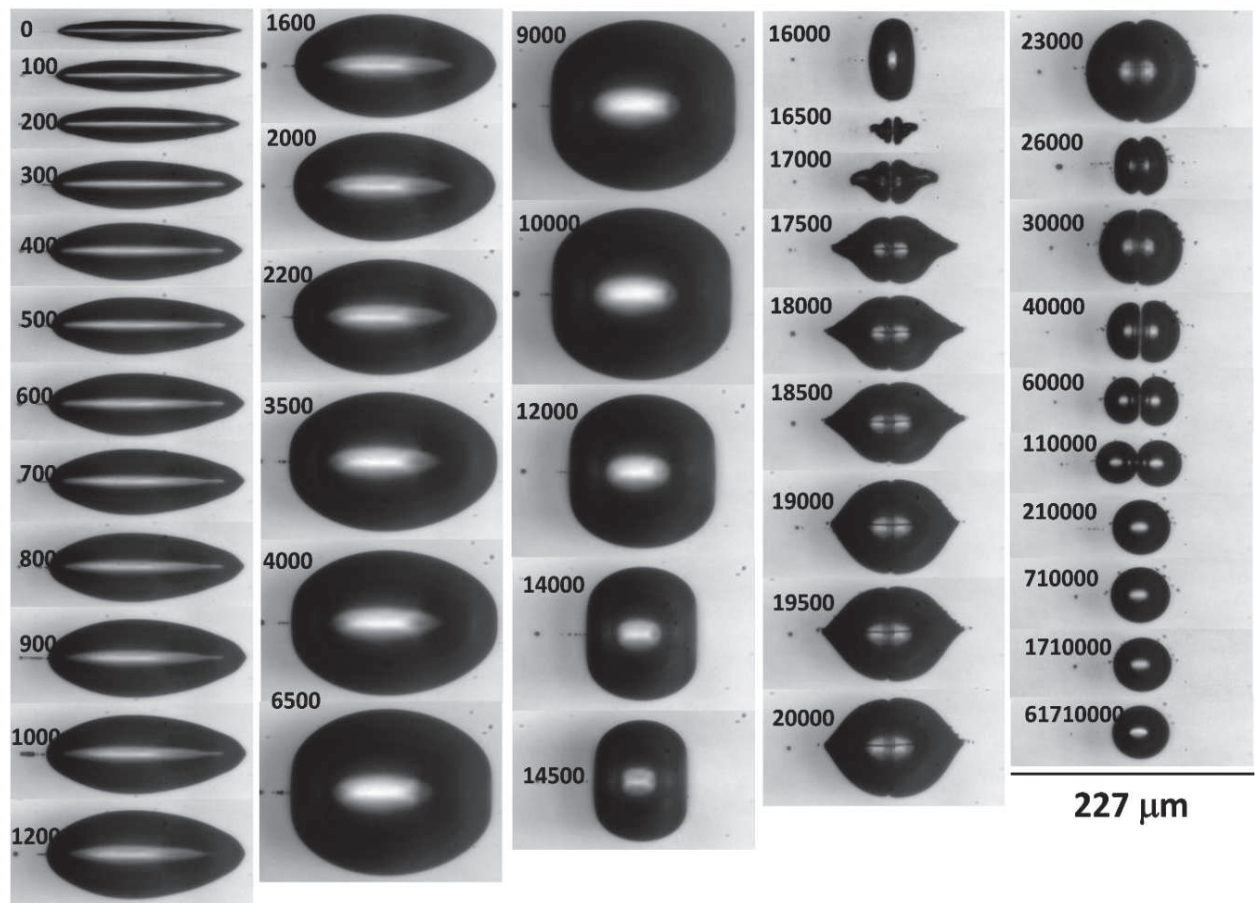


Figure 5.32: Dynamique d'une microbulle générée dans l'Ethylène Glycol par une impulsion laser de 50 fs et d'énergie 5.37 μJ. Le délai entre l'excitation laser et l'acquisition de l'image est donné sur chaque image en nanoseconde.

Quel que soit le solvant utilisé, l'expansion et l'effondrement de la microbulle suivis d'un ou plusieurs rebonds caractéristiques des bulles générées par cavitation sont observés [31], [32]. De plus, bien que ces images ne soient pas enregistrées à partir d'une seule et même bulle, mais par effet stroboscopique, la faible déviation de l'évolution de la dimension de la microbulle confirme une fois de plus la stabilité de la génération par cavitation laser. La géométrie de la bulle générée par le faisceau de Bessel impose une expansion spatiale non homogène de la bulle. Lors de la phase d'expansion, la dimension du grand axe de la bulle reste inchangée : la microbulle se dilate uniquement selon son axe transversal jusqu'à atteindre une forme quasi-sphérique lorsque son volume est maximum. Et inversement, l'effondrement de la microbulle se fait selon l'axe longitudinal. Lors de la seconde oscillation, la bulle subit une fission : les forces hydrodynamiques intenses mises en jeu à cause de l'asymétrie de la bulle donnent naissance à deux nouvelles

microbulles selon l'axe longitudinal qui poursuivent ensuite leur série de dilatation - effondrement. Malgré le caractère aléatoire de cette fission, elle est observée à chaque tir laser. Lorsque la viscosité du solvant est grande, les contours des objets issus de cette fission sont mieux définis et semblent moins chaotiques. Nous pouvons considérer la surface totale de l'objet projetée dans le plan d'observation comme paramètre dimensionnel de ces objets dont la forme évolue au cours du temps. De cette façon, la [Figure 5.33](#) donne la dynamique de la microbulle en cours du temps dans l'eau et l'Ethylène Glycol. La durée de vie de la microbulle correspondant au temps de la première oscillation suivant la formation de la bulle est estimée à $15.3 \mu\text{s}$ dans l'eau et à $16.4 \mu\text{s}$ dans l'Ethylène Glycol. Ensuite, les oscillations continuent, réduisant la taille de la bulle initiale jusqu'à la survie d'une bulle stable qui sort du plan focal de l'objectif du microscope après quelques millisecondes.

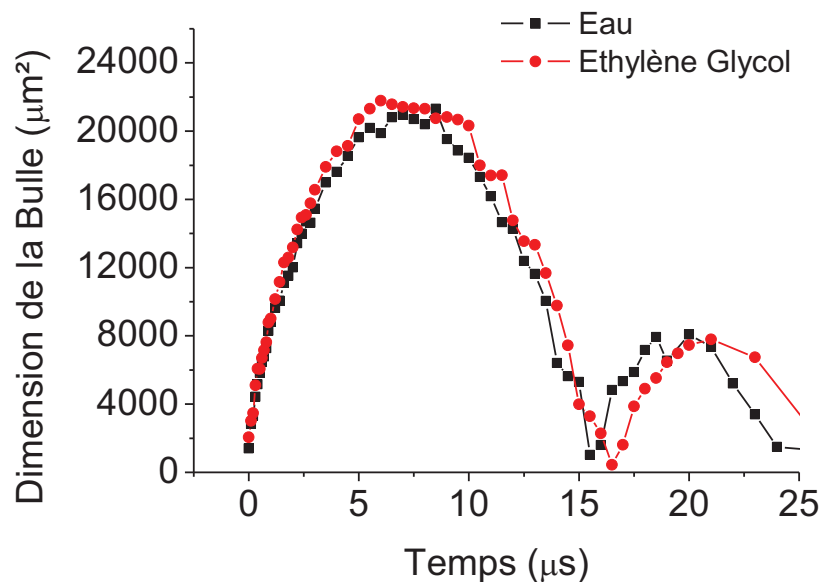


Figure 5.33: Evolution de la dimension de la bulle en fonction du temps pour une microbulle générée par une impulsion laser de 50 fs et d'énergie $5.37 \mu\text{J}$.

On peut également observer la présence de jets micrométriques internes lors de la phase d'effondrement, schématisés en [Figure 5.34](#). Ces micro-jets sont caractéristiques des bulles générées par cavitation (induite par laser ou non) et sont attribués comme étant les responsables des dommages matériels accompagnant souvent les phénomènes de cavitation.

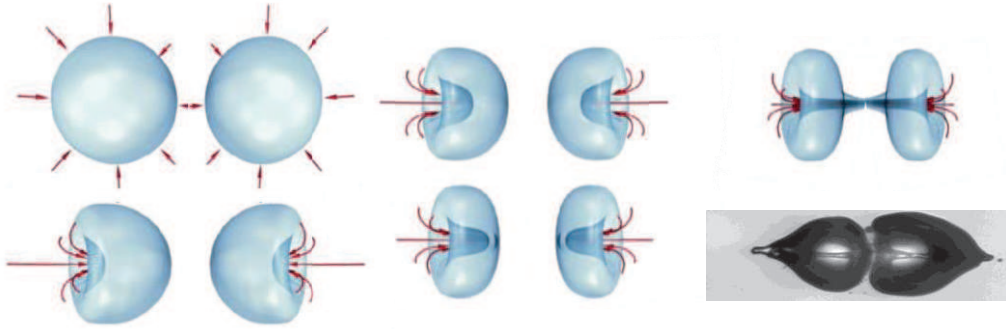


Figure 5.34: Représentation de l'effondrement d'une bulle générée par cavitation mettant en évidence la présence de jet micrométrique interne.

En première approche, on peut noter que la dynamique des bulles générées par cavitation peut être décrite en géométrie sphérique par l'équation de Rayleigh-Plesset donnée par [31], [33] :

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho} \left[P_B(t) - P_l - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\eta\dot{R}}{R} \right] \quad (5.8)$$

Où R est le rayon de la bulle avec \dot{R} et \ddot{R} ses dérivées première et seconde en fonction du temps, P_B est la pression interne de la bulle, P_l est la pression environnante, σ est la tension superficielle du liquide, ρ sa masse volumique et η sa viscosité dynamique. Ici, les microbulles ne sont pas sphériques. Néanmoins, nous pouvons introduire un rayon équivalent correspondant au rayon d'une sphère dont la surface projetée est égale à la surface projetée de la bulle afin de confronter la dynamique de la bulle asphérique avec le modèle de Rayleigh-Plesset.

La valeur de la pression interne de la bulle n'est pas connue, cependant, si l'on considère que l'expansion de la bulle est adiabatique, la loi de Laplace nous donne alors

$$P_B(t)R(t)^{3\gamma} = \text{constante} \quad (5.9)$$

Où γ est l'indice adiabatique du gaz parfait qui est le rapport des capacités thermiques à pression constante et à volume constant (isochore) ($\gamma = C_p/C_v$). Ainsi, si l'on suppose que la pression interne de la microbulle lorsque son rayon est maximal (R_{max}) correspond à la pression de vapeur saturante du solvant P_{sat} , l'Equation 8 se résume alors à une équation différentielle du second degré du type :

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho} \left[\frac{P_{sat} R_{max}^{3\gamma}}{R^{3\gamma}} - P_l - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\eta\dot{R}}{R} \right] \quad (5.10)$$

La valeur R_{max} est déterminée expérimentalement comme le rayon de la sphère équivalente. On obtient alors $40.5 \mu\text{m}$ pour l'eau et $41.5 \mu\text{m}$ pour l'Ethylène Glycol. Les paramètres physiques de l'eau et de l'Ethylène Glycol sont pris indépendants de la température. Pour la résolution numérique, la condition initiale sur le rayon R est donnée expérimentalement ; on estime ce rayon à $21 \mu\text{m}$ pour l'eau et l'Ethylène Glycol. La condition initiale sur \dot{R} est dans un premier temps estimée à 50 m/s par la pente expérimentale au temps courts puis est ajustée numériquement pour représenter au mieux l'expérience. On obtient alors une valeur de $\dot{R} = 64 \text{ m/s}$. Les solutions de cette équation différentielle sont données en [Figure 5.35](#) pour l'eau et l'Ethylène Glycol en comparaison avec l'expérience. Les résultats numériques représentent fidèlement l'expérience lors de la première oscillation pour les deux solvants (à travers le rayon équivalent). Cependant, ce modèle de Rayleigh-Plesset n'est plus adapté pour la seconde oscillation. Cela peut s'expliquer par une perte d'énergie importante due à la fission de la microbulle et à la formation de micro-jets internes induisant un amortissement important de l'oscillation (en amplitude et fréquence) de la microbulle et qui ne sont pas pris en compte dans ce modèle.

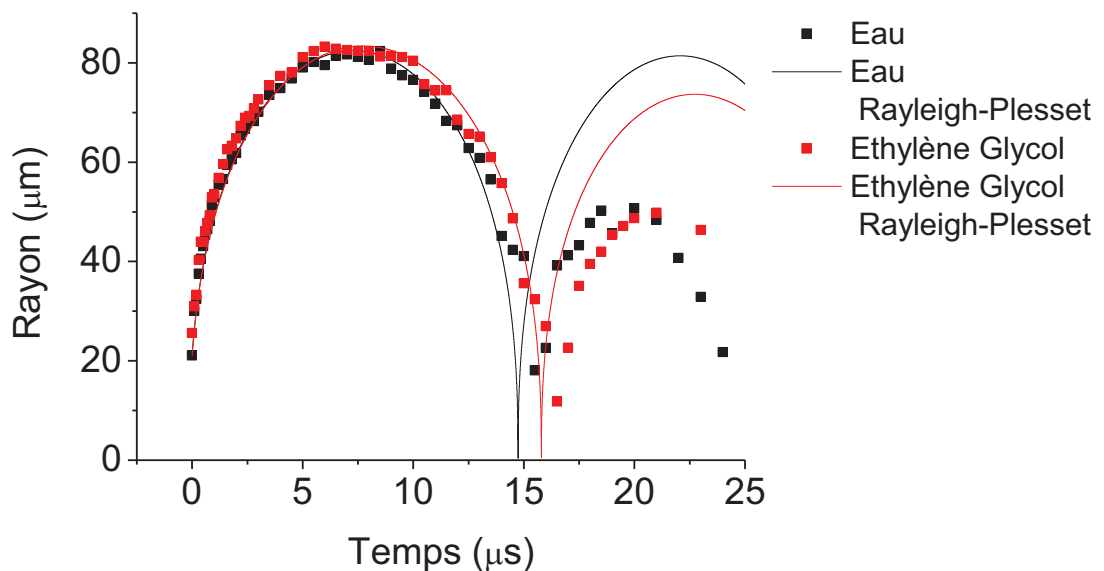


Figure 5.35: Les points représentent la dynamique du rayon équivalent de la microbulle au cours du temps dans (noir) l'eau et (rouge) l'Ethylène Glycol. Les résolutions numériques de l'équation différentielle de Rayleigh-Plesset pour (noir) l'eau et (rouge) l'Ethylène Glycol sont représentées par les courbes continues.

Il est important de souligner que cette approche n'est pas adaptée pour le traitement de la dynamique d'une bulle asphérique. Néanmoins, Vogel *et al.* [34] montre que l'évolution du volume d'une bulle, à partir d'un volume initial donné, varie peu, que la bulle soit sphérique ou non. L'équation de Rayleigh-Plesset donne alors une vision qualitative de la physique sous-jacente. Enfin, la dynamique de forme d'une bulle asphérique peut être caractérisée avec précision [35]. En effet, Tsiglifis et Pelekasis [36] ont étudié la dynamique d'une bulle micrométrique initialement ellipsoïdale par la résolution de l'équation de Navier-Stokes. Ainsi, l'évolution et la déformation de la bulle lors de son l'expansion, de la génération de micro-jets, et lors de son effondrement sont décrits numériquement et sont en accord qualitatif avec les observations que nous avons pu effectuer.

En présence de nanoparticules de latex

Pour le projet ERTIGO, l'utilisation de nanoparticules dopées en Bore est nécessaire pour l'initiation de réaction de fusion nucléaire. Ces nanoparticules dopées en Bore sont des nanoparticules de polymère très semblables d'un point de vue optique aux nanoparticules de latex synthétisées et décrites au [Chapitre 2](#). Dans un souci d'économie, des nanoparticules de latex de 565 nm de diamètre non dopée en bore seront utilisées. Afin d'éviter tout phénomène de sédimentation lors de l'expérience, les nanoparticules sont dispersées dans un mélange d'eau et d'Ethylène Glycol. La concentration des nanoparticules de latex a été ajustée à de telle sorte qu'il soit possible de visualiser la microbulle et que la focalisation du faisceau de Bessel dans la cuvette soit possible : une concentration en nanoparticule trop élevée rendrait l'échantillon opaque à la pompe, et aussi opaque à l'illumination du laser aléatoire sonde.

La [Figure 5.36](#) donne l'étude du seuil de cavitation dans en mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) en présence de nanoparticules de latex à une concentration de 10^{13} p/L caractérisé avec une observation à 100 ns environ. Malgré le fait que la qualité de l'image soit entachée par une perte de luminosité due à une forte diffusion de la lumière d'illumination par les nanoparticules de latex, la visualisation de microbulles reste possible. Le seuil de cavitation est estimé à 6 μ J en présence de nanoparticule contre 2.5 μ J sans nanoparticule. Malgré l'utilisation d'un faisceau de Bessel non-diffractant, une partie de l'énergie du faisceau pompe est perdu avant la focalisation du

laser. Cette perte est attribuée à la diffusion et à l'absorption du faisceau pompe par les nanoparticules de latex.

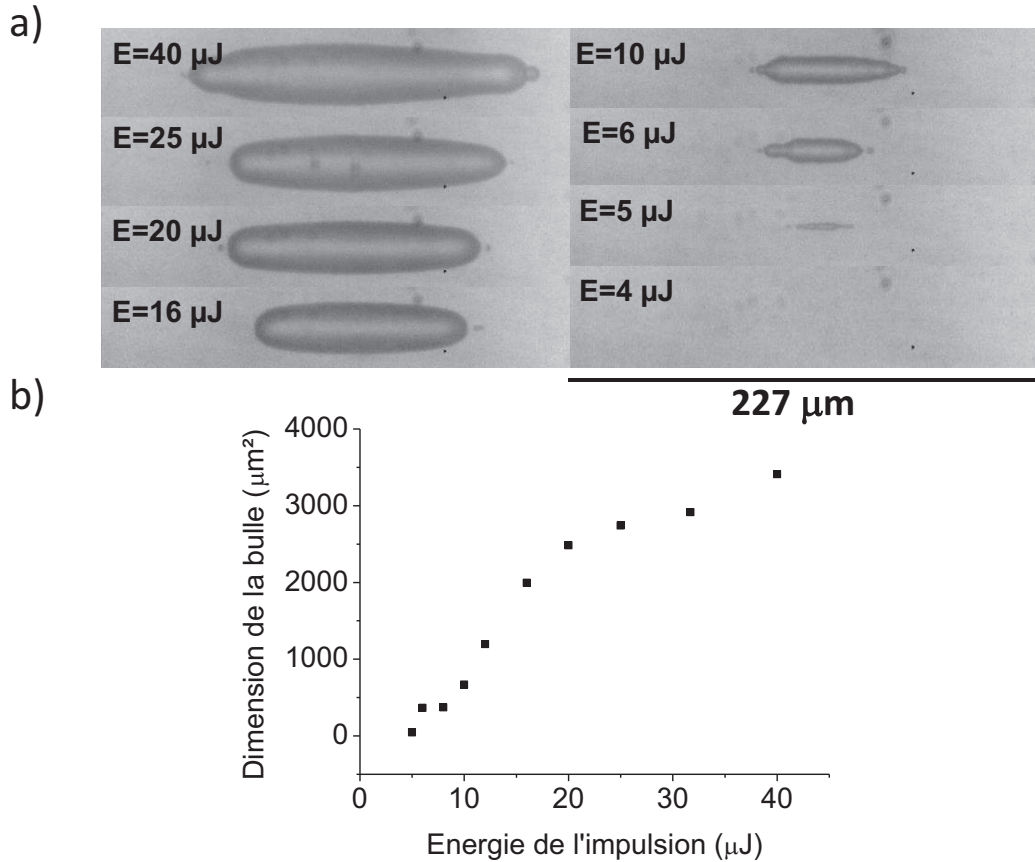


Figure 5.36: Images de la bulle micrométrique à 100 ns après l'impulsion laser pour différentes énergies laser pour une impulsion de durée de 120 fs dans mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) en présence de nanoparticules de latex à une concentration de 10^{13} p/L. (b) Dimension de la projection de la bulle en fonction de l'énergie de l'impulsion laser.

La dynamique de la bulle générée par une impulsion laser à 120 fs, d'énergie 20 μJ en condition de focalisation étroite et en présence de nanoparticule de latex de 565 nm de diamètre à 10^{13} p/L dans un mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) est donnée en Figure 5.37. La dynamique de la microbulle ne semble pas affectée par la présence des nanoparticules. On est toujours capable d'observer l'expansion, l'effondrement et les rebonds de la bulle ainsi que la présence des micro-jets au cours de la seconde oscillation. Néanmoins, les nanoparticules ne sont pas visibles : malgré une résolution de l'image suffisante pour pouvoir les détecter, le faible niveau de contraste de l'image (l'indice de réfraction du latex est proche de celui du solvant) et les diffusions multiples de l'illumination empêchent tout suivi des nanoparticules lors de la formation de la microbulle. Il

est précisé que les taches sombres visibles sur toutes images aux mêmes endroits ne sont pas des particules, mais des artefacts liés à l'imagerie.

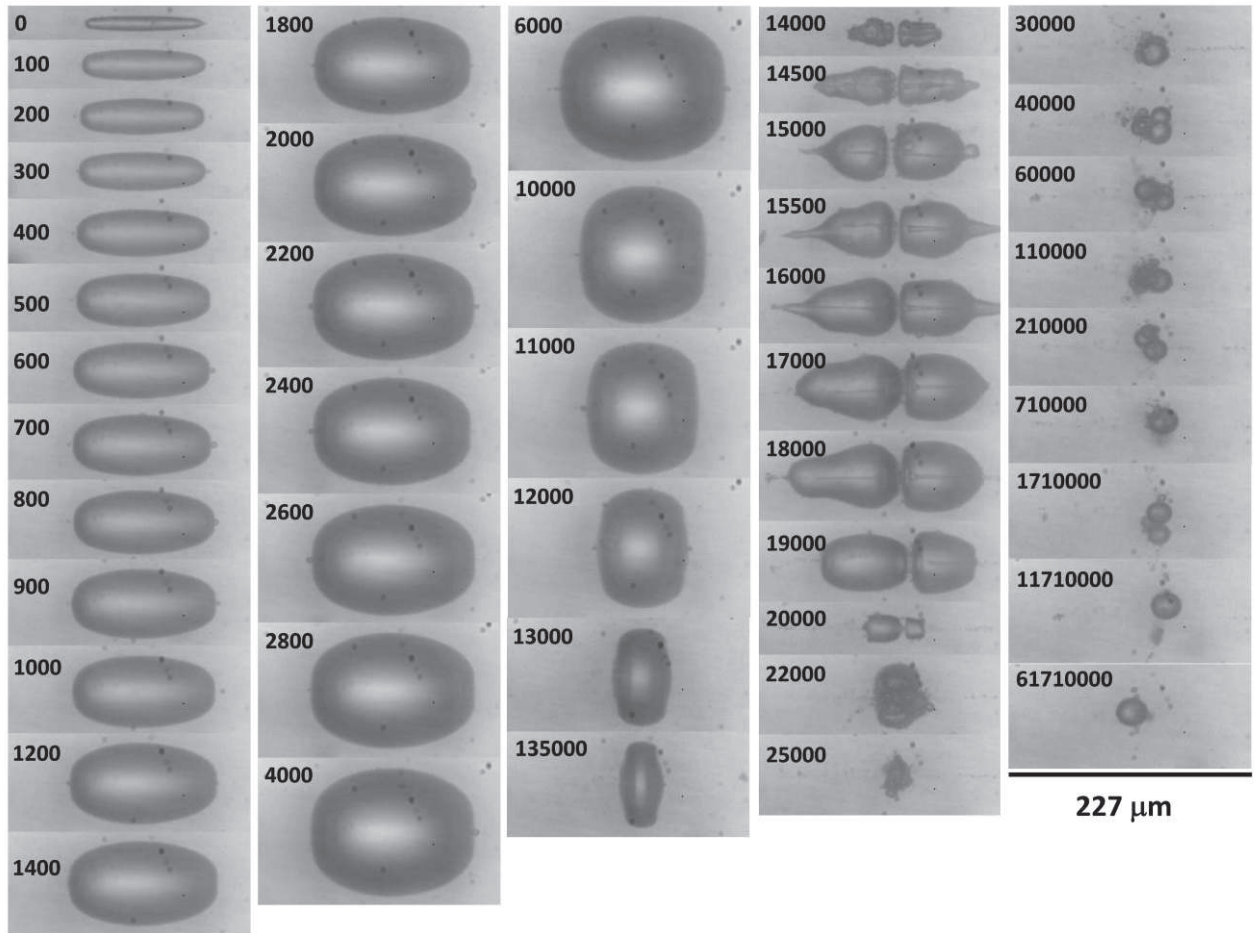


Figure 5.37: Dynamique d'une microbulle générée dans un mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) en présence de nanoparticules de latex à une concentration de 10^{13} p/L. par une impulsion laser de 120 fs et d'énergie 20 μ J. Le délai entre l'excitation laser et l'acquisition de l'image est donné sur chaque image en nanoseconde.

En présence de nanoparticules d'or

Afin de pouvoir localiser les nanoparticules lors de la formation de la microbulle par cavitation, une stratégie différente a été explorée. Au lieu de nanoparticules de latex, des nanoparticules d'or ont été utilisées afin d'augmenter le contraste de la détection. De plus, les propriétés optiques remarquables de ces objets en font d'excellents candidats pour l'étude de leur influence sur la bulle générée par cavitation lors de l'interaction avec le faisceau laser intense [37], [38]. Des nanoparticules d'or de 200 nm stabilisées en suspension dans une solution tampon citrate sans tensioactifs (742066 - Sigma Aldrich) ont été choisies pour leurs propriétés d'absorption et de diffusion puisqu'à 800 nm (longueur d'onde d'excitation) leur section efficace totale atteint un maximum local (Figure 5.38). De plus, des nanoparticules plus petites auraient été impossibles à détecter par microscopie optique et pour des nanoparticules plus grosses, leur sédimentation aurait été un problème majeur malgré l'utilisation d'Ethylène Glycol. La taille du cœur de ces nanoparticules est comprise entre 180 et 220 nm pour un rayon hydrodynamique de 175 – 235 nm, avec un indice de polydispersité inférieur à 0.2 (d'après les spécifications données par Sigma Aldrich).

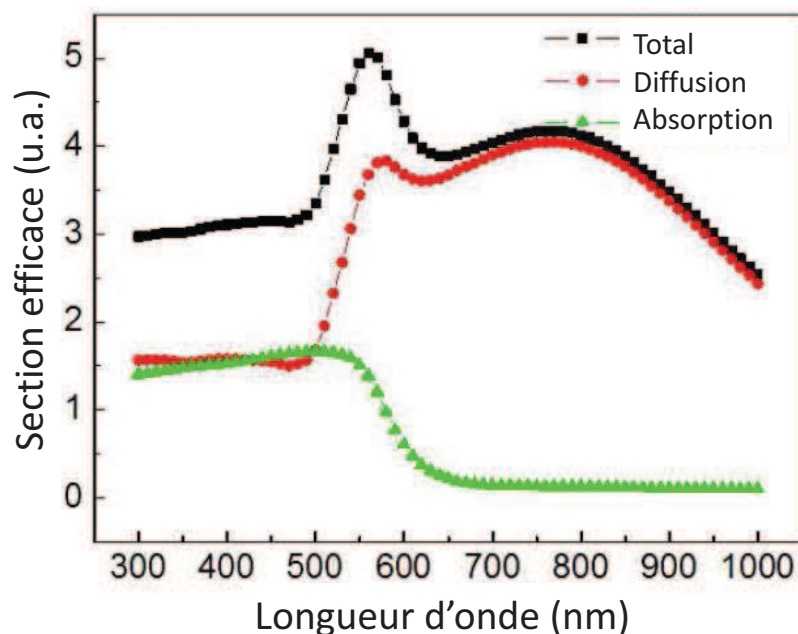


Figure 5.38: Calcul de la section efficace totale, de diffusion et d'absorption pour une nanoparticule d'or à 200 nm dans l'eau.

Les dynamiques d'une bulle générée par une impulsion laser à 4.7 ps, d'énergie 10.7 μJ en condition de focalisation étroite en absence ou en présence de nanoparticule d'or de diamètre à 1.3×10^{12} p/L dans un mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) sont comparées en images par microscopie en transmission optique et par contraste de phase en [Figure 5.40](#) et en [Figure 5.41](#). Les trois phases de la durée de vie de la microbulle sont préservées en présence de nanoparticules d'or : la formation et l'expansion de la microbulle, suivie de son effondrement, puis d'un rebond caractéristique. Le volume échantillonné est estimé à $128 \mu\text{m} \times 128 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. En considérant une dispersion homogène des nanoparticules d'or dans la solution, une centaine de particules devrait être dans ce volume. Aux temps courts, nous pouvons observer plusieurs dizaines de nanoparticules d'or dans le plan focal du microscope, autour de la bulle en cours d'expansion. Malgré leur petite taille, celles-ci sont clairement visibles en transmission optique en nombre cohérent avec la concentration des nanoparticules en solution ([Figure 5.39](#)).

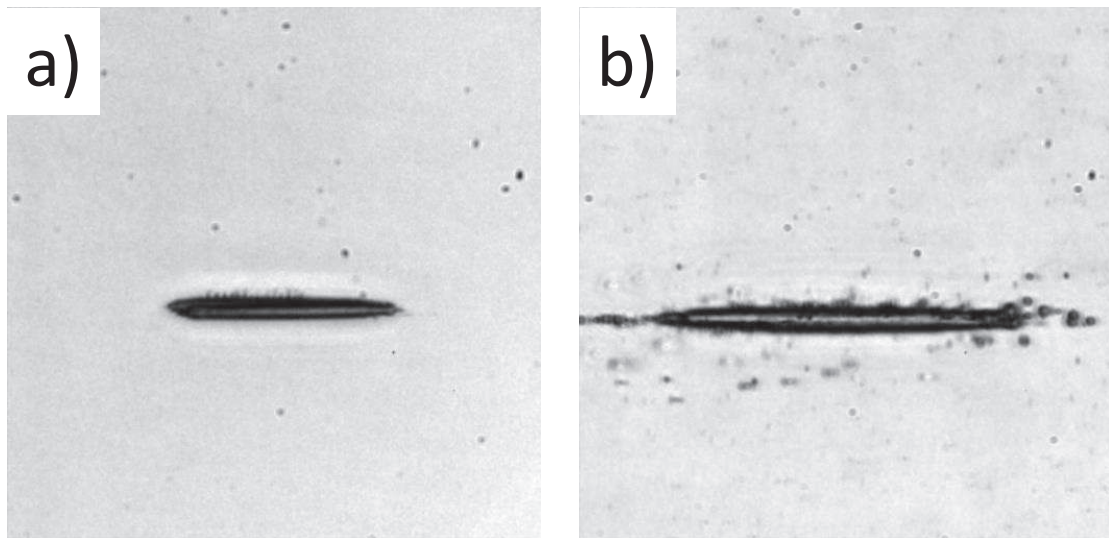


Figure 5.39: Image ($128 \mu\text{m} \times 128 \mu\text{m}$) d'une microbulle générée dans un mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) par une impulsion laser de 4.7 ps et d'énergie 10.7 μJ (a) sans nanoparticules et (b) en présence de nanoparticules d'or à une concentration de 1.3×10^{12} p/L, 34 ns après l'impulsion laser.

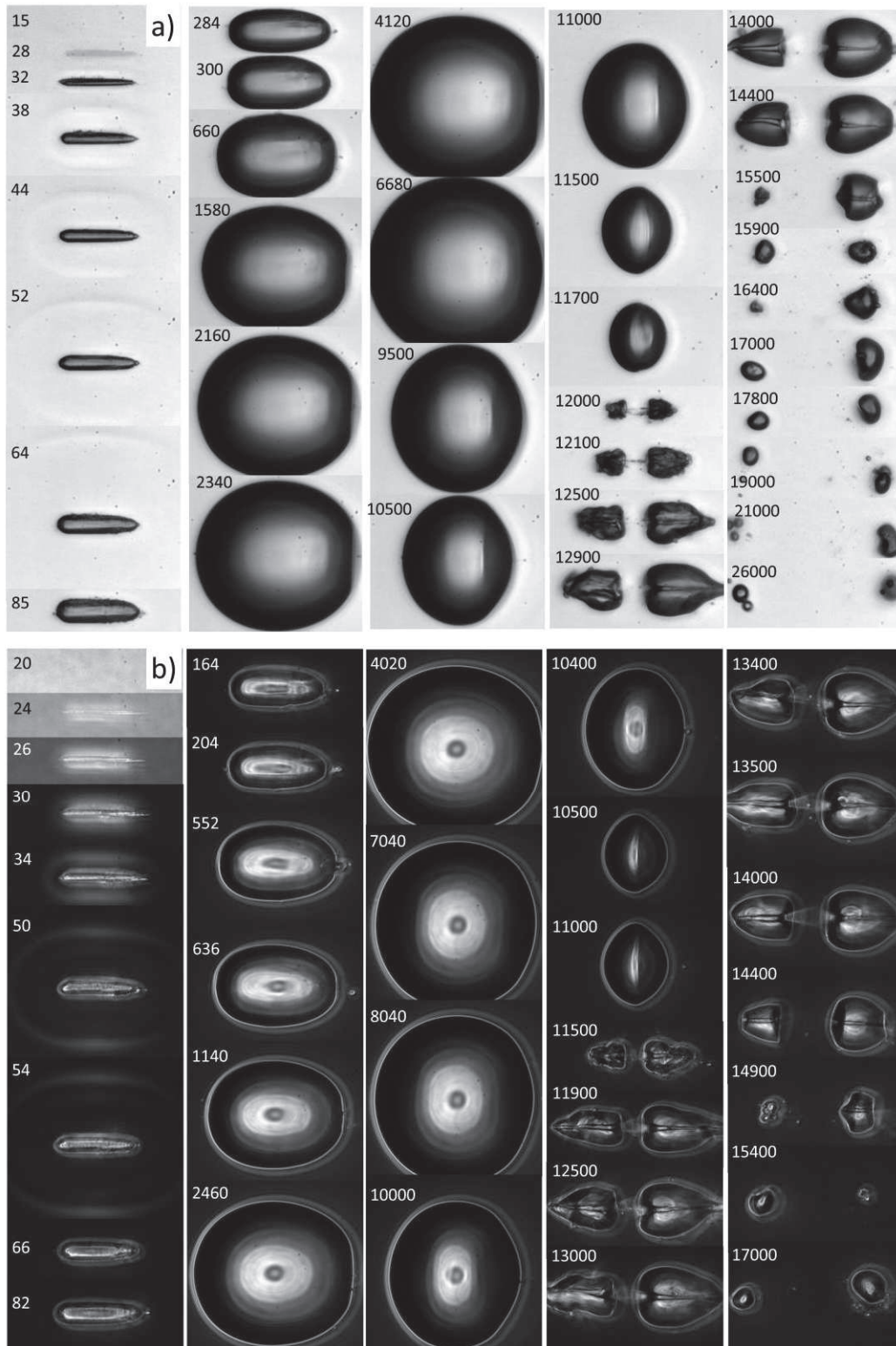


Figure 5.40: Dynamique d'une microbulle générée dans un mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) par une impulsion laser de 4.7 ps et d'énergie 10.7 μJ a) par microscopie optique et b) par contraste de phase. La largeur d'une image est de 128 μm et le délai est donné sur chaque image en nanoseconde.

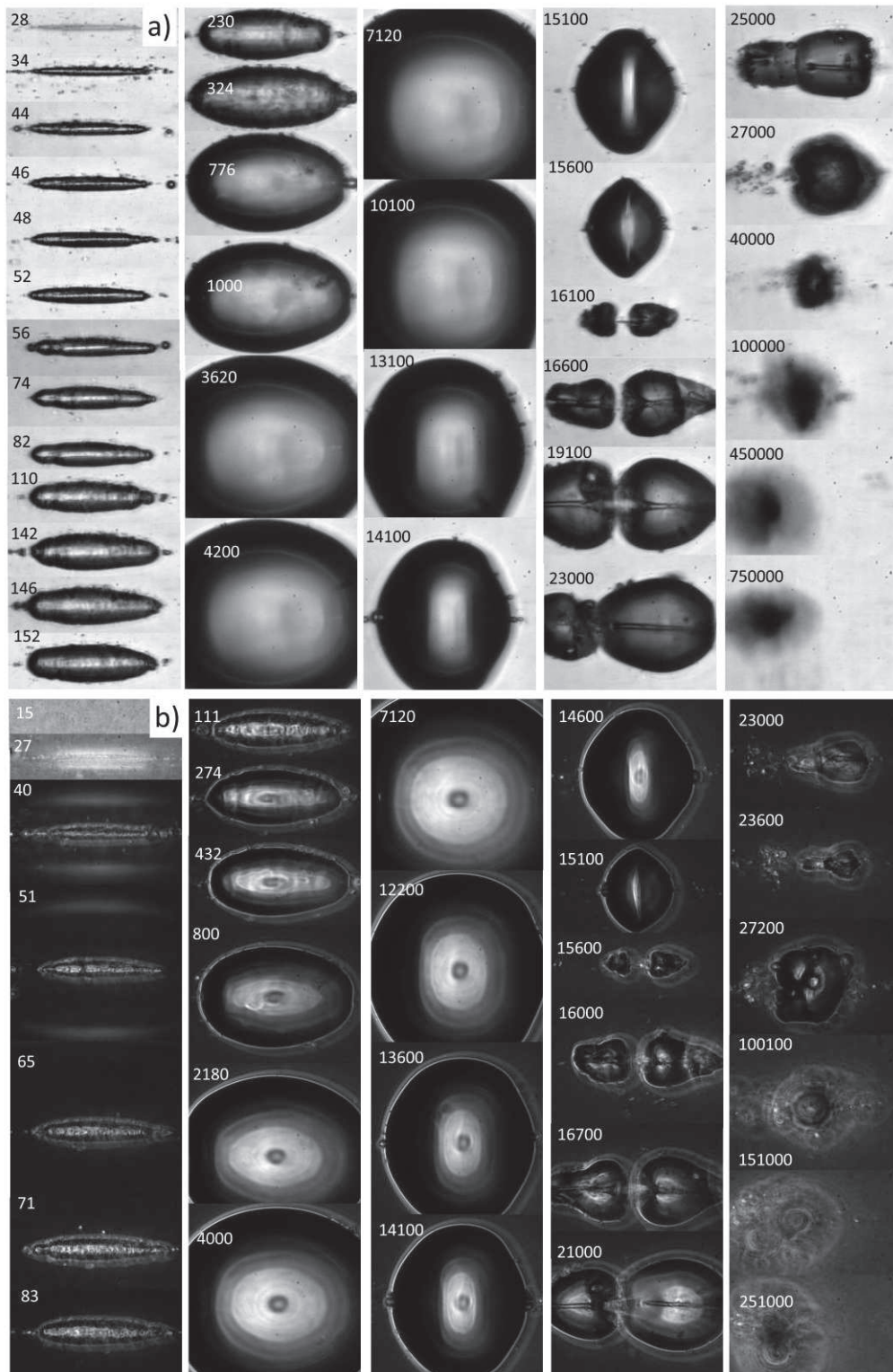


Figure 5.41: Dynamique d'une microbulle générée dans un mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) en présence de nanoparticules d'or à 1.3×10^{12} p/L. par une impulsion laser de 4.7 ps et d'énergie $10.7 \mu\text{J}$ a) par microscopie optique en transmission et b) en contraste de phase. La largeur d'une image est de $128 \mu\text{m}$ et le délai est donné sur chaque image en nanoseconde.

Afin d'avoir une représentation différente de cette dynamique, l'évolution des sections transversales et longitudinales est également donnée (Figure 5.42). On voit alors que la fission de la bulle en cours d'effondrement semble perturbée. La formation de micro-jet est toujours visible, mais contrairement à la solution sans nanoparticule où la fission donne naissance à deux bulles distinctes, bien visibles sur les sections longitudinales, la stabilité de ces bulles en présence de nanoparticule n'est pas assurée.

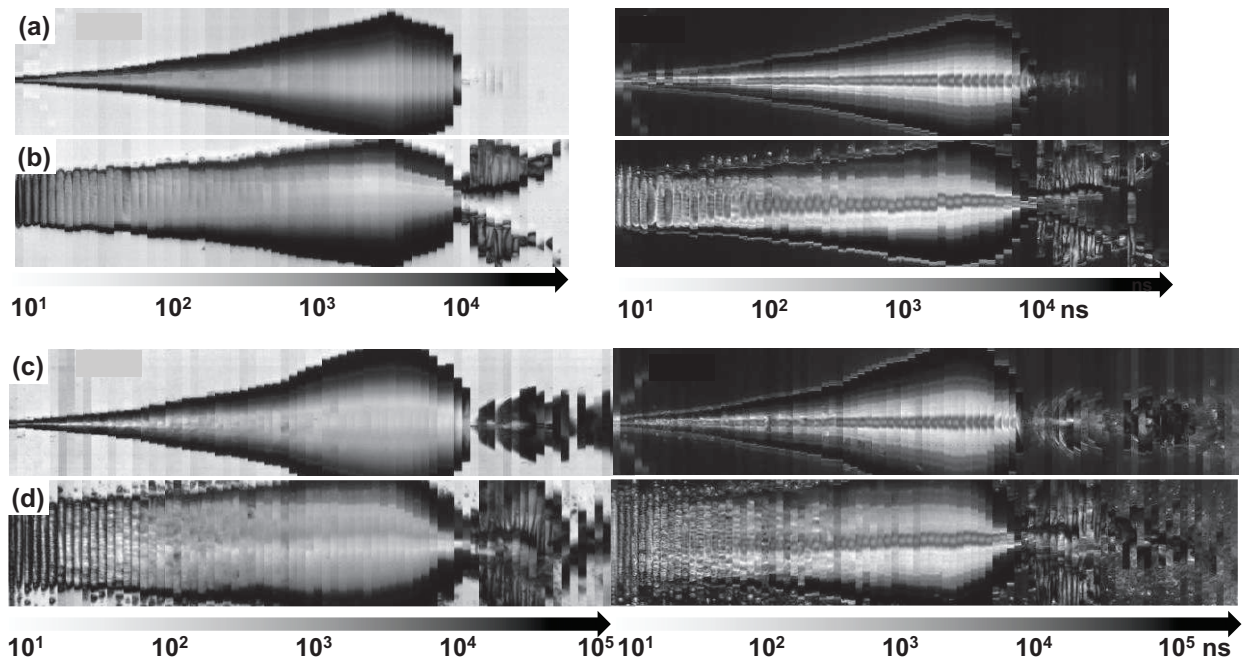


Figure 5.42: Dynamique d'une microbulle générée dans un mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) par une impulsion laser de 4.7 ps et d'énergie $10.7 \mu\text{J}$ (a,b) sans nanoparticules et (c,d) en présence de nanoparticules d'or à une concentration de 1.3×10^{12} p/L. Ici, l'évolution des sections (a,c) transversales et (b,d) longitudinales selon une échelle temporelle logarithmique, à gauche, par microscopie optique en transmission et à droite par contraste de phase.

De plus, la qualité des images permet d'affirmer que l'interface liquide – gaz de la bulle en expansion est perturbée en présence des nanoparticules. Ces altérations sont mises en évidence sur la Figure 5.43.b pour un délai de 28 et 300 ns. Les altérations de la surface de la bulle sont détectées en transmission optique, mais reste plus probante en contraste de phase. Lorsque la microbulle atteint son volume maximal, ces perturbations surfaciques ne sont plus visibles. Enfin, que ce soit en transmission optique ou en contraste de phase, aucune nanoparticule n'est visible au cœur de la bulle.

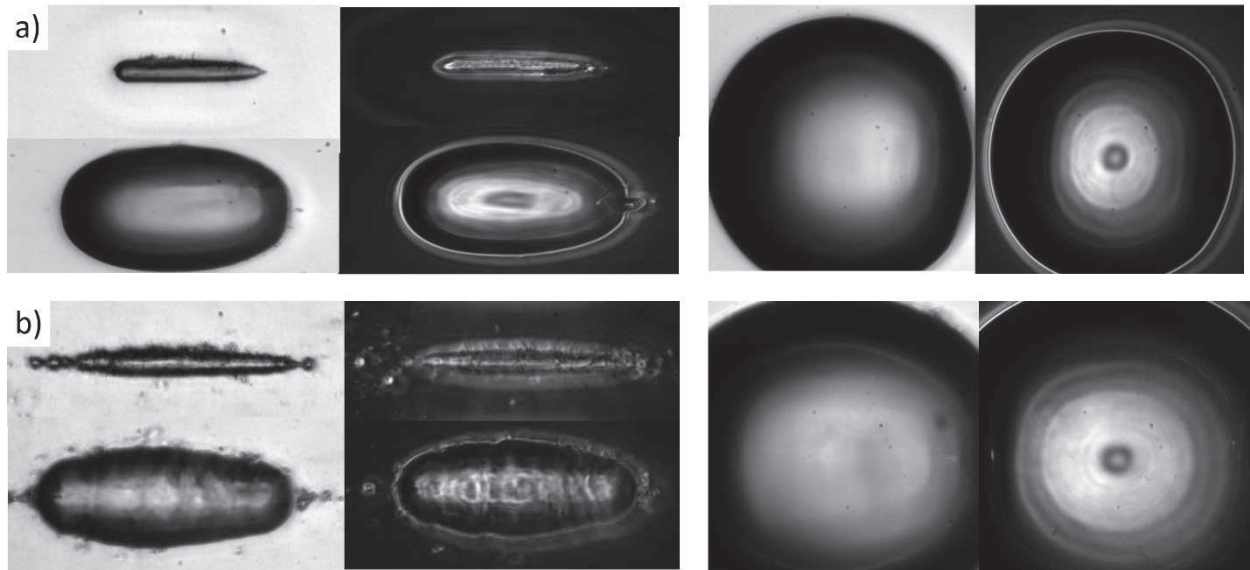


Figure 5.43: Image d'une microbulle à différents temps générée dans un mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) par une impulsion laser de 4.7 ps et d'énergie 10.7 μJ a) sans nanoparticules et b) en présence de nanoparticules d'or à une concentration de 1.3×10^{12} p/L. La largeur d'une image est de 128 μm .

De la même façon que précédemment, nous pouvons effectuer l'analyse de la dynamique des microbulles générées en présence ou non de nanoparticules d'or. Cette analyse donne des résultats remarquables (Figure 5.44). Dans les mêmes conditions de tir laser, la bulle générée en présence de nanoparticules d'or dispersées en solution est plus grosse qu'en l'absence de nanoparticule. En effet, le diamètre de la bulle lorsque son volume est maximal est estimé à 84 μm environ avec une durée de vie de la première oscillation de 16 μs en présence de nanoparticules d'or contre 65 μm avec une durée de vie de 12 μs s'il n'y a pas de nanoparticules.

Le modèle de Rayleigh-Plesset peut encore être testé. La valeur R_{max} est évaluée expérimentalement comme le rayon de la sphère équivalente. On obtient alors 65 μm sans nanoparticules contre 84 μm en présence de nanoparticules d'or. Les paramètres physiques du solvant (mélange d'eau/Ethylène Glycol à 70:30%, v/v) sont pris indépendants de la température. Pour la résolution numérique, la condition initiale sur le rayon R est donnée expérimentalement ; on estime ce rayon à 10 μm . Pour représenter au mieux l'expérience, on obtient une valeur de $\dot{R} = 95$ m/s dans le cas sans nanoparticules contre 138 m/s en présence de nanoparticules. Les solutions de cette équation différentielle sont données en Figure 5.44.

Ces considérations tendent à faire penser que, de par leur activité optique, les nanoparticules d'or auraient une grande influence sur la formation et la dynamique des microbulles générées par cavitation induite par irradiation laser intense. En effet, une plus grande vitesse d'expansion de la bulle peut alors impliquer des conditions de formation différentes.

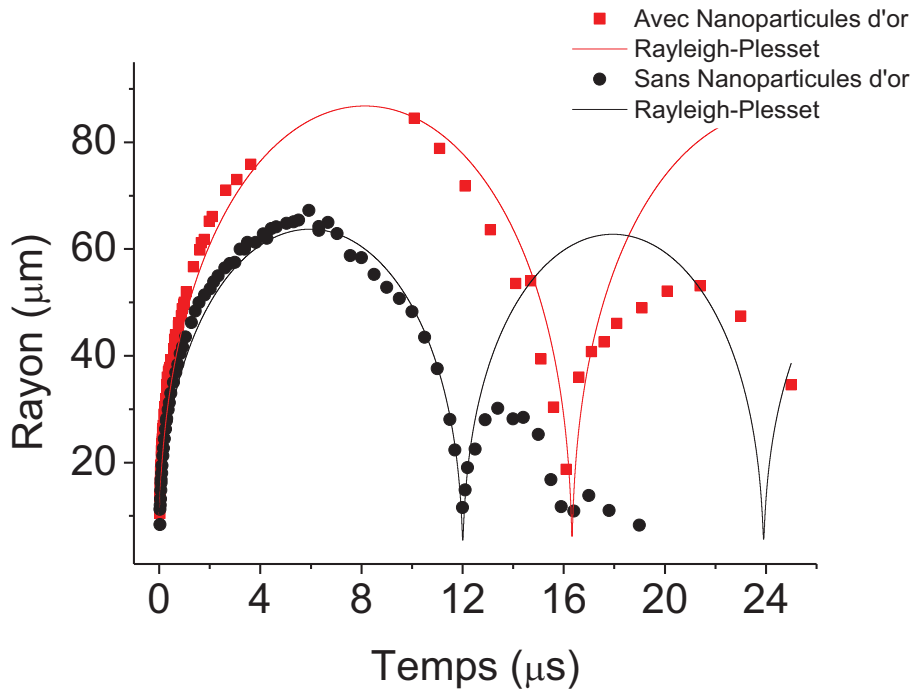


Figure 5.44: Evolution de la dimension de la bulle en fonction du temps pour une microbulle générée par une impulsion laser de 4.7 ps, d'énergie 10.7 μJ dans une mélange d'eau/Ethylène Glycol (70:30%, v/v) en présence ou non de nanoparticules d'or à une concentration de 1.3×10^{12} p/L.

Les calculs numériques de la dynamique du rayon de la microbulle par l'équation de Rayleigh-Plesset (Figure 5.35 et Figure 5.44) sont donnés à titre indicatifs, un affinement des paramètres utilisés dans le modèle est essentiel. En particulier, toutes les grandeurs physiques sont considérées indépendantes de la température à 25°C. L'hypothèse adiabatique ainsi que l'hypothèse sur la valeur de la pression interne de la bulle lorsque son rayon est maximum sont également des hypothèses fortes qui ne sont pas nécessairement vérifiées dans ce système. La Table 5.1 donne les principales caractéristiques des solvants utilisés.

Table 5.1: Principales caractéristiques des solvants utilisés.

	Eau	Eau/Ethylène Glycol (30:70%)	Ethylène Glycol
Densité	1.0	1.034	1.113
Tension Superficielle	73 mN/m	63 mN/m	48 mN/m
Viscosité	1.0 mPa.s	1.4 mPa.s	17 mPa.s

5.3.7 Discussion

Les perturbations surfaciques, invisibles dans le mélange eau/Ethylène Glycol sans nanoparticules, peuvent être expliquées de deux façons. D'une part, les nanoparticules seraient entraînées par la bulle en cours d'expansion et seraient localisées à l'interface liquide – gaz par des forces de tension superficielles déformant la surface de la bulle. Cette hypothèse peut être validée par le fait que l'on n'observe aucune nanoparticule à l'intérieur de la bulle alors que compte tenu de la concentration en nanoparticules dans la solution, plusieurs dizaines de nanoparticules devraient être présentes.

D'autre part, ces uniformités pourraient également être une conséquence indirecte de l'activité optique des nanoparticules d'or. En effet, les nanoparticules d'or sont connues pour leurs propriétés plasmoniques [39] ; la génération d'un champ électromagnétique intense localisé à la surface de la nanoparticule par effets plasmoniques pourrait modifier l'uniformité du plasma induit par irradiation laser créant des points chauds localisés dans le plasma impactant la formation de la microbulle par cavitation. Ces uniformités seraient alors conservées lors de la phase d'expansion de la microbulle au temps cours. L'augmentation en taille de la microbulle en présence de nanoparticules d'or ainsi que la plus grande vitesse d'expansion de la microbulle en temps courts sont favorables à l'hypothèse d'une absorption plus efficace du faisceau laser intense ultra-court grâce aux nanoparticules d'or malgré leur faible section efficace d'absorption à 800 nm. Une analyse théorique de l'interaction lumière – nanoparticule d'or nous permettrait alors de comprendre l'influence réelle des nanoparticules sur la formation de microbulles induites par nanocavitation laser.

Afin d'aller dans ce sens, la distribution du champ électrique autour d'une nanoparticule d'or de 200 nm pour une excitation à 800 nm par un faisceau de Bessel a été calculée dans l'eau par FDTD (*Finite-Difference Time-Domain*) à deux dimension (calculs effectués par Tatiana Itina, LHC Saint Etienne) (Figure 5.45). Une exaltation du champ électrique autour de la nanoparticule d'or par effets plasmoniques est alors observable. Même si cette exaltation reste modérée à 800 nm, elle pourrait expliquer l'uniformité de la génération du plasma, et influencer indirectement la formation de la bulle par nanocavitation.

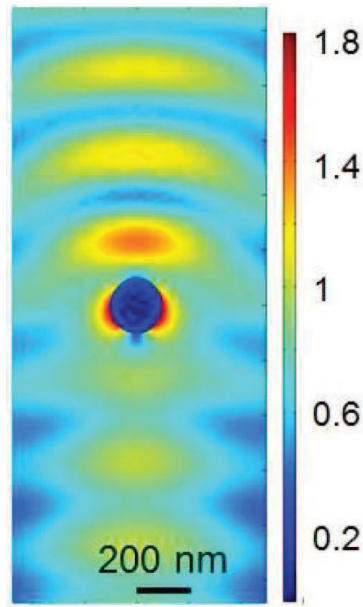


Figure 5.45: Distribution du champ électrique autour d'une nanoparticule d'or de 200 nm dans de l'eau.

Conclusion

Grâce au développement d'une technique d'imagerie innovante basée sur l'émission d'un laser aléatoire, la dynamique d'une bulle micrométrique générée par nano-cavitation laser a pu être étudiée par microscopie optique résolue en temps. Le concept du réacteur du projet ERTIGO impliquait le piège de nanoparticules dans une bulle formée par une première impulsion laser afin de pouvoir générer en milieu raréfié un ensemble de nanoparticules fonctionnalisées pour des applications de fusion nucléaire. Ce concept a été infirmé par cette étude. En effet, la visualisation directe de la bulle en cours de formation dans une solution colloïdale de nanoparticule d'or montre que les nanoparticules ne restent pas piégées par inertie dans la microbulle, mais qu'au contraire, elles semblent être entraînées par cette dernière. Cependant, l'étude de ce système a permis d'ouvrir un pan de recherche à la physique extrêmement riche : l'activité optique des nanoparticules d'or dispersées en solution semble avoir une influence importante sur la formation de la bulle. Une thermodynamique riche couplant « plasmonique » et « hydrodynamique » avec une nouvelle physique à explorer pour la cavitation laser...

Enfin, le développement de la source aérosol pulsée semble être une approche très prometteuse pour une interaction efficace entre un faisceau laser ultra-court et ultra-intense avec un jet de nanoparticules généré en milieu contrôlé. La validation du concept d'explosions coulombiennes de gouttelettes a pu être réalisée par l'observation de particules chargées accélérées à des énergies suffisamment élevées pour réaliser des événements de fusion nucléaire générés par irradiation laser.*

* De nouveaux essais ont été réalisés du 25 Septembre 2017 au 5 Octobre 2017 au CELIA sur la source aérosol avec le faisceau laser ECLIPSE (quelques jours avant la soutenance de ce travail de thèse). Une courte synthèse de ces deux semaines d'expérience, rédigée par Jean-Éric DUCRET (CELIA, Bordeaux), est alors donnée en annexe de ce manuscrit.

Références

- [1] T. Ditmire, J. Zweiback, V. P. Yanovsky, T. E. Cowan, G. Hays, and K. B. Wharton, “Nuclear fusion from explosions of femtosecond laser-heated deuterium clusters,” *Nature*, vol. 398, no. 6727, pp. 489–492, Apr. 1999.
- [2] K. W. D. Ledingham, P. McKenna, and R. P. Singhal, “Applications for Nuclear Phenomena Generated by Ultra-Intense Lasers,” *Science (80-.)*, vol. 300, no. 5622, pp. 1107–1111, 2003.
- [3] C. Baccou *et al.*, “New scheme to produce aneutronic fusion reactions by laser-accelerated ions,” *Laser Part. Beams*, vol. 33, no. 1, pp. 117–122, 2014.
- [4] K. W. D. Ledingham and W. Galster, “Laser-driven particle and photon beams and some applications,” *New J. Phys.*, vol. 12, no. 4, p. 45005, 2010.
- [5] P. Mora, “Plasma Expansion into a Vacuum,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 90, no. 18, p. 185002, 2003.
- [6] C. Labaune, C. Baccou, V. Yahia, C. Neuville, and J. Rafelski, “Laser-initiated primary and secondary nuclear reactions in Boron-Nitride,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 21202, Feb. 2016.
- [7] H. Y. Lu *et al.*, “Efficient fusion neutron generation from heteronuclear clusters in intense femtosecond laser fields,” *Phys. Rev. A*, vol. 80, no. 5, p. 51201, Nov. 2009.
- [8] I. Last and J. Jortner, “Energetics at extremes in Coulomb explosion of large finite systems,” *Chem. Phys.*, vol. 399, pp. 218–223, May 2012.
- [9] R. Prasad *et al.*, “Ethanol (C₂H₅OH) spray of sub-micron droplets for laser driven negative ion source,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 83, no. 8, p. 83301, Aug. 2012.
- [10] S. Ter-Avetisyan, M. Schnürer, H. Stiel, and P. V Nickles, “A high-density sub-micron liquid spray for laser driven radiation sources,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 19, p. 2421, 2003.
- [11] M. K. Bhuyan *et al.*, “High aspect ratio nanochannel machining using single shot femtosecond Bessel beams,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 97, no. 8, p. 81102, 2010.

- [12] M. Duocastella and C. B. Arnold, “Bessel and annular beams for materials processing,” *Laser Photon. Rev.*, vol. 6, no. 5, pp. 607–621, 2012.
- [13] J. Durnin, J. J. Miceli, and J. H. Eberly, “Diffraction-free beams,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 58, no. 15, pp. 1499–1501, 1987.
- [14] C. DeMichelis, “Laser induced gas breakdown: A bibliographical review,” *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. 5, no. 4, pp. 188–202, 1969.
- [15] B. C. Stuart, M. D. Feit, A. M. Rubenchik, B. W. Shore, and M. D. Perry, “Laser-Induced Damage in Dielectrics with Nanosecond to Subpicosecond Pulses,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 74, no. 12, pp. 2248–2251, Mar. 1995.
- [16] A. Vogel, N. Linz, S. Freidank, and G. Paltauf, “Femtosecond-Laser-Induced Nanocavitation in Water: Implications for Optical Breakdown Threshold and Cell Surgery,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, no. 3, p. 38102, Jan. 2008.
- [17] D. Faccio *et al.*, “Cavitation dynamics and directional microbubble ejection induced by intense femtosecond laser pulses in liquids,” *Phys. Rev. E*, vol. 86, no. 3, p. 36304, Sep. 2012.
- [18] C. B. Schaffer, N. Nishimura, E. N. Glezer, A. M.-T. Kim, and E. Mazur, “Dynamics of femtosecond laser-induced breakdown in water from femtoseconds to microseconds,” *Opt. Express*, vol. 10, no. 3, pp. 196–203, 2002.
- [19] D. Devaux, R. Fabbro, L. TOLLIER, and E. Bartnicki, “Generation of shock waves by laser-induced plasma in confined geometry,” *J. Appl. Phys.*, vol. 74, no. 4, pp. 2268–2273, 1993.
- [20] K. Dota, A. Pathak, J. A. Dharmadhikari, D. Mathur, and A. K. Dharmadhikari, “Femtosecond laser filamentation in condensed media with Bessel beams,” *Phys. Rev. A*, vol. 86, no. 2, p. 23808, 2012.
- [21] L. Allen and D. G. C. Jones, “An analysis of the granularity of scattered optical maser light,” *Phys. Lett.*, vol. 7, no. 5, pp. 321–323, 1963.
- [22] B. Redding, M. A. Choma, and H. Cao, “Speckle-free laser imaging using random laser illumination,” *Nat Phot.*, vol. 6, no. 6, pp. 355–359, Jun. 2012.

- [23] I. Toytman, D. Simanovski, and D. Palanker, “Optical breakdown in transparent media with adjustable axial length and location,” *Opt. Express*, vol. 18, no. 24, pp. 24688–24698, Nov. 2010.
- [24] A. Mermillod-Blondin, H. Mentzel, and A. Rosenfeld, “Time-resolved microscopy with random lasers,” *Opt. Lett.*, vol. 38, no. 20, pp. 4112–4115, Oct. 2013.
- [25] R. Ambartsumyan, N. Basov, P. Kryukov, and V. Letokhov, “A laser with a nonresonant feedback,” *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. 2, no. 9, pp. 442–446, 1966.
- [26] X. Ma, J. Q. Lu, R. S. Brock, K. M. Jacobs, P. Yang, and X.-H. Hu, “Determination of complex refractive index of polystyrene microspheres from 370 to 1610 nm,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 48, no. 24, p. 4165, 2003.
- [27] H. Cao *et al.*, “Random lasers with coherent feedback,” *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 9, no. 1, pp. 111–119, Jan. 2003.
- [28] N. M. Lawandy, R. M. Balachandran, A. S. L. Gomes, and E. Sauvain, “Laser action in strongly scattering media,” *Nature*, vol. 368, no. 6470, pp. 436–438, Mar. 1994.
- [29] C. T. Dominguez, E. de Lima, P. C. de Oliveira, and F. L. Arbeloa, “Using random laser emission to investigate the bonding energy of laser dye dimers,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 464, no. 4–6, pp. 245–248, 2008.
- [30] C. M. Soukoulis, X. Jiang, J. Y. Xu, and H. Cao, “Dynamic response and relaxation oscillations in random lasers,” *Phys. Rev. B*, vol. 65, no. 4, p. 41103, Jan. 2002.
- [31] C. E. Brennen, *Cavitation and Bubble Dynamics*. Oxford University Press, 1995.
- [32] I. Akhatov, O. Lindau, A. Topolnikov, R. Mettin, N. Vakhitova, and W. Lauterborn, “Collapse and rebound of a laser-induced cavitation bubble,” *Phys. Fluids*, vol. 13, no. 10, pp. 2805–2819, 2001.
- [33] Lord Rayleigh, “VIII. On the pressure developed in a liquid during the collapse of a spherical cavity,” *Philos. Mag. Ser. 6*, vol. 34, no. 200, pp. 94–98, 1917.
- [34] R. P. Godwin, E. J. Chapyak, J. Noack, and A. Vogel, “Aspherical bubble dynamics and oscillation times,” 1999, vol. 3601, pp. 225–236.

- [35] W. Lauterborn and T. Kurz, “Physics of bubble oscillations,” *Reports Prog. Phys.*, vol. 73, no. 10, p. 106501, 2010.
- [36] K. Tsiglifis and N. A. Pelekasis, “Nonlinear oscillations and collapse of elongated bubbles subject to weak viscous effects,” *Phys. Fluids*, vol. 17, no. 10, p. 102101, 2005.
- [37] É. Boulais, R. Lachaine, and M. Meunier, “Plasma Mediated off-Resonance Plasmonic Enhanced Ultrafast Laser-Induced Nanocavitation,” *Nano Lett.*, vol. 12, no. 9, pp. 4763–4769, Sep. 2012.
- [38] E. Lukianova-Hleb *et al.*, “Plasmonic Nanobubbles as Transient Vapor Nanobubbles Generated around Plasmonic Nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 4, pp. 2109–2123, Apr. 2010.
- [39] V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi, O. M. Maragò, and M. A. Iatì, “Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 29, no. 20, p. 203002, 2017.

Conclusion Générale

Ce travail de thèse a consisté à explorer de nombreuses méthodes optiques afin de caractériser thermodynamiquement deux systèmes miroirs hors-équilibres : une gouttelette de solvant en cours d'évaporation et une bulle de gaz en cours de formation. Le premier système est d'intérêt analytique : l'évaporation de gouttelette chargée est un processus clé de la génération d'espèce ionique en phase gazeuse. En particulier, le procédé d'ionisation par électrospray peut avoir des conséquences considérables sur les protéines étudiées en phase gazeuse par spectrométrie de masse. Le second système est au cœur d'un projet beaucoup plus vaste : le projet ERTIGO. La volonté de vouloir générer des nanoparticules fonctionnalisées en milieu contrôlé a motivé, entre autre, l'idée de pouvoir piéger des nanoparticules dans une bulle générée par irradiation laser.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons décrit quelle était l'influence de la température sur l'émission d'espèces fluorescentes. Trois principes majeurs pour la thermométrie par méthodes optiques ont été explicités ainsi que leurs méthodes de détection expérimentale. La fluorescence est une technique basée sur la modification du spectre de fluorescence d'un système en fonction de la température. La température peut alors être déterminée de façon relative grâce à l'intensité de fluorescence de la bande d'émission du chromophore. Si plusieurs bandes d'émission coexistent, une mesure, plus précise, de la température peut être faite par ratiométrie. La fluorescence résolue en temps s'appuie sur la mesure de la durée de vie de l'état excité d'un chromophore en fonction de la température. C'est une technique de thermométrie adaptée puisque la durée de vie de chromophore dans un environnement donné est un paramètre ne dépendant que de la nature de ce chromophore, limitant considérablement le nombre d'artéfact de mesure possible. Enfin, l'anisotropie de fluorescence consiste à obtenir une information sur le temps de corrélation rotationnel d'un objet fluorescent en rotation. Ce temps de corrélation est multifactoriel, il dépend, à la fois de la température, de la viscosité du milieu environnant et de la dimension de l'objet en rotation, rendant cette technique très polyvalent pour l'analyse de système dynamique.

Le second chapitre met en application le principe de la fluorescence statique pour la thermographie multi-échelle. La Rhodamine B est un chromophore thermo-chromique: son émission de fluorescence dépend fortement de la température. L'exploitation des propriétés optique de la Rhodamine B a permis de développer des objets adaptés pour la nano-

thermographie : un protocole de synthèse de nanoparticules de latex dopées en Rhodamine B est alors décrit. Une caractérisation approfondie des nanoparticules fonctionnalisées a été réalisée. En particulier, la réversibilité de leurs propriétés optiques ainsi que l'influence de la localisation des chromophores sur leur réponse en température ont été étudiées. Nous avons montré que les nanoparticules de latex dopées en Rhodamine B incorporée exhibent une dépendance linéaire et réversible de leurs propriétés d'émission en fonction de la température. De plus, nous avons montré la faisabilité de ces objets pour des mesures thermographiques multi-échelles : à l'échelle macroscopique (dispersé en solution) jusqu'à l'échelle de la particule unique par microscopie confocale.

Dans le troisième chapitre, les profils en température et en taille de la plume d'un électrospray ont permis de décrire la thermodynamique de gouttelettes micrométriques chargées en cours d'évaporation. La mesure de l'influence de la température sur la durée de vie d'un complexe de Ruthénium : $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ couplée avec une mesure de la diffusion de la lumière par les gouttelettes a permis de démontrer que deux phénomènes de transferts thermiques étaient en compétition. L'évaporation est un processus endothermique qui a tendance à faire diminuer la température des gouttelettes alors que la condition thermique entre le gaz environnant chauffé et le solvant des gouttelettes a tendance à augmenter la température de ces dernières. Après équilibre thermique, un réchauffement global d'une dizaine de degrés est alors observé montrant que le phénomène de conduction thermique est prédominant. Ces observations ont également pu être reproduites grâce à un modèle d'évaporation contrôlé par diffusion.

Pendant l'évaporation des gouttelettes chargées, des modifications brutales de l'environnement local des analytes, comme des changements de température, de pH et de composition de solvant, peuvent avoir de grandes conséquences. En particulier, l'étude conformationnelle d'édifice biomoléculaire comme des protéines par spectrométrie de masse impose de suivre les changements structuraux de ces édifices. C'est pourquoi nous avons développé dans le chapitre 4 une technique basée sur des mesures d'anisotropie de fluorescence pour pouvoir sonder la structure de protéine. Le greffage d'une Rhodamine B isothiocyanate sur la Myoglobine est alors reporté. L'influence du méthanol sur cette protéine modèle a été suivie en solution grâce à l'émission du chromophore greffé à la protéine, validant le concept d'anisotropie de fluorescence comme sonde conformationnelle. Nous avons alors montré le dépliement de la protéine par le

passage d'un état « contraint » vers un état « libre » de la rotation du chromophore attaché de façon covalente à la protéine.

Ces résultats permettent d'introduire de nouvelles expériences. La mesure de l'évolution de l'anisotropie de fluorescence d'un système protéine–chromophore directement depuis la plume de l'électrospray pourrait nous donner des informations importantes sur la conformation de ce système dans un degré de solvation intermédiaire ce qui pourrait mieux définir le rôle du solvant dans la conformation des protéines. Ces mesures peuvent également être complétées par une analyse FRET : par exemple, les greffages d'un couple de chromophore donneur-accepteur, ou d'un chromophore sensible à son environnement local sont envisageables. De plus, l'anisotropie de fluorescence est un paramètre optique qui peut être exporté sur d'autres systèmes, plus atypiques. En particulier, l'anisotropie de fluorescence résolue en temps d'agrégats d'or stabilisés par des groupements thiols pourrait permettre de mesurer la dimension de ces agrégats dans une gamme de taille nanométrique. Ce concept est détaillé en annexe de ce manuscrit dans une version anticipée d'un article qui n'a pas encore été soumis.

Enfin, notre expertise dans les domaines du développement expérimental de source aérosol et de méthodes optiques pour l'analyse de système dynamique a été exploitée dans le chapitre 5. Le projet ERTIGO est un projet qui a pour vocation de produire des événements de fusion nucléaire localisés grâce à l'explosion coulombienne d'un ensemble de nanoparticules dopées en Bore, initiées par faisceau laser ultra-court et ultra-intense. Pour que cette absorption laser soit efficace, il est nécessaire que l'interaction lumière-matière se produise en milieu isolé. Deux stratégies sont adoptées. D'une part, les nanoparticules peuvent être générées directement sous vide grâce à une source aérosol. D'autre part, elles peuvent être piégées dans le milieu raréfié d'une bulle générée par nano-cavitation laser. Grâce au développement d'un laser aléatoire pour l'imagerie, il a été démontré par microscopie optique résolue en temps que la génération d'une bulle micrométrique par nano-cavitation induite par laser dans une solution colloïdale de nanoparticule ne permettait pas de piéger les nanoparticules au sein de la bulle comme souhaité, mais qu'au contraire, elles étaient balayées par l'interface liquide-gaz lors de la formation et de l'expansion de la bulle. Cependant, le concept d'explosion coulombienne de gouttelettes d'Ethanol générées par la source aérosol développée a pu être validé grâce à la détection de particule chargée à des énergies proche du MeV.

Les pistes explorées par le projet ERTIGO ouvrent les portes pour de nombreuses expériences. La description complète de la plume de l'aérosol pulsé peut être effectuée grâce à des techniques similaires utilisées lors de l'étude réalisée pour l'électrospray afin d'optimiser les paramètres de fonctionnement de la source aérosol. De plus, l'utilisation de cibles aérosols pour la génération de particule accélérée par explosion coulombienne induite par laser peut être mieux caractérisée quantitativement afin de comparer leur efficacité relative avec les cibles solides, plus classiques. Les nanoparticules dopées en Bore doivent également être testées afin de confirmer ou d'infirmier la présence de réaction de fusion nucléaire par l'observation de particule alpha. Enfin, même si l'approche « nano-cavitation » en présence de nanoparticules n'a pas été concluante pour le projet ERTIGO, des résultats intéressants ont pu être dégagés. L'influence de l'activité optique des nanoparticules d'or dispersées en solution sur la formation et la dynamique d'une microbulle générée par cavitation laser a pu être entraperçue. En particulier, le caractère plasmonique de ces objets peut être approfondi. La taille, la morphologie, la nature des nanoparticules, mais aussi les propriétés d'excitation laser sont des paramètres à explorer afin de mieux définir les contours des mécanismes d'absorption laser ainsi que leurs impacts sur la génération de plasma, le seuil de cavitation laser et la dynamique de la microbulle.

Annexes

Liste de Publications

- [1] A. Soleilhac, X. Dagany, P. Dugourd, M. Girod, and R. Antoine, “Correlating Droplet Size with Temperature Changes in Electrospray Source by Optical Methods,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 16, pp. 8210–8217, Aug. 2015.
- [2] A. Soleilhac, M. Girod, P. Dugourd, B. Burdin, J. Parvole, P. Dugas, E. Lacôte, E. Bourgeat-Lami, and R. Antoine, “Temperature Response of Rhodamine B-Doped Latex Particles. From Solution to Single Particles,” *Langmuir*, vol. 32, no. 16, pp. 4052–4058, Apr. 2016.
- [3] A. Soleilhac, F. Bertorelle, P. Dugourd, M. Girod, and R. Antoine, “Monitoring methanol-induced protein unfolding by fluorescence anisotropy measurements of covalently labelled rhodamine probe,” *Eur. Phys. J. D*, vol. 71, no. 6, p. 142, 2017.
- [4] A. Soleilhac, F. Bertorelle, C. Comby-Zerbino, F. Chirot, N. Calin, P. Dugourd, and R. Antoine, “On the Size Characterization of Glutathione-Protected Gold Nanoclusters in the Solid, Liquid and Gas Phases,” *J. Phys. Chem. C*, Nov. 2017.
- [5] A. Soleilhac, F. Bertorelle, and R. Antoine, “Sizing protein-templated gold nanoclusters by time resolved fluorescence anisotropy decay measurements,” *Spectrochim. Acta A*, Dec 2017.
- [6] I. Russier-Antoine, F. Bertorelle, A. Kulesza, A. Soleilhac, A. Bensalah-Ledoux, S. Guy, P. Dugourd, P. Brevet, and R. Antoine, “Chiral supramolecular gold-cysteine nanoparticles: Chiroptical and nonlinear optical properties,” *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, vol. 26, no. 5, pp. 455–460, 2016.
- [7] F. Bertorelle, C. Moulin, A. Soleilhac, C. Comby-Zerbino, P. Dugourd, I. Russier-Antoine, P. Brevet, and R. Antoine, “Bulky counterions: enhancing the two-photon excited fluorescence of gold nanoclusters,” *ChemPhysChem*, p. n/a-n/a.

Publication à soumettre :

M. K. Bhuyan, A. Soleilhac, T. E. Itina, R. Antoine, and R. Stoian, “Multiscale dynamics of laser-induced bubbles in liquids containing gold nanoparticles. Evidence for a snow-plough effect.”



Jean-Éric Ducret

Institut de Recherche sur les lois Fondamentales de l'Univers

Département d'Astrophysique

CEntre Lasers Intenses & Applications UMR 5107

Université de Bordeaux

351, cours de la Libération / 43, rue Pierre Noailles

33405 TALENCE

Tél. : +33540002582 / +33607853939

FAX : +33540002580

jean-eric.ducret@u-bordeaux.fr

jean-eric.ducret@cea.fr

Courte synthèse des deux semaines de faisceau ECLIPSE avec la source aérosol du CELIA, du 25 septembre au 5 octobre

Nous avons réalisé une expérience sur le laser ECLIPSE avec la source aérosol du CELIA, construite sous la responsabilité de l'ILM de Lyon au cours des semaines 39 et 40 de cette année, dans l'enceinte SOPHIA de la salle ECLIPSE3. Le dispositif est présenté dans la figure 1 ci-dessous et comprenait :

- La source aérosol elle-même, qui injectait de l'éthanol au point de focalisation du laser sous la pression d'azote (25 bars) ;
- Un spectromètre magnétique pour les particules de charge positive (des ions)
- Un spectromètre magnétique pour les particules de charge négative
- Une parabole de Thomson, dont le point de déviation nulle était situé dans un coin de la détection et, ce, afin de permettre une couverture aussi large que possible du spectre en énergie des ions émis au cours de l'interaction laser – jet
- Un dispositif de mesure de l'absorption d'un laser par le jet, comprenant un laser continu couplé à une photodiode (ThorLabs, DET36A) dont la lecture était déclenchée par le tir laser

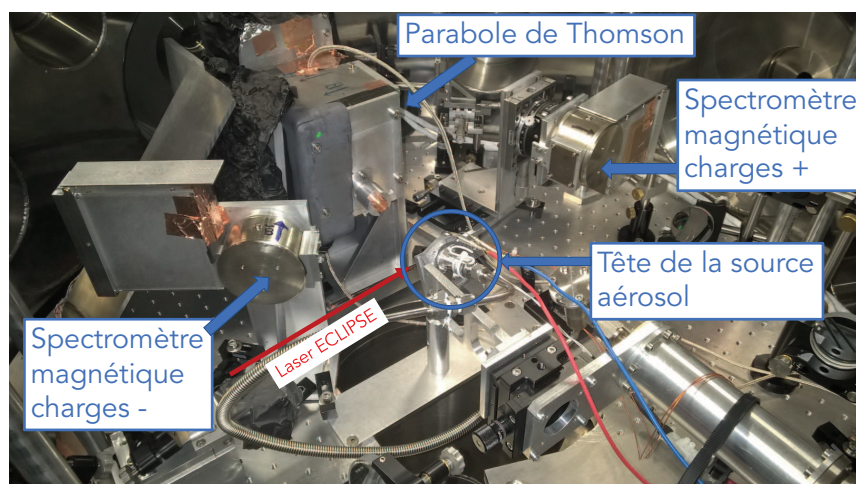


Figure 1 : dispositif expérimental dans l'enceinte SOPHIA de la salle ECLIPSE3 du CELIA

A) Objectifs de l'expérience

- 1) Déterminer des procédures fiables et simples d'alignement des diagnostics dans le plan horizontal passant par le point de focalisation du laser matérialisé par la pointe mécanique de la chambre SOPHIA et placée en son centre
- 2) Optimiser la détection des particules en aval de leur analyse magnétique et, pour la parabole de Thomson, électrostatique, détection faite d'Imaging Plates (IP) de divers types dont nous maîtrisons le fonctionnement et l'utilisation grâce aux travaux que nous avons réalisés dans le cadre de l'EquipEx PETAL+
- 3) Déterminer la nature du bruit de fond de photons détecté et la réduire en renforçant si besoin le blindage des détecteurs
- 4) Trouver un point de fonctionnement acceptable si ce n'est optimal qui assure une bonne reproductibilité

B) Méthodes et critères de mesure

- 1) Pour chaque ensemble de paramètres expérimentaux (température de la tête de la source, pression d'azote, types d'IP installées aux plans de dispersion des diagnostics, on réalisait des tirs lasers qui déclenchait le fonctionnement de la source aérosol et permettait d'accumuler dans la détection de la statistique de particules détectées jusqu'à ce que le diagnostic d'absorption nous indique que le jet ne contenait plus d'éthanol. Pour chaque mesure nous avons pu réaliser entre 40 et 200 tirs, les variations dans le nombre total de tirs par remplissage du réservoir d'éthanol de la source n'étant pas expliquée pour le moment
- 2) Pour chaque série de tirs nous avons enregistré un échantillon plus ou moins important de profil d'absorption que nous analyserons et qui nous donnera une estimation de la reproductibilité du fonctionnement de la source aérosol. Un exemple de la dépendance en temps de cette absorption est donné dans la figure 2 ci-dessous qui présente le signal de la photodiode en fonction du temps, gradué en secondes.
- 3) A la fin de chaque série de tirs, les IP étaient numérisées dans des fichiers analysés avec ImageJ et qui nous indiquaient le nombre de PSL par pixel (équivalents, selon des courbes d'étalonnage que nous connaissons, à un nombre de particules par pixel), comme on peut en voir dans la figure 3 ci-dessous

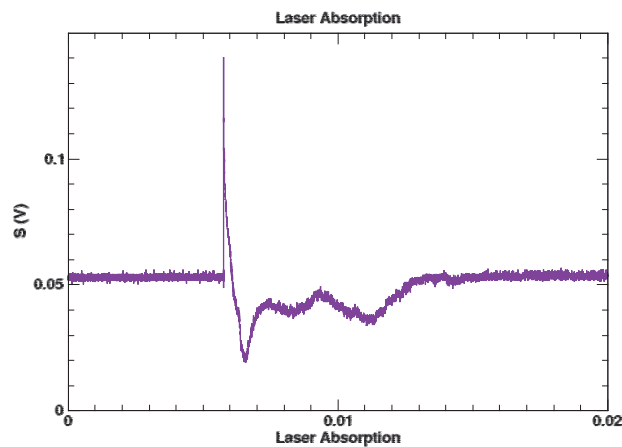


Figure 2 : Signal de photodiode présentant l'absorption du laser par le jet de la source aérosol

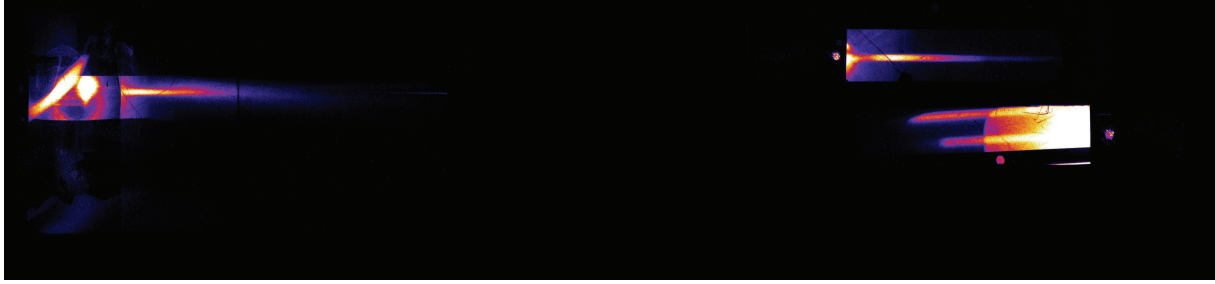


Figure 3 : Numérisation du signal des Imaging Plates après une séquence de tirs laser.
On distingue les détecteurs des trois diagnostics, le code couleur correspond au nombre de PSL par pixel, celui-ci étant d'autant plus important que la couleur est claire.

C) Commentaires

- 1) La figure 2 présente le signal de la photodiode en fonction du temps, déclenché par le tir laser. On y voit trois composantes :
 - a. Le niveau continu à environ 0.05 V qui correspond à l'éclairage direct de la photodiode par le laser
 - b. Le pic initial qui est le tir laser proprement dit et que la photodiode enregistre comme un éclaircissement instantané de l'intérieur de l'enceinte SOPHIA
 - c. Le signal laser absorbé par l'éthanol du jet

L'électrovanne reçoit pour son ouverture une porte électronique de 10 ms, valeur en dessous de laquelle elle ne s'actionne que de manière aléatoire. On retrouve ces 10 ms dans la durée du signal absorbé.
- 2) La figure 3 montre le signal enregistré sur les IP lors de l'une des séquences de tirs laser. Les trois diagnostics y figurent : à gauche, le détecteur de la parabole de Thomson, à droite en haut le détecteur du spectromètre pour les particules de charge positive et à droite en bas le spectromètre pour les particules de charge négative, muni de deux collimateurs d'entrée, ce qui explique la présence de deux traces de particules. Le code des couleurs correspond au niveau de PSL (nombre de photons de luminescence) par pixel (taille des pixels : $50 \times 50 \mu\text{m}^2$) : plus la couleur est claire, plus ce nombre est élevé.

D) Quelques résultats bruts (non exhaustifs)

- 1) En utilisant comme critère d'optimisation le nombre moyen de particules détectées dans nos diagnostics par tir laser, nous avons trouvé un point de fonctionnement en début d'ouverture de la vanne (voir figure 2). L'interaction du laser plus tard (1 à 5 ms) à l'intérieur de l'ouverture de la vanne ne produit pratiquement aucune particule, ce que nous interprétons comme une interaction avec un milieu qui n'est plus constitué de nanogouttelettes mais qui est presque continu, interaction qui ne génère alors aucune explosion coulombienne d'objets individuels. Ceci signifie en particulier que toute la matière injectée après 1 ms est inutile pour la physique que nous voulons étudier.
- 2) Nous avons mesuré la production de particules à deux endroits du jet : < 1 mm de la sortie de la buse et, suivant un conseil de notre collègue Thanh-Ha, à 10 mm de la sortie de la buse. La comparaison des spectres d'absorption du laser par la photodiode montre que la densité du jet est moindre à 10 mm qu'à la sortie immédiate. Néanmoins, à cette position, le signal de production de particules que nous détectons reste très important et, de plus, fait apparaître dans la parabole de Thomson une composante de basse énergie dans le spectre de particules détectées que nous ne voyons pas quand le laser interagit directement à l'entrée du jet

- 3) Le fonctionnement de l'électrovanne et de la source aérosol semble être assez reproductible si on le mesure avec les figures d'absorption du laser par la photodiode. Si on l'évalue par le nombre moyen de particules détectées par tir laser, cette reproductibilité semble moins bonne. Le rôle et l'importance du pointeau, que nous avons remplacé plusieurs fois, restent encore un peu incertain.
- 4) Nous avons identifié deux sources de photons :
 - a. Dans le spectromètre pour les particules de charges négatives, dont la face avant n'était pas blindée et simplement constituée d'une plaque d'aluminium, nous avons détecté dans nos premiers tirs beaucoup de photons assez durs (max 60 keV), qu'une protection de cuivre en face avant a permis d'éliminer totalement (les deux autres diagnostics sont totalement blindés en face avant),
 - b. Dans les trois diagnostics, nous avons pu mesurer que le point de déviation magnétique nulle est pour l'essentiel éclairé par des photons dont l'énergie est inférieure à 1 keV et qui sont absorbés par les 9 μm qui constituent la couche de protection d'une IP MS.
- 5) Le spectromètre à particules de charge négative semble ne pas avoir détecté d'électrons mais bien plutôt des ions négatifs d'assez faible énergie.
- 6) L'utilisation d'un collimateur de 0.5 mm à l'entrée de la parabole, combinée à un détecteur placé à proximité de la sortie de l'élément de déviation électrostatique de la parabole de Thomson ne nous a pas permis d'identifier avec certitude le type d'ions que nous avons détectés (hydrogène ou carbone). Une première estimation des rigidités magnétiques de ces ions p/q , où p est l'impulsion et q la charge, semblerait indiquer plutôt des ions $^{12}\text{C}^{q+}$, avec $q = 1$ ou 2 . Ceci reste à confirmer.

